

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO
ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA: ATENÇÃO À
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

Caroline Montagner Dias

**Análise do microbioma fecal por
shotgun e dosagem de calprotectina
fecal em lactentes com proctocolite
alérgica induzida por proteína
alimentar**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2024

Caroline Montagner Dias

**Análise do microbioma fecal por
shotgun e dosagem de calprotectina
fecal em lactentes com proctocolite
alérgica induzida por proteína
alimentar.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Pediatria: Atenção à Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Helena Targa Ferreira

**Porto Alegre
2024**

Catálogo na Publicação

Montagner Dias, Caroline

Análise do microbioma fecal por shotgun e dosagem de calprotectina fecal em lactentes com proctocolite alérgica induzida por proteína alimentar / Caroline Montagner Dias. -- 2024.

93 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Pediatria, 2024.

Orientador(a): Cristina Helena Targa Ferreira.

1. Alergia alimentar. 2. Microbioma intestinal. 3. Shotgun sequencing. 4. Calprotectina fecal. 5. Lactentes.
I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por estar à frente de tudo, guiando meus passos e segurando minha mão durante toda minha vida.

Ao meu esposo Eduardo, meu amor, que me acompanha nesses últimos 11 anos, tendo paciência, resiliência, me apoiando em todos os projetos e me incentivando a melhorar pessoal e profissionalmente.

Ao meu filho João Pedro, meu grande sonho, que veio para me completar, me ensinar sobre a intensidade do amor e da vida, da forma mais linda, pura e inocente.

Aos meus amados pais, Paulo e Glacir, e meus também amados irmãos, Eduardo e Maurício, que me incentivam, ensinam e inspiram desde criança, presentes em todos os momentos da minha vida, e que hoje são minha grande rede de apoio.

Aos meus amigos e colegas, que também sempre me apoiaram, me ajudaram e entenderam minha ausência devido aos estudos e trabalho.

À minha orientadora, chefe e colega Dra Cristina Targa, minha inspiração e exemplo de gastropediatra, minha eterna gratidão por nunca desistir de mim, por acreditar no meu trabalho, entender minhas dificuldades, segurar na minha mão e me ajudar a seguir em frente.

Aos avaliadores da minha banca, que também são grandes profissionais, exemplos e inspirações para mim, que dispuseram de seu tempo para estarem comigo nesse momento.

Muito obrigada.

RESUMO

Objetivos: conhecer o microbioma de lactentes portadores de proctocolite alérgica induzida por proteína alimentar, além de quantificar a calprotectina fecal para avaliá-la como marcador diagnóstico de proctocolite alérgica.

Métodos: Estudo transversal, com análise de fezes de lactentes menores de 6 meses de idade, em aleitamento materno exclusivo, diagnosticados com proctocolite alérgica. O microbioma fecal foi analisado através do sequenciamento *shotgun* e a calprotectina fecal por imunoenensaio.

Resultados: Foram incluídos 9 lactentes, nascidos a termo, entre 27 e 133 dias de vida. Quatro lactentes tinham calprotectina fecal superior a 1.000 µg/g, enquanto um lactente tinha calprotectina de 172µg/g. A alfa diversidade avaliada pelo índice de Shannon foi normal. Todos os lactentes apresentaram bactérias dos filos Firmicutes (média 28,5%), Proteobacteria (média 55,4%), Bacteroidetes (média 7,4%) e Actinobacteria (média 6,9%). Os gêneros e espécies foram descritos quando em abundância superior a 0,5%. *Clostridium* foi o gênero mais prevalente, presente em 8 dos 9 lactentes, com média de 14,4% (DP 11,9), sendo as espécies identificadas *Clostridium botulinum* (10,2%), *Clostridium neonatale* (4,1%), *Clostridium perfringens* (2,5%) e *Clostridium butyricum* (2,3%). O gênero *Klebsiella* esteve presente em 7 lactentes, com média de 17,0% (DP14,8), sendo as espécies encontradas *Klebsiella pneumoniae* em 66,7% dos lactentes (abundância de 0,6 a 26,5%), *Klebsiella oxytoca* em 44,4% dos lactentes (abundância de 0,5 a 8,7%) e *Klebsiella aerogenes* em 33,3% dos lactentes (abundância de 0,5 a 28%). Quatro dos nove lactentes não possuíam bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Bacteroides*.

Conclusão: Lactentes portadores de proctocolite alérgica apresentam disbiose, apesar de possuir uma diversidade adequada, com aumento de Proteobacterias como *Klebsiella*, e redução de *Bacteroides* e *Bifidobacterium*. A calprotectina mostrou-se inespecífica, com valores altos e baixos, na proctocolite alérgica.

Palavras-chave: alergia alimentar; microbioma intestinal; *shotgun sequencing*; lactentes

ABSTRACT

Objectives: to understand the microbiome of infants with allergic proctocolitis induced by food protein, and to quantify fecal calprotectin to evaluate it as a diagnostic marker for allergic proctocolitis.

Methods: This was a cross-sectional study analyzing the stools of infants under 6 months of age, exclusively breastfed, diagnosed with allergic proctocolitis. The fecal microbiome was analyzed by shotgun sequencing and fecal calprotectin by immunoassay.

Results: Nine full-term infants between 27 and 133 days old were included. Four infants had fecal calprotectin higher than 1,000 $\mu\text{g/g}$, while one infant had calprotectin of 172 $\mu\text{g/g}$. The alpha diversity assessed by the Shannon index was normal. All the infants had bacteria of the phyla Firmicutes (average 28.5%), Proteobacteria (average 55.4%), Bacteroidetes (average 7.4%) and Actinobacteria (average 6.9%). Genera and species were described when in abundance greater than 0.5%. *Clostridium* was the most prevalent genus, present in 8 of the 9 infants (average 14.4%), the species being identified *Clostridium botulinum* (10,2%), *Clostridium neonatale* (4,1%), *Clostridium perfringens* (2,5%) and *Clostridium butyricum* (2,3%). The genus *Klebsiella* was present in 7 infants, with a mean of 17.0% (SD14.8), the species found were *Klebsiella pneumoniae* in 66.7% of infants (abundance of 0.6 to 26.5%), *Klebsiella oxytoca* in 44.4% of infants (abundance of 0.5 to 8.7%) and *Klebsiella aerogenes* in 33.3% of infants (abundance of 0.5 to 28%). Four of the nine infants in the study did not have the *Bifidobacterium* and *Bacteroides* genus.

Conclusion: Infants with allergic proctocolitis show dysbiosis, despite having adequate diversity, with an increase in Proteobacteria such as *Klebsiella* and a reduction in *Bacteroides* and *Bifidobacterium*. Calprotectin was non-specific, with high and low values in allergic proctocolitis.

Keywords: food allergy; gut microbiome; shotgun sequencing; infants;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização do operon rRNA em bactérias. As sequências de rRNA são cercadas por espaçadores transcritos externos (5' ETS e 3' ETS) e separados por um ou mais espaçadores transcritos internos (ITS).

Figura 2. Organização de regiões hipervariáveis e conservadas do gene 16S rRNA.

Figura 3. Diferentes estratégias de sequenciamento e bioinformática para análise do microbioma humano.

Figura 4. Material e aparelho para coleta e análise de calprotectina fecal.

Figura 5. Kit de coleta de fezes OMNIgene.GUT da marca DNA Genotek, Biogenética

No Artigo:

Graph 1: Distribution of relative abundance by phyla and by samples of the Gut Microbiome of infants analyzed by sequencing shotgun, showing an increase in Proteobacteria.

LISTA DE TABELAS

Table 1. Characterization of the sample of patients with allergic proctocolitis

Table 2: Genus identified with abundance greater than 0.5% in the fecal microbiome of 9 infants with allergic proctocolitis

Table 3. Species found in an abundance greater than 0.5% in the fecal microbiome of 9 infants with allergic proctocolitis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APLV – Alergia a proteína do leite de vaca

Ca⁺² – Íon cálcio

DGBIs – Desordens da interação do eixo cérebro-intestino

DP – Desvio padrão

ETS - espaçadores transcritos externos

EUA – Estados Unidos da América

FGIDs – Distúrbios funcionais gastrointestinais

FPE – Enteropatia induzida por proteína alimentar

FPIAP – *Food Protein-induced Allergic Proctocolitis*

FPIES - *Food Protein-induced Enterocolitis Syndrome*

GMAP - *Gastrointestinal Microbiome and Allergic Proctocolitis*

IgE – Imunoglobulina E

ILCs - células linfoides inatas

ITS - espaçadores transcritos internos

MAMPs - *microbe-associated molecular patterns*

Máx. – máximo

Mín. – mínimo

NGS - *Next Generation Sequencing*

OMS – Organização Mundial da Saúde

rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico

TPO – Teste de Provocação Oral

WGS-*shotgun* - *Whole Genome Sequencing Shotgun*

Zn – Zinco

SUMÁRIO:

1. Introdução	10
2. Revisão da Literatura	12
2.1 Alergia alimentar	12
2.2 Microbiota intestinal	15
2.3 Métodos de análise da microbiota.....	16
2.4 Microbioma intestinal.....	20
2.5 Microbioma intestinal e alergias.....	22
2.6 Calprotectina fecal e alergias alimentares	25
3. Justificativa	26
4. Objetivos	26
5. Hipóteses	27
6. Metodologia	27
7. Análise estatística	32
8. Aspectos éticos	32
9. Conclusões	33
10. Referências	34
11. Anexos	38
11.1 Artigo Científico	38
11.2 Aprovação Comitê de Ética.....	58
11.3 Normas de publicação: Jornal de Pediatria SBP	60
11.4 Confirmação da submissão do artigo	86
11.5 Questionário	88
11.6 Termo de consentimento livre e esclarecido	91

1. INTRODUÇÃO

A alergia alimentar é um efeito adverso à saúde decorrente de uma resposta imune específica, que ocorre de forma reprodutível na exposição a um determinado alimento.(1) A reação imune pode ser mediada por Imunoglobulina E (IgE), não mediada por IgE ou mista. A proteína do leite de vaca é a principal causa de alergia alimentar em lactentes e crianças menores de 3 anos de idade.(2)

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a alergia alimentar atingiu proporções epidêmicas, com um aumento significativo no número de crianças com alergia alimentar em muitos países.(3,4) As possíveis razões sugeridas para esse aumento são a melhora nas condições sanitárias, via de parto, uso de antibióticos e uma dieta de estilo ocidental. Curiosamente, esses fatores também afetam a microbiota intestinal, sugerindo que a disbiose (desequilíbrio microbiano) também pode estar relacionada ao aparecimento das doenças alérgicas.(1,5,6)

A proctocolite alérgica induzida por proteína alimentar (FPIAP) é uma forma comumente reconhecida de alergia alimentar não mediada por IgE na primeira infância, com incidência cumulativa em 3 anos de até 17%, segundo o estudo de coorte prospectiva norte-americano GMAP (*Gastrointestinal Microbiome and Allergic Proctocolitis*) publicado em 2020.(7) O principal alimento desencadeante é a proteína do leite de vaca. A proctocolite alérgica é tipicamente diagnosticada pela presença de fezes com sangue, podendo conter muco e/ou diarreia, nos primeiros meses de vida, em um lactente geralmente saudável. A proctocolite alérgica pode ocorrer em crianças em aleitamento materno e/ou em uso de fórmula infantil.(3,8) Quando não há um consumo direto do leite de vaca (seja leite in natura, seja nas fórmulas infantis), acredita-se que a transferência desses alérgenos pelo leite materno seja o responsável por induzir a resposta inflamatória e conseqüentemente os sintomas associados à alergia alimentar não-IgE mediada. A eliminação da proteína da dieta da lactante, resulta na resolução dos sintomas na maioria dos casos, e a tolerância ao alérgeno alimentar ocorre frequentemente em 1 ano.(1,3)

A patogênese da alergia alimentar e a fisiologia dos mecanismos de tolerância oral são complexos e ainda não estão totalmente esclarecidos. Há um número crescente de evidências de que a microbiota intestinal desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das alergias alimentares.(6,9) A microbiota intestinal é o conjunto de microrganismos que reside no trato gastrointestinal humano, que vai

sendo composta em número e diversidade de microrganismos, a qual pode sofrer influência de diversos fatores como tipo de parto, condições socioculturais e demográficas, e sobretudo fatores nutricionais. Evidências sugerem que muitas destas alterações epigenéticas sobre o microbioma podem ser replicadas de maneira transgeracional.(10) A microbiota desempenha um papel importante na manutenção da saúde do hospedeiro. Uma conversa cruzada entre a microbiota intestinal, antígenos alimentares, inflamação intestinal e o sistema imunológico inato no início da vida, provavelmente contribui para os mecanismos responsáveis pela aquisição de tolerância saudável ou desenvolvimento de alergia alimentar.(6) Um distúrbio no padrão de colonização ideal da microbiota intestinal pode estar relacionado com um potencial risco a longo prazo de desenvolvimento de proctocolite alérgica, já que muitas doenças atuais têm sua gênese associada a falhas no desenvolvimento ou na função do sistema imunológico, que podem estar relacionadas a estes quadros disbióticos, quer seja pela diminuição das bactérias simbióticas ou pelo aumento das patogênicas.(11)

Avanços recentes em métodos de sequenciamento de última geração revelaram a presença de disbiose em pacientes com doenças alérgicas, o que aumenta a atenção sobre a relação entre disbiose e o desenvolvimento da alergia alimentar.(11) Estudos prospectivos revelaram a presença de disbiose antes mesmo do início da doença alérgica, sugerindo que a disbiose provavelmente seja uma das causas das doenças alérgicas.(11–14) Embora mais estudos sejam necessários para entender essa associação e o efeito preventivo da correção da disbiose em doenças alérgicas, o efeito da disbiose em seu desenvolvimento está se tornando amplamente aceito.(11)

O diagnóstico de alergia alimentar não mediada por IgE representa um desafio, especialmente devido à falta de um método diagnóstico com adequada sensibilidade e especificidade. Os consensos que orientam a prática clínica destacam a necessidade de testar a exclusão do alérgeno por determinado período e após reintroduzi-lo para a confirmação diagnóstica.(15) Em busca por marcadores, a calprotectina fecal aparece como uma possibilidade, visto que é uma proteína encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e macrófagos, e reflete a presença de inflamação da mucosa intestinal.(16,17)

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alergia alimentar

A alergia alimentar é um problema de saúde global, com prevalência de 2,5% a 8% em crianças nos Estados Unidos (EUA), e vem aumentando em uma taxa estimada de 1,2% por década. É responsável por impacto significativo na qualidade de vida, tanto em nível emocional, social e financeiro. Os alérgenos alimentares mais comumente envolvidos são o leite de vaca, soja, ovo, trigo, amendoim, castanhas, peixes e crustáceos(18).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de alergia alimentar incluem atraso na introdução dos alimentos alergênicos na dieta dos lactentes, dietas do mundo moderno, exposição a antiácidos e a presença de outras doenças atópicas, principalmente dermatite atópica e eczema, por favorecer o desenvolvimento da marcha atópica em virtude da sensibilização cutânea (18). Além disso, outros fatores que influenciam na microbiota, como uso de antibióticos, poluentes, vacinas e parto cesárea parecem desempenhar um papel significativo na mudança do sistema imune intestinal e consequente fator de risco para alergia alimentar(5,8).

A reação imunológica que ocorre na alergia alimentar é que define seus subtipos como IgE mediada, não IgE mediada ou mista, quando ambos os mecanismos (IgE e não IgE) estão envolvidos(2).

As alergias IgE mediadas são mais facilmente reconhecidas e diagnosticadas, pois apresentam reações imediatas (geralmente nas primeiras 2 horas do contato com o alérgeno), os sinais e sintomas são mais característicos, como angioedema, urticária e/ou anafilaxia, e têm a presença de IgE específica ou teste cutâneo positivo para o alérgeno em questão(19).

Em contraste com as reações mediadas por IgE, os distúrbios alérgicos alimentares não mediados por IgE tem uma resposta imune principalmente mediada por células, sendo manifestada mais tardiamente (após 2 horas, geralmente entre 6 e 72 horas do contato com o alérgeno)(3,20), e caracteriza-se por sintomas gastrointestinais subagudos e/ou crônicos, além de não haver exames complementares que estabeleçam o diagnóstico. Classicamente incluem a proctocolite alérgica induzida por proteína alimentar, síndrome de enterocolite induzida por proteínas alimentares (FPIES), enteropatia induzida por proteínas

alimentares (FPE), e manifestações inespecíficas, como cólica, constipação, vômitos e irritabilidade.(21)

O padrão ouro para diagnóstico da alergia alimentar não mediada por IgE é a exclusão do alérgeno por 2 a 4 semanas, apresentando melhora dos sinais e sintomas, seguido pela sua reintrodução (teste de provocação oral), com o retorno das manifestações (3). A maioria das crianças com alergia alimentar não IgE mediada possuem alergia leve a moderada e portanto não necessitam de internação. À exceção dos pacientes com suspeita de FPIES, que necessitam fazer o teste de provocação oral (TPO) sob supervisão médica em ambiente hospitalar, pois correm risco de desidratação(19).

As alergias mistas são aquelas em que ambos os mecanismos imunológicos estão envolvidos (IgE e não IgE), e incluem patologias gastrointestinais, como as doenças eosinofílicas (esofagite eosinofílica e gastroenteropatia eosinofílica), cutâneas, como a dermatite atópica e respiratórias, como a asma(22).

2.1.1. Alergia alimentar não mediada por IgE

a) Proctocolite alérgica induzida por proteína alimentar (FPIAP)

Proctocolite alérgica induzida por proteína alimentar (FPIAP) é uma inflamação de sigmóide e reto, mediada por célula, caracterizada por edema e erosões da mucosa. A análise histológica demonstra infiltrado eosinofílico no epitélio e lâmina própria, sugerindo uma causa alérgica, que é apoiada pela resolução dos sinais após a eliminação dietética do alérgeno.(5,15)

FPIAP é uma condição benigna, que ocorre em bebês alimentados com leite materno e/ou com fórmula infantil e tipicamente manifesta sintomas nos primeiros 3 meses de vida, mas pode ocorrer mais tarde na infância até os 3 anos de idade.(1,8) A principal manifestação clínica é a presença de sangue nas fezes (hematoquezia), associado ou não a presença de muco e diarreia.(8)

A proteína do leite de vaca é a causa mais comum envolvida, e os lactentes são expostos à ela por meio da introdução de fórmula infantil, do consumo do leite de vaca ou alimentos derivados, ou pela transferência do alérgeno pelo leite materno naqueles que são amamentados. A eliminação da proteína da dieta do lactente e/ou da lactante resulta na resolução dos sintomas na maioria dos casos, e a tolerância ao

alérgeno alimentar ocorre frequentemente próximo a um ano de idade, ou 6 meses após o diagnóstico.(1)

Os biomarcadores tiveram um desempenho ruim no espectro das alergias não-IgE mediadas(1). Os consensos atuais, que guiam a prática clínica, destacam a necessidade de obter a história focada no alérgeno para orientar a exclusão deste da dieta. Quando há resolução ou redução dos sintomas, que geralmente ocorre entre 2 e 4 semanas, se orienta o TPO, que é a reintrodução do alérgeno. Havendo o retorno dos sintomas, o diagnóstico está firmado e orienta-se dieta de exclusão do alérgeno(15). No entanto, alguns estudos mostram que muitas vezes na prática clínica isso não ocorre, havendo uma restrição empírica da dieta, com reintrodução do alérgeno apenas próximo a 1 ano de idade(7).

b) Síndrome da enterocolite induzida por proteína alimentar (FPIES)

FPIES geralmente se apresenta de forma aguda, embora também tenha sido descrita uma forma crônica. A forma aguda é caracterizada por crises de vômito que ocorrem 1 a 4 horas após a ingestão do alérgeno(23). A êmese repetitiva está associada à letargia progressiva, que pode estar associada a choque, desidratação e acidose, hipotonia e hipotensão(24). Episódios de diarreia podem ocorrer, geralmente dentro de 24 horas(19).

Os sintomas do FPIES crônico dependem da quantidade do alérgeno continuamente presente na dieta. Com doses baixas manifestam-se como vômitos intermitentes e/ou diarreia e atraso no crescimento, sem desidratação ou acidose metabólica. Uma ingestão mais regular é associada a progressivos vômitos e diarreia (ocasionalmente com sangue) intermitentes, às vezes com desidratação e acidose metabólica(19).

c) Enteropatia induzida por proteína alimentar (FPE)

A enteropatia induzida por proteína alimentar causa má absorção, manifestando-se com diarreia crônica e consequente *failure to thrive* nos primeiros 9 meses de vida. Na maioria das vezes começa nos dois primeiros meses de vida, algumas semanas após a introdução da proteína do leite de vaca na dieta (19). Mais da metade dos bebês afetados também apresenta vômitos, distensão abdominal,

crescimento deficiente e falta de apetite(25). Em uma minoria de casos leva à anemia por deficiência de ferro, associada com presença de sangue oculto nas fezes. Geralmente é causado pelo leite de vaca, mas pode ser devido à soja ou ao ovo. Eliminação dos alérgenos alimentares responsáveis levam à regressão dos sintomas dentro de 1–4 semana(19).

d) Manifestações inespecíficas da alergia alimentar não mediada por IgE:

As manifestações inespecíficas de alergia não mediada por IgE como constipação, regurgitação, cólica, choro e irritabilidade são um desafio diagnóstico, visto que se confundem com os distúrbios funcionais gastrointestinais (FGIDs), atualmente chamados de desordens da interação do eixo cérebro-intestino (DGBIs), pelos critérios de Roma IV. A variedade de sintomas que podem ser sugestivos de APLV não IgE mediada é ampla e inespecífica, e é provável que haja diagnóstico excessivo de alergia não mediada por IgE, visto que não há um marcador biológico com precisão diagnóstica. A prevalência de DGBIs é estimada em 25%, sendo significativamente maior que a APLV. A prevalência de APLV em lactentes com DGBIs ainda é controversa (20).

Alguns fatores associados aumentam a probabilidade de APLV nesses casos inespecíficos, que são: história familiar de alergias, envolvimento de vários sistemas (digestivo, cutâneo, respiratório), idade mais jovem e a falta de melhora apesar da otimização das medidas terapêuticas usuais para DGBIs. Está recomendado nesses casos a eliminação do alérgeno por 2 a 4 semanas com sua posterior reintrodução para confirmação diagnóstica.(20)

Segundo dados epidemiológicos, a sobreposição esperada entre APLV e doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) pode ser observada em menos de 1% dos bebês amamentados ou alimentados com fórmula. Para confirmar APLV em lactentes que apresentem refluxo, é recomendado a eliminação do alérgeno para diagnóstico, especialmente antes de realizar tratamento com supressores ácidos para DRGE(20).

2.2. Microbiota intestinal

Mais de 40 trilhões de bactérias de aproximadamente 1000 espécies residem no corpo humano, estando presentes nos intestinos, cavidade oral, aparelho

respiratório, pele e trato geniturinário.(11) O estudo da microbiota humana vem crescendo nos campos de pesquisa atualmente, sendo a maioria destinado para o trato gastrointestinal, visto que abriga a maioria dos microrganismos. A microbiota intestinal é essencial para processos metabólicos, nutricionais, fisiológicos e imunológicos. Na última década nossa compreensão sobre sua funcionalidade e seus papéis na saúde e na doença humana avançaram muito.(26)

Nas primeiras horas e dias após o nascimento há uma rápida evolução das comunidades microbianas tornando-se semelhante às adultas antes dos 3 anos de idade. Quando a exposição inicial é alterada, por exemplo, devido ao nascimento por cesariana, a colonização do intestino infantil difere tanto no tipo quanto na distribuição dos organismos. É possível que uma microbiota atípica estabelecida no início da vida perturbe o início dos processos metabólicos e imunológicos e contribua para mudanças no hospedeiro, mas os detalhes sobre essa sucessão microbiana são limitados. Doenças crônicas na idade adulta, como obesidade, alergia e atopia, doenças inflamatórias intestinais e o desenvolvimento de câncer de cólon tem sido associados a alterações na microbiota, no entanto, os efeitos causais em qualquer direção não foram mostrados(27).

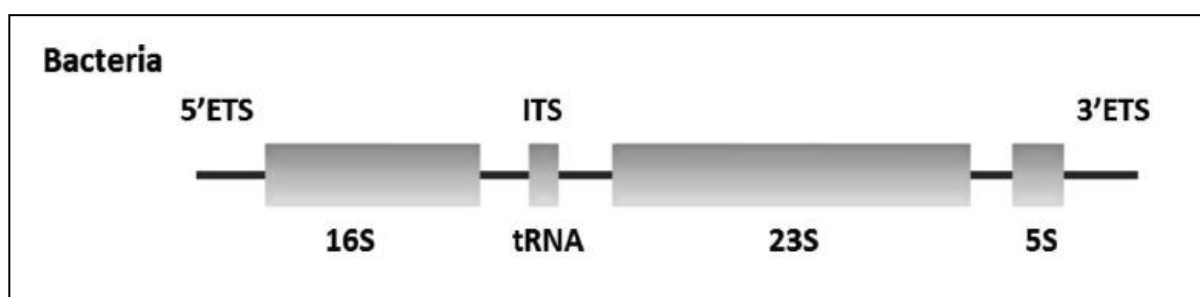
2.3. Métodos de análise da microbiota

Durante muitos anos, a cultura bacteriana representou a principal abordagem para explorar a estrutura e função da microbiota do ser humano, embora com a importante limitação de que mais de 99% de todos os micróbios não podem ser cultivados por técnicas padrões de laboratório, especialmente as espécies bacterianas anaeróbicas. O desenvolvimento de abordagens metagenômicas baseado no sequenciamento do gene 16s rRNA bacteriano via *Next Generation Sequencing* (NGS) tem sido, desde cerca de 2010, um dos os grandes avanços da biologia molecular, permitindo um melhor perfilamento da composição da microbiota humana e, portanto, uma compreensão mais aprofundada da importância da microbiota na etiopatogenia de diferentes patologias. (28)

O estudo do microbioma pode ser realizado por várias técnicas, sendo o sequenciamento de sub-regiões hipervariáveis do gene 16s rRNA via NGS a tecnologia mais amplamente utilizada. No entanto, o perfil microbiano via análise

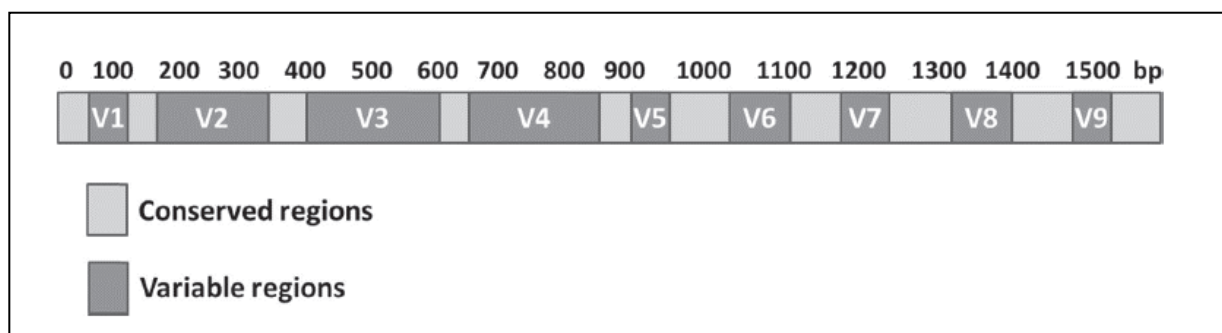
metagenômica 16s rRNA mostrou problemas críticos, incluindo a falta de confiabilidade da classificação taxonômica em nível de espécie e o preconceito introduzido pelas plataformas de sequenciamento e pela escolha de diversos dados software de processamento. Quanto ao primeiro aspecto, diferentes estudos destacaram que segmentar uma ou poucas sub-regiões hipervariáveis do gene 16s rRNA pode levar à sub-ótima representação de certas espécies bacterianas ou mesmo grupos taxonômicos, não conseguindo capturar a complexa biodiversidade de a microbiota humana. Além disso, o sequenciamento de porções curtas do gene 16s rRNA hipervariável, pode perder dados relevantes de variações genéticas fora da área sequenciada, levando à impossibilidade de distinguir espécies bacterianas estreitamente relacionadas devido a homologia entre sequências. Quanto a segunda questão, foi relatado que a escolha de diferentes plataformas e softwares de sequenciamentos de processamento de dados também podem introduzir variabilidade, produzindo diferenças na caracterização da amostra dependendo de sua precisão, sensibilidade e taxa de erro. Da mesma forma, o uso de diferentes métodos pipelines analíticos aplicados ao processamento de dados podem levar a diferenças em composição da microbiota, já que nem todos os pipelines disponíveis incluem os mesmos passos.(28)

Figura 1. Organização do operon rRNA em bactérias. As sequências de rRNA são cercadas por espaçadores transcritos externos (5' ETS e 3' ETS) e separados por um ou mais espaçadores transcritos internos (ITS).



FONTE: T. A. McAllister, L. Dunière, P. Drouin, S. Xu, Y. Wang, K. Munns, R. Zaheer Journal of Dairy Science Vol. 101 No. 5, 2018. (29)

Figura 2. Organização de regiões hipervariáveis e conservadas do gene 16S rRNA.



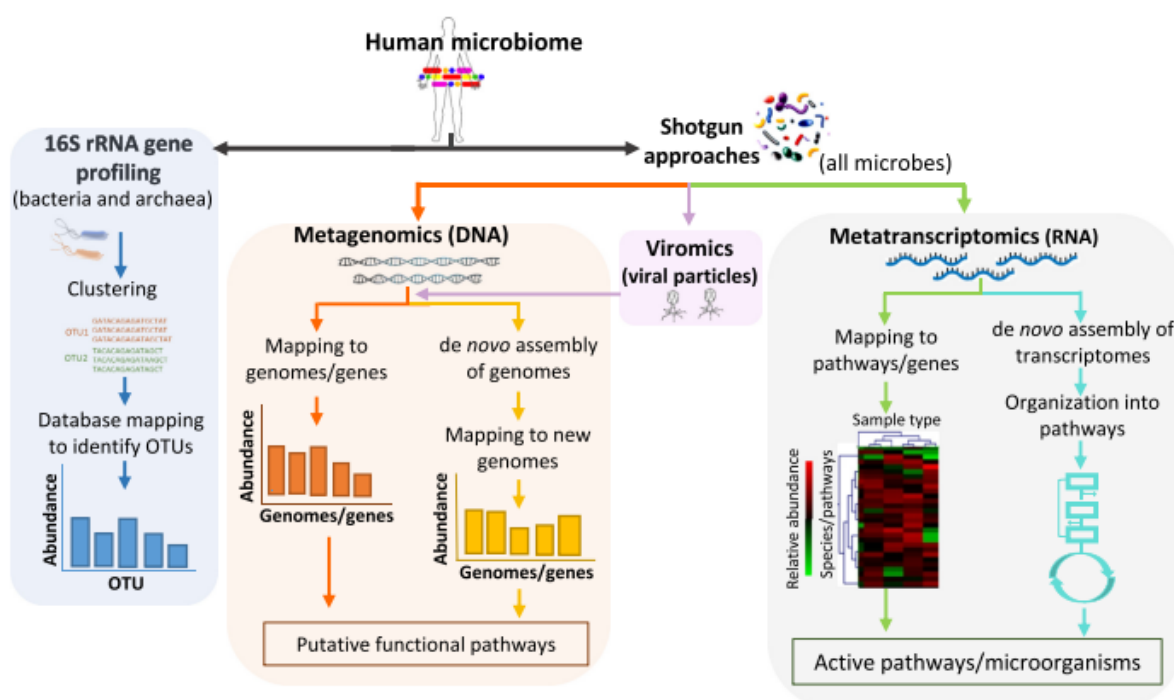
FONTE: T. A. McAllister, L. Dunière, P. Drouin, S. Xu, Y. Wang, K. Munns, R. Zaheer
Journal of Dairy Science Vol. 101 No. 5, 2018. (29)

Na tentativa de superar essas limitações, foi desenvolvido o sequenciamento do gene 16s rRNA completo ou *Whole Genome Sequencing Shotgun (WGS-shotgun)*. A análise completa do gene 16s rRNA forneceu evidências de variações adicionais nos níveis de espécie ou cepa, levando a uma taxonomia mais aprofundada da classificação da microbiota humana. O WGS-shotgun, permitiu a identificação de genes de microrganismos funcionais através da montagem de todos os fragmentos de DNA sequenciados em uma amostra, tornando possível determinar quase toda a genética das espécies microbianas anteriormente não caracterizadas. As principais características das abordagens de sequenciamento de leitura longa residem na produção de um enorme volume de dados complexos, com alto rendimento e múltiplas redundâncias, tornando um desafio analisar eficientemente por meio de abordagens computacionais tradicionais e algoritmos, portanto, novas ferramentas de bioinformática estão sendo desenvolvidas.(28)

No perfil do gene 16S rRNA, as sequências brutas obtidas são passadas através de filtros de qualidade para minimizar a presença de artefatos de sequenciamento. As leituras de sequência filtradas resultantes são agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), que representam organismos semelhantes. Depois disso, a identidade taxonômica é atribuída para cada OTU com base na homologia de sequência com bancos de dados de genes 16S rRNA conhecidos e a abundância relativa de cada OTU é calculada para cada amostra. A tabela OTUs resultante também é usada para quantificar a diversidade populacional dentro e entre as amostras, como medidas de diversidade alfa e beta, respectivamente. (30)

Na análise de *shotgun*, são realizadas análises metagenômicas, metatranscriptômicas e virômicas. Na análise metagenômica, as sequências de DNA obtidas podem ser mapeadas para genomas/genes de referência ou usadas para montagem de novos genomas. Então a abundância relativa dos genomas/genes presentes e o potencial funcional das sequências podem ser avaliados usando bancos de dados anotados funcionais. Além disso, para analisar os genes e espécies ativos do microbioma, a análise metatranscriptômica é aplicada e as sequências de RNA obtidas são mapeadas para genes de referência. Os resultados são usados para identificar os genes e microrganismos ativos. Assim, é determinada a abundância relativa de cada gene/microrganismo ativo no microbioma humano. A montagem de novo de genomas e transcriptomas também pode ser realizada para identificar novos genomas.(30)

Figura 3. Diferentes estratégias de sequenciamento e bioinformática para análise do microbioma humano.



FONTE: S. Bikel, A Valdez-Lara, F Cornejo-Granados, K Rico, S Canizales-Quinteros, X Soberón, L Del Pozo-Yauner, A Ochoa-Levy. Computational and Structural Biotechnology Journal 13 (2015) 390–401. (30)

2.4. Microbioma intestinal humano

O microbioma é o genoma dos microrganismos que compõe a microbiota. O microbioma intestinal humano pode conter mais de 100 vezes o número de genes do nosso genoma (31). Desde intraútero, sugere-se que há uma translocação de produtos microbianos intestinais da mãe para o feto, com papel essencial na maturidade imunológica e, provavelmente, nos fenótipos de crescimento da prole após o nascimento. Bactérias pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Propionibacterium* foram isoladas em culturas de amostras de cordão umbilical e de mecônio, e em alguns estudos, DNA de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* foram identificados em amostras de placenta humana.(32)

A primeira grande exposição do recém-nascido a micróbios acontece durante o parto, e é altamente dependente do tipo de parto. A pele, o intestino e as cavidades oral e nasofaríngea de bebês nascidos por parto vaginal são inicialmente enriquecidas com *Lactobacillus spp*, o que se assemelha a microbiota vaginal materna. Enquanto a pele, boca e intestino de bebês nascidos por cesariana são colonizados por micróbios ambientais e de pele comum como *Staphylococcus*, *Streptococcus* ou *Propionibactérias*. (32)

Durante os primeiros meses de vida a criança recebe nutrientes através do leite materno ou fórmula. A amamentação está associada a inúmeros benefícios para o bebê e para a mãe. Lactentes amamentados em seio materno possuem uma microbiota mais rica em *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* quando comparados aos que recebem exclusivamente fórmula, o que resulta em um conteúdo intestinal mais ácido e mais abundante em ácidos graxos de cadeia curta. Essa redução do pH intestinal serviria como um mecanismo de defesa contra organismos patogênicos comuns. (32)

O leite materno contém uma série de fatores bioativos e imunoestimulantes, que em parceria com a microbiota intestinal, direcionam a maturação morfofisiológica do intestino. Exemplos disso são os oligossacarídeos, presentes em grandes concentrações no colostro, que servem de sítios de ligação para microrganismos benéficos à microbiota, como os da espécie *Bifidobacterium spp*, que reduzem a colonização por possíveis patógenos. Além disto, o leite materno possui bactérias probióticas, principalmente no colostro, com alta diversidade bacteriana (*Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*), mas a quantidade varia entre cada lactante. No leite maduro, principalmente após o primeiro mês de

vida, a taxa do gênero *Staphylococcus* reduz consideravelmente, enquanto os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* continuam em níveis elevados. O tipo de parto também influencia na composição microbiana do leite materno e, assim, mães que realizaram parto cesariano eletivo, parecem ter maior diversidade de microrganismos, porém com depleção dos principais gêneros funcionais, como as bifidobactérias, sugerindo que o trabalho de parto tem influência positiva sobre a diversidade na colonização do leite materno.(33,34)

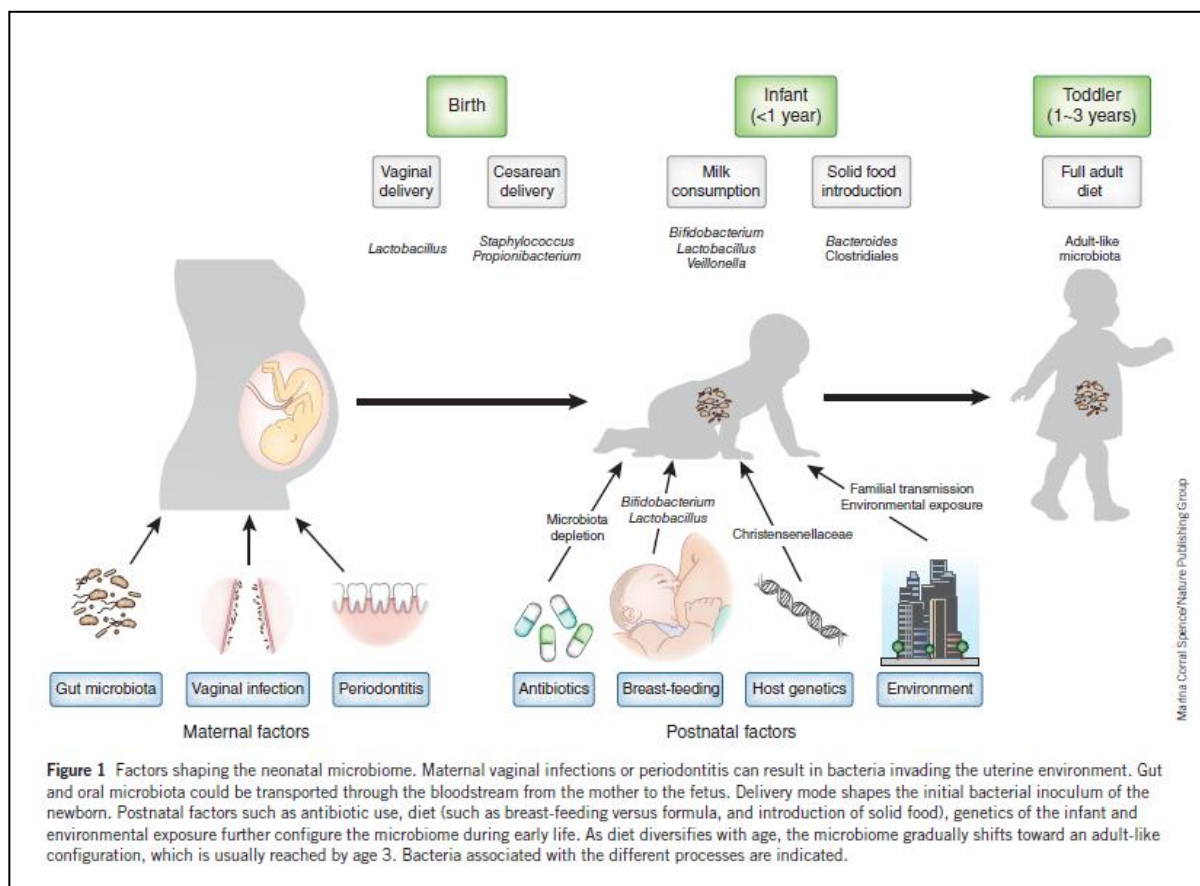
Os primeiros colonizadores da microbiota intestinal, no período neonatal, são tipicamente anaeróbios facultativos (como Proteobactérias), seguidos nos próximos meses pelos anaeróbios obrigatórios, como as *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium*.(33,35,36) Portanto, uma redução na abundância das Proteobactérias é o processo normal esperado como parte da colonização microbiana intestinal, e uma perturbação da colonização deste padrão, pode estar ligado a um risco aumentado de desenvolvimento de doenças neonatais.(36)

Após a amamentação, a introdução de alimentos sólidos inicia um rápido aumento na estrutura e diversidade funcional da microbiota infantil, criando um estado maduro e adulto. Este microbioma maduro é dominado por espécies capazes de degradar glicanos, mucina e carboidratos complexos, bem como realizar a produção de ácidos graxos de cadeia curta.(35)

O estudo GMAP analisou o microbioma intestinal de lactentes no primeiro ano de vida, através do sequenciamento genético rRNA 16S, encontrando uma predominância de Bifidobactérias, *Bacteroides*, Enterobactérias e *Clostridium*. Este estudo encontrou também um predomínio do gênero *Bacteroides* nos lactentes nascidos por parto vaginal quando comparados à cesariana, além de mostrar predomínio de Bifidobactérias nos lactentes que eram amamentados exclusivamente com leite materno.(6)

Outro estudo longitudinal de Jakobsson et al, publicado em 2014, analisou o microbioma de 24 crianças saudáveis, com 1 semana, 1, 3, 6, 12 e 24 meses de idade, através do sequenciamento rRNA 16S. Esse estudo observou uma redução gradual das Proteobactérias de 1 semana a 24 meses. Mostrou também um pico de Actinobactéria aos 3 meses, uma expansão de Firmicutes a partir dos 3 meses, e o surgimento de Verrucomicrobia por volta dos 6 meses. Reitera também uma proporção significativamente maior do filo Bacteroidetes em bebês nascidos de parto vaginal quando comparados aos nascidos por parto cesárea.(37)

Figura 4. Fatores que moldam o microbioma neonatal.



FONTE: Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. Nat Med 22, 713-722 (2016)

2.5. Microbioma intestinal e alergias

O intestino é uma barreira através da qual fatores ambientais interagem com o corpo humano, constituindo um órgão imunológico complexo. Portanto, seu bom funcionamento é essencial para homeostase e diminuição do risco de alergia.(14)

A microbiota do intestino, do sistema respiratório e da pele está interligada com o sistema imunológico, no entanto, os mecanismos moleculares que impedem uma resposta inflamatória deletéria ou que permitem um processo de tolerância, ainda são pouco conhecidos. Acredita-se que os microrganismos intestinais se comuniquem com células imunes em órgãos extra intestinais por diversos mecanismos, modulando localmente células imunes na mucosa, como células dendríticas, ILCs (células linfoides inatas), células T entre outras, que migram do intestino para locais sistêmicos para contribuir com a defesa do hospedeiro, ou através de comunicação neuronal,

atingindo órgãos à distância. Além disso, produzem metabólitos, ligantes de receptores (como os “MAMPs”), neurotransmissores e hormônios que podem atingir a circulação linfática e sanguínea, e conseqüentemente outros órgãos, onde afetam o desenvolvimento e a função das células imunes.(10,38)

Muito provavelmente, estes mecanismos seriam os responsáveis pelo processo de tolerância imunológica, com estímulo antigênico, principalmente por microrganismos não patogênicos após o nascimento, a partir do incremento na resposta linfocitária Th1. Uma redução nesta resposta Th1 dependente, com conseqüente manutenção e incremento da resposta Th2 é encontrada nas crianças de risco para doenças atópicas.(39)

A associação entre o perfil da microbiota intestinal, com predomínio de *Clostridium* e o risco de desenvolvimento de doenças alérgicas, como a dermatite atópica, tem sido relatada. (40) É descrito que em pacientes com esofagite eosinofílica, com FPIAP e FPIES, tem a nível de filo um aumento de Proteobactérias na microbiota, enquanto observamos aumento de Bacteroidetes em controles saudáveis.(41)

A definição de uma microbiota intestinal humana “saudável” ou “normal” ainda é muito preliminar.(34) Em geral, os filos Firmicutes e Bacteroidetes são os predominantes na microbiota intestinal, enquanto as Proteobactéria, Actinobactéria e Verrucomicrobia são menos abundantes.(42)

Vários estudos mostram que um aumento de Proteobactérias no intestino reflete disbiose. Essas bactérias parecem benignas quando estão em menores proporções, mas em certos ambientes intestinais podem desencadear respostas inflamatórias.(36,41,43) Todos esses achados sugerem que a microbiota intestinal parece ter influência na alergia alimentar não IgE-mediada.(41)

Kumagai et al, publicou em 2012 um estudo mostrando a microbiota intestinal de lactentes em aleitamento materno exclusivo que tinham raias de sangue nas fezes. Foram estudadas as fezes de 15 lactentes a termo com raias de sangue e 15 lactentes saudáveis em aleitamento materno exclusivo e comparados os resultados. A microbiota das fezes foi investigada pela análise filogenética combinada com métodos de cultura. O grupo de *Bacteroides fragilis* foi observado mais frequentemente no grupo controle do que nos pacientes ($p < 0,05$). No grupo controle, a espécie predominante pertencente ao grupo das Enterobacteriaceae foi a *Escherichia coli*, enquanto nos pacientes foi a *Klebsiella* ($p < 0,05$), concluindo que o mecanismo

patogênico do sangramento retal pode estar relacionado a diferentes composições da microbiota intestinal.(44)

Muitos relatos sugerem que o transplante fecal parece eficaz no tratamento de doenças associadas com disbiose da microbiota.(41,45) Um estudo publicado no *World Journal of Gastroenterology* em 2017(45), descreve o transplante fecal em pacientes com FPIAP, 17 lactentes tiveram resolução dos sintomas dentro de 2 dias, e não tiveram recidiva nos 15 meses subsequentes. Baseado na análise do microbioma por rRNA 16s em 10 lactentes com FPIAP, a maioria deles teve melhora na diversidade da microbiota após transplante fecal. Como resultado, Proteobactérias diminuíram e Firmicutes aumentaram após o transplante fecal. Em nível de gêneros, *Bacteroides*, *Escherichia* e *Lactobacillus* eram enriquecidos em alguns lactentes com colite alérgica após tratamento com transplante fecal, mas a relativa abundância de *Clostridium*, *Veillonella*, *Streptococcus* e *Klebsiella* diminuíram drasticamente.(45)

Um estudo piloto, realizado em Madri analisou o microbioma de lactentes com cólica, APLV não IgE mediada, proctocolite e saudáveis (controles), através da técnica de sequenciamento massivo do gene 16S rRNA. Nesse estudo, a abundância de *Bifidobacterium* nas fezes de lactentes com APLV não-IgE mediada foi menor que a observada nos outros grupos. Além disso, esses mesmos pacientes tinham maior abundância do gênero *Rothia* e das famílias *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae* e *Eggerthellaceae*.(46)

De Filippis et al publicaram em 2021 um estudo analisando e comparando o microbioma intestinal através do sequenciamento *shotgun*, de crianças com alergias respiratórias e alergias alimentares IgE mediadas com controles saudáveis. Não encontraram diferença nos índices de diversidade microbiana dos alérgicos alimentares com controles. No entanto, as crianças alérgicas apresentaram uma abundância significativamente maior de *Ruminococcus gnavus*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Dialister invisus*, *Anaerostipes hadrus*, várias espécies de *Blautia* e *Parabacteroides*, enquanto apresentavam depleção de *Bifidobacterium longum*, *Bacteroides dorei* e *Bacteroides vulgatus*. Entender a potencial função do microbioma intestinal é primordial para no futuro criar estratégias para o tratamento e prevenção de alergias.(47)

2.6. Calprotectina fecal e alergias alimentares

A calprotectina fecal é uma proteína de ligação de Ca^{2+}/Zn , citosólica que pertence ao grupo de proteínas S-100, encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e macrófagos, e em menor quantidade em linfócitos T e B. Ela possui ações imunomoduladoras, antimicrobianas (pois priva microrganismos de zinco), e antiproliferativas, aumentando em condições como inflamação, infecção e malignidade. É uma proteína secretada extracelularmente por células inflamatórias estimuladas ou liberada por ruptura ou morte celular. Portanto, é um marcador sensível e não invasivo que determina uma inflamação ativa no sistema gastrointestinal de pacientes.(16) A calprotectina fecal é resistente à degradação bacteriana e estável nas fezes à temperatura ambiente por até 7 dias, sendo mensurável a partir de uma amostra pequena de fezes(17).

Nível aumentado de calprotectina fecal sugere a presença de inflamação da mucosa intestinal e, seu papel, na prática clínica, já está bem estabelecido no diagnóstico e seguimento dos pacientes com doença inflamatória intestinal, pois reflete a migração de neutrófilos em direção ao lúmen intestinal na mucosa inflamada, relacionando-se à ativação e ao estado histológico da doença.(16,17)

Valores de referência de calprotectina fecal em lactentes não estão bem estabelecidos. Um estudo chinês publicado em 2015 analisou calprotectina de 288 crianças saudáveis, a termo, de 1 a 18 meses, mostrando calprotectina significativamente maior em lactentes de 1-3meses quando comparados com lactentes 3-6meses (375.2 $\mu\text{g/g}$ vs. 217.9 $\mu\text{g/g}$, $p < 0.001$), bem como maior significativamente no grupo menores de 6meses (média: 282.7 $\mu\text{g/g}$) quando comparados com lactentes entre 6-18meses (média: 114.9 $\mu\text{g/g}$; $p < 0.001$).(48)

O diagnóstico de alergia alimentar não mediada por IgE representa um desafio, especialmente devido à falta de um método diagnóstico com sensibilidade e especificidade adequadas. Dessa forma, busca-se por marcadores para auxiliar neste diagnóstico. Estudos tem demonstrado valores significativamente elevados de calprotectina fecal em lactentes com APLV quando comparados a grupos controles (16,49).

Um estudo realizado no Irã analisou a calprotectina de lactentes menores de 1 ano de idade, em aleitamento materno, com diagnóstico de colite alérgica e dosou calprotectina ao diagnóstico, 2 e 6 semanas após a dieta de exclusão materna.

Mostrou diminuição significativa da calprotectina após a dieta de exclusão, porém não se relacionou significativamente com os sintomas clínicos de diarreia, sangue ou muco nas fezes, concluindo que a calprotectina não é um bom indicador de melhora clínica na colite alérgica.(50)

Uma revisão, que incluiu 1238 crianças, mostrou a heterogeneidade dos estudos correlacionando APLV com calprotectina fecal, incluindo desde lactentes até adolescentes, tanto com alergia IgE mediada quanto não IgE mediada ou mista. Os dados sugeriram que os bebês com APLV apresentavam níveis elevados de calprotectina fecal, particularmente nos grupos de APLV não mediada por IgE. Mostrou também uma diminuição da calprotectina fecal após a dieta de eliminação, porém sem significância estatística. Concluindo que os resultados ainda são contraditórios sobre o papel da calprotectina fecal na previsão de doenças alérgicas.(51)

3. JUSTIFICATIVA

Dada a relevância do microbioma intestinal nas doenças alérgicas e a escassez de estudos através do sequenciamento *shotgun*, conhecer o microbioma na proctocolite alérgica, de forma mais específica, pode nos auxiliar em possíveis intervenções futuras. Além disso, são muito raros os estudos brasileiros de microbioma fecal, especialmente tratando-se do sequenciamento *shotgun*.

A falta de marcadores biológicos para diagnóstico das alergias alimentares não mediadas por IgE ainda gera ansiedade. Buscamos por um marcador diagnóstico, como a calprotectina fecal.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Primário:

Avaliar o microbioma de lactentes portadores de proctocolite alérgica, até 6 meses de idade.

4.2. Objetivos secundários:

1. Estudar o microbioma de lactentes com proctocolite alérgica e comparar com o microbioma de crianças saudáveis da literatura.
2. Quantificar calprotectina fecal em lactentes com proctocolite alérgica
3. Avaliar o papel da calprotectina fecal como marcador para o diagnóstico de crianças portadoras de proctocolite alérgica.

5. HIPÓTESES

Lactentes com proctocolite alérgica apresentam disbiose na microbiota intestinal, com menor diversidade bacteriana e desequilíbrio das cepas predominantes normalmente encontradas em lactentes saudáveis.

Níveis de calprotectina fecal mais elevados nos lactentes com diagnóstico de proctocolite alérgica, do que nos lactentes saudáveis comparados a outros estudos.

6. METODOLOGIA

6.1. Delineamento:

Estudo transversal realizado com amostra por conveniência.

6.2. Desenho amostral:

6.2.1. Pacientes

Amostra consecutiva de 9 pacientes, diagnosticados com proctocolite alérgica, por história clínica de sangue vivo nas fezes, sendo através da avaliação clínica excluídas outras etiologias para o sangramento. Considerando que este estudo avalia o microbioma de pacientes alérgicos, 2 a 4 semanas de dieta poderiam alterar o microbioma, então, as amostras foram coletadas na primeira visita. Os pacientes eram provenientes dos consultórios privados dos gastroenterologistas pediátricos do estudo, na cidade de Porto Alegre.

Sendo esse estudo inédito, não há outros estudos semelhantes para basear o cálculo amostral. Além disso, tendo em vista o alto custo da metodologia envolvida para realização dos testes metagenômicos, foi necessário limitar o número amostral inicial.

Esse estudo encontra-se aninhado a um estudo maior, em dois serviços de Gastroenterologia pediátrica, sendo o nosso no Hospital da Criança Santo

Antônio/Santa Casa de Porto Alegre e o outro no Hospital da Criança José de Alencar de Brasília.

6.2.2. Critérios de inclusão:

- Lactentes em aleitamento materno exclusivo com diagnóstico clínico de proctocolite alérgica, excluindo-se outras etiologias para o sangramento, entre 0 e 6 meses de vida.

6.2.3. Critérios de exclusão:

- Lactentes que não estejam em aleitamento materno exclusivo
- Lactentes que apresentem déficit de crescimento ou neurodesenvolvimento
- Lactentes que estiveram internados por qualquer motivo
- Lactentes que fizeram uso de antibióticos, corticoides e antialérgicos.
- Lactentes que utilizaram inibidor de bomba de prótons e/ou probióticos no mês anterior
- Lactentes com outras comorbidades que poderiam apresentar sangue nas fezes (ex: diarreia aguda, fissura anal).
- Lactentes que apresentem alterações neurológicas
- Pacientes com APLV, com outras formas de apresentação (enteropatia, FPIES, sintomas inespecíficos sem sangramento anal)
- Responsáveis que não aceitaram coletar fezes do lactente para participar do estudo.

6.3. Procedimentos e coleta de dados

O lactente com diagnóstico de proctocolite alérgica foi convidado a participar da pesquisa e, quando de acordo, foi obtido o do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) com o responsável legal do paciente. Nesse momento, foi aplicado o questionário para caracterização individual. Quando não haviam amostras de fezes para coleta no momento da consulta, o responsável levava o kit para coleta domiciliar, antes mesmo do início da dieta. O responsável encaminhava para a pesquisadora as amostras de fezes assim que realizasse a coleta. Parte das amostras foram enviadas para o Laboratório Biogenética, Florianópolis/SC, via transportadora, para análise do

microbioma, e parte foi congelado (-80°C) para análise posterior da calprotectina fecal. As amostras foram coletadas entre setembro de 2022 e agosto de 2023.

Estando esse estudo aninhado ao estudo maior e de dois centros de Gastroenterologia pediátrica, foi coletado leite materno junto com as fezes dos lactentes, para posterior análise dos oligossacarídeos do leite materno (HMO) e sua comparação com o microbioma fecal dos respectivos lactentes.

6.3.1. Avaliação clínica:

Na consulta foi aplicado questionário contendo informações gerais do paciente (sexo, data de nascimento, peso e comprimento atual, cor/raça ou etnia), informações sobre o quadro clínico (sintomas do diagnóstico e idade do início dos sintomas), dados sobre gestação e parto (tipo de parto e uso de antibióticos na gestação, parto e lactação), dados do nascimento (idade gestacional, peso, comprimento, uso de antibióticos pelo lactente antes da alta da maternidade), uso de fórmula em algum momento e história familiar de alergias em parentes de primeiro grau.

6.3.2. Análise de calprotectina fecal:

A amostra de fezes foi colocada em tubos de extração fornecidos pela BÜHLMANN, e armazenados congelados a -80°C em Biofreezers da UFCSPA até o dia anterior a realização da leitura, quando foi deixado a temperatura ambiente (entre 18-28°C).

A calprotectina fecal foi quantificada através de amostra fecal dos pacientes, pelo kit da BÜHLMANN Quantum Blue fCAL extended (Figura 4. A), um teste de diagnóstico *in vitro*, que permite a determinação quantitativa do antígeno da calprotectina mediante um imunoenensaio tipo sanduiche. A membrana do teste é revestida com um anticorpo de captura monoclonal (mAB) altamente específico para a calprotectina. Um segundo anticorpo de detecção monoclonal conjugado com ouro coloidal encontra-se na zona de dispensação e liberta-se quando há adição do extrato diluído da amostra de fezes.

O complexo calprotectina/anti-calprotectina conjugado com ouro coloidal liga-se ao anticorpo monoclonal anti-calprotectina que reveste a membrana do teste (linha T do teste) e o conjugado anti-calprotectina com ouro coloidal livre liga-se ao anticorpo de cabra que reveste a membrana (linha C de controle). As intensidades dos sinais

da linha de teste (T) e de controle (C) são quantificadas pelo BÜHLMANN Quantum Blue® Reader (Figura 4. B).

Os resultados de calprotectina fecal foram descritos quantitativamente em valores até 1.000µg/g, mas não eram quantificados quando excediam este valor, sendo descrito apenas como >1.000µg/g.

Figura 4. Material e aparelho para coleta e análise de calprotectina fecal.

A)



B)



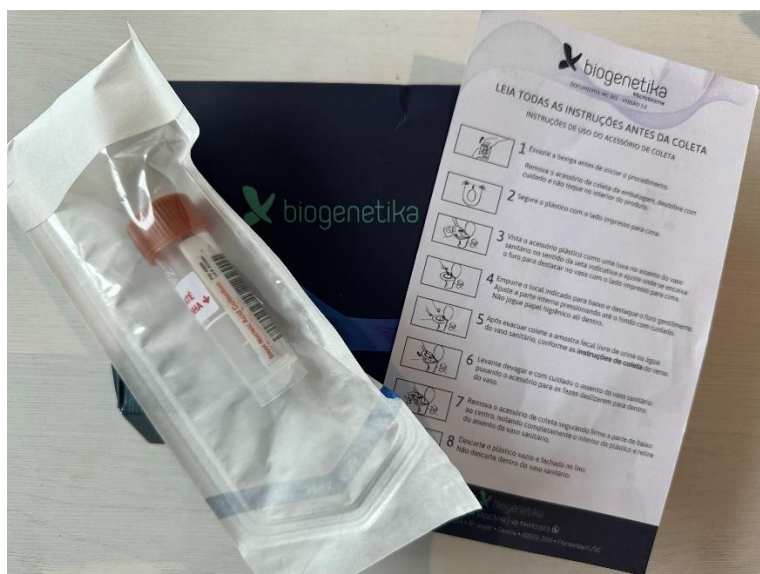
A) Kit BÜHLMANN Quantum Blue fCAL extended, utilizado para coleta e armazenamento de fezes para análise da calprotectina fecal. B) BÜHLMANN Quantum Blue® Reader, aparelho utilizado para quantificar calprotectina fecal da amostra de fezes coletadas.

6.3.3. Sequenciamento e análise do Microbioma Intestinal das amostras obtidas:

Os participantes recebem um kit para coleta de fezes (OMNIgene.GUT da marca DNA Genotek) com as instruções de coleta (Figura 5). As amostras continham cerca de 520 mg de fezes e foram mantidas em temperaturas de 15 a 25 graus Celsius por até 60 dias.

O sequenciamento do material genético da microbiota presente, capturada a partir das amostras de fezes, foi realizado em laboratório específico pertencente à empresa parceira e próprio para tal, através da técnica de Whole genome sequencing shotgun de genomas, utilizando o sequenciador Nexseq500 (Illumina), no Laboratório Biogenética, em Florianópolis/SC.

Figura 5. Kit de coleta de fezes OMNIgene.GUT da marca DNA Genotek, Biogenética



6.3.4. Análise de bioinformática:

As sequências obtidas por sequenciamento shotgun são analisadas por um pipeline desenvolvido pela Biogenética (www.biogenetika.com.br) para identificação e classificação dos microrganismos na amostra analisada. Foram verificados os níveis e estimativas de abundância a nível de filo até espécies e cepas, dos diferentes organismos encontrados. Também foi avaliado o índice de diversidade.

6.3.4.1 Índice de diversidade alfa:

Para estimar a riqueza (S) utilizamos a abordagem não paramétrica de Chao1, (52) que é definida pela seguinte fórmula:

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + n_1^2/2n_2$$

Onde S_{obs} é o número de espécies observadas, n_1 é o número de espécies capturadas apenas uma vez, e n_2 é o número de espécies capturadas duas vezes. (52,53)

Para combinar as medidas de riqueza e abundância utilizamos a diversidade de Shannon, a Diversidade de Simpson e a Dominância de Simpson.

Diversidade de Shannon (H) é representado pela fórmula:

$$-\sum P_i \ln(P_i)$$

Diversidade de Simpson (D1) é representado pela fórmula:

$$1/\sum P_i^2$$

Dominância de Simpson (D2) é representada pela fórmula:

$$1/\sum P_i^2$$

Outro importante ponto de observação da diversidade alfa é a uniformidade. Esta não é calculada de forma independente, mas sim derivada de medidas de diversidade compostas. Utilizamos a uniformidade de Simpson (E) calculada a partir de D2.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram registrados em planilha eletrônica do programa Microsoft Excel. As variáveis quantitativas foram descritas por média e desvio padrão (DP), valores mínimos e valores máximos. Uma medida de tendência central (média) e outras três medidas foram utilizadas para avaliar a dispersão dos dados (DP, valor mínimo e valor máximo). Por outro lado, as variáveis categóricas foram descritas usando frequência absoluta e frequência relativa (proporção). Os dados foram organizados e apresentados por meio de tabelas e gráficos, e as análises estatísticas foram realizadas utilizando a linguagem de programação Python.

8. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto faz parte de um estudo maior, que envolve coleta de dados no município de Porto Alegre/RS e na cidade de Brasília/DF, sendo, portanto, avaliado e aprovado pelo Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital da Criança Santo Antônio e do Hospital da Criança de Brasília José de Alencar, pelo CAAE: 45246021.2.3001.5553.

Este estudo obedece às determinações da Resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde.

9. CONCLUSÕES

O microbioma de lactentes brasileiros com proctocolite alérgica, apesar de apresentar uma diversidade adequada, apresenta disbiose, com aumento de Proteobactérias como *Klebsiella* e *Escherichia* e redução de *Bacteroides* e *Bifidobacterium*. Além de baixa abundância ou até mesmo ausência de bactérias benéficas como *Faecalibacterium prausnitzii*. A calprotectina fecal mostrou-se inespecífica, com valores altos e baixos, na proctocolite alérgica.

A presente amostra dá uma ideia das variações do microbioma e a falta de um padrão específico nos lactentes portadores de proctocolite alérgica. A inespecificidade dos achados talvez demonstre a característica multifatorial da proctocolite alérgica. Ainda se sabe pouco sobre o microbioma de lactentes com proctocolite alérgica, por isso, mais estudos são necessários para saber quais os potenciais efeitos e correlações das inúmeras espécies encontradas. Uma dosagem única de calprotectina não serve para auxiliar no diagnóstico de proctocolite alérgica.

10. REFERÊNCIAS

1. Meyer R, Chebar Lozinsky A, Fleischer DM, Vieira MC, Du Toit G, Vandenplas Y, et al. Diagnosis and management of Non-IgE gastrointestinal allergies in breastfed infants—An EAACI Position Paper. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;75(1):14–32.
2. Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias JA, Heuschkel R, Husby S, et al. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: Espghan gi committee practical guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012 Aug;55(2):221–9.
3. Venter C, Brown T, Meyer R, Walsh J, Shah N, Nowak-Węgrzyn A, et al. Better recognition, diagnosis and management of non-IgE-mediated cow's milk allergy in infancy: IMAP - An international interpretation of the MAP (Milk Allergy in Primary Care) guideline. *Clin Transl Allergy*. 2017;7(1):1–9.
4. Meyer R, Fox AT, Chebar Lozinsky A, Michaelis LJ, Shah N. Non-IgE-mediated gastrointestinal allergies—Do they have a place in a new model of the Allergic March. Vol. 30, *Pediatric Allergy and Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 149–58.
5. Buyuktiryaki B, Kulhas Celik I, Erdem SB, Capanoglu M, Civelek E, Guc BU, et al. Risk Factors Influencing Tolerance and Clinical Features of Food Protein-induced Allergic Proctocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2020;70(5):574–9.
6. Martin VM, Virkud Y V., Dahan E, Seay HL, Itzkovits D, Vlamakis H, et al. Longitudinal disease-associated gut microbiome differences in infants with food protein-induced allergic proctocolitis. *Microbiome*. 2022 Dec 1;10(1).
7. Martin VM, Virkud Y V., Seay H, Hickey A, Ndahayo R, Rosow R, et al. Prospective Assessment of Pediatrician-Diagnosed Food Protein-Induced Allergic Proctocolitis by Gross or Occult Blood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2020 May 1;8(5):1692-1699.e1.
8. Venter C, Meyer RW, Nwaru BI, Roduit C, Untersmayr E, Adel-Patient K, et al. EAACI position paper: Influence of dietary fatty acids on asthma, food allergy, and atopic dermatitis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019;74(8):1429–44.
9. Berni Canani R, De Filippis F, Nocerino R, Paparo L, Di Scala C, Cosenza L, et al. Gut microbiota composition and butyrate production in children affected by non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
10. Bianca ACC Dela, Barreto BAP, Kuschnir FC, Franco JM, Cunha LAO, Pereira RA. O Microbioma e as Doenças Alérgicas. Vol. N° 68, *Documento Científico SBP*. 2023.
11. Akagawa S, Kaneko K. Gut microbiota and allergic diseases in children. Vol. 71, *Allergology International*. Japanese Society of Allergology; 2022. p. 301–9.
12. Savage JH, Lee-Sarwar KA, Sordillo J, Bunyavanich S, Zhou Y, O'Connor G, et al. A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018 Jan 1;73(1):145–52.
13. Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P, et al. Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016 Oct 1;138(4):1122–30.
14. Łoś-Rycharska E, Gołębiewski M, Sikora M, Grzybowski T, Gorzkiewicz M, Popielarz M, et al. A combined analysis of gut and skin microbiota in infants

- with food allergy and atopic dermatitis: A pilot study. *Nutrients*. 2021 May 1;13(5).
15. Skypala IJ, Venter C, Meyer R, Dejong NW, Fox AT, Groetch M, et al. The development of a standardised diet history tool to support the diagnosis of food allergy. *Clin Transl Allergy*. 2015;5(1).
 16. Beşer ÖF, Sancak S, Erkan T, Kutlu T, Çokuğraş H, Cokuğraş FÇ. Can fecal calprotectin level be used as a markers of inflammation in the diagnosis and follow-up of cow's milk protein allergy? *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014;6(1):33–8.
 17. Sipponen T, Kolho KL. Fecal calprotectin in diagnosis and clinical assessment of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2014;50(1):74–80.
 18. Brar KK, Lanser BJ, Schneider A, Nowak-Węgrzyn A. *Biologics for the Treatment of Food Allergies*. Vol. 40, Immunology and Allergy Clinics of North America. W.B. Saunders; 2020. p. 575–91.
 19. Calvani M, Anania C, Cuomo B, D'auria E, Decimo F, Indirli GC, et al. Non-IgE-or mixed IgE/non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in the first years of life: Old and new tools for diagnosis. Vol. 13, *Nutrients*. MDPI AG; 2021. p. 1–31.
 20. Vandenplas Y, Broekaert I, Domellöf M, Indrio F, Lapillonne A, Pienar C, et al. An ESPGHAN Position Paper on the Diagnosis, Management, and Prevention of Cow's Milk Allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2024 Feb 1;78(2):386–413.
 21. Caubet JC, Szajewska H, Shamir R, Nowak-Węgrzyn A. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in children. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2017;28(1):6–17.
 22. Silva LR, Solé D, Silva CAA, Constantido CF, Liberal EF. *Tratado de Pediatria*. 5th ed. Vol. 1. Manole; 2021. 1343–1356 p.
 23. Leonard SA, Nowak-Węgrzyn A. Food Protein–Induced Enterocolitis Syndrome. *Pediatr Clin North Am*. 2015 Dec;62(6):1463–77.
 24. Nowak-Węgrzyn A, Chehade M, Groetch ME, Spergel JM, Wood RA, Allen K, et al. International consensus guidelines for the diagnosis and management of food protein–induced enterocolitis syndrome: Executive summary—Workgroup Report of the Adverse Reactions to Foods Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017 Apr 1;139(4):1111-1126.e4.
 25. Sampson HA, Aceves S, Bock SA, James J, Jones S, Lang D, et al. Food allergy: A practice parameter update—2014. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014 Nov;134(5):1016-1025.e43.
 26. Schmidt TSB, Raes J, Bork P. *The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation*. Vol. 172, Cell. Cell Press; 2018. p. 1198–215.
 27. Stearns JC, Simioni J, Gunn E, McDonald H, Holloway AC, Thabane L, et al. Intrapartum antibiotics for GBS prophylaxis alter colonization patterns in the early infant gut microbiome of low risk infants. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
 28. Filardo S, Di Pietro M, Sessa R. Current progresses and challenges for microbiome research in human health: a perspective. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14.
 29. McAllister TA, Dunière L, Drouin P, Xu S, Wang Y, Munns K, et al. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. Vol. 101, *Journal of Dairy Science*. Elsevier Inc.; 2018. p. 4060–74.
 30. Bikel S, Valdez-Lara A, Cornejo-Granados F, Rico K, Canizales-Quinteros S, Soberón X, et al. Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics

- to explore novel microbial interactions: Towards a systems-level understanding of human microbiome. Vol. 13, Computational and Structural Biotechnology Journal. Elsevier B.V.; 2015. p. 390–401.
31. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* (1979). 2005;307(5717):1915–20.
 32. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: Implications for health outcomes. Vol. 22, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group; 2016. p. 713–22.
 33. Microbioma e Doenças alérgicas SBP.
 34. van den Elsen LWJ, Garssen J, Burcelin R, Verhasselt V. Shaping the gut microbiota by breastfeeding: The gateway to allergy prevention? Vol. 7, *Frontiers in Pediatrics*. Frontiers Media S.A.; 2019.
 35. Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ. The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. Vol. 27, *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2019. p. 131–47.
 36. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Vol. 33, *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2015. p. 496–503.
 37. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut*. 2014;63(4):559–66.
 38. Schlechte J, Skalosky I, Geuking MB, McDonald B. Long-distance relationships - regulation of systemic host defense against infections by the gut microbiota. Vol. 15, *Mucosal Immunology*. Springer Nature; 2022. p. 809–18.
 39. Holloway JW, Prescott SL. Key Concepts. In: *Middleton's Allergy Essentials*. Elsevier; 2017. p. 29–50.
 40. Penders J, Gerhold K, Stobberingh EE, Thijs C, Zimmermann K, Lau S, et al. Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;132(3).
 41. Mennini M, Fierro V, Di Nardo G, Pecora V, Fiocchi A. Microbiota in non-IgE-mediated food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2020;20(3):323–8.
 42. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* (1979). 2005;307(5717):1915–20.
 43. Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol*. 2011;12(5).
 44. Kumagai H, Maisawa S, Ichi, Tanaka M, Takahashi M, Takasago Y, Nishijima A, et al. Intestinal microbiota and secretory immunoglobulin A in feces of exclusively breast-fed infants with blood-streaked stools. *Microbiol Immunol*. 2012;56(10):657–63.
 45. Liu SX, Li YH, Dai WK, Li XS, Qiu CZ, Ruan ML, et al. Fecal microbiota transplantation induces remission of infantile allergic colitis through gut microbiota re-establishment. *World J Gastroenterol*. 2017;23(48):8570–81.
 46. Aparicio M, Alba C, Rodríguez JM, Fernández L. Microbiological and immunological markers in milk and infant feces for common gastrointestinal disorders: A pilot study. *Nutrients*. 2020;12(3).
 47. De Filippis F, Paparo L, Nocerino R, Della Gatta G, Carucci L, Russo R, et al. Specific gut microbiome signatures and the associated pro-inflammatory functions are linked to pediatric allergy and acquisition of immune tolerance. *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1).

48. Li F, Ma J, Geng S, Wang J, Liu J, Zhang J, et al. Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months. *PLoS One*. 2015 Mar 5;10(3).
49. Belizón CT, Páez EO, Claros AFM, Sánchez IR, González AR, Medialdea RV, et al. Calprotectina fecal como apoyo al diagnóstico en la alergia a las proteínas de leche de vaca no IgE mediada. *An Pediatr (Engl Ed)*. 2016;84(6):318–23.
50. Atae P, Zoghali M, Nikkhoo B, Ghaderi E, Mansouri M, Nasiri R, et al. Diagnostic value of fecal calprotectin in response to mother's diet in breast-fed infants with cow's milk allergy colitis. *Iran J Pediatr*. 2018 Aug 1;28(4).
51. Xiong LJ, Xie XL, Li Y, Deng XZ. Current status of fecal calprotectin as a diagnostic or monitoring biomarker for cow's milk protein allergy in children: a scoping review. *World Journal of Pediatrics [Internet]*. 2020;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s12519-020-00364-2>
52. Chao A. Non-parametric estimation of the classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*. 1984 Jan;11:265–70.
53. Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJM. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Oct;67(10):4399–406.

11. ANEXOS

11.1. Artigo Científico:

Gut Microbiome by shotgun and fecal calprotectin in food protein-induced allergic proctocolitis infants

Short title: Gut Microbiome and fecal calprotectin in FPIAP infants

Authors: Caroline M Dias ^a, Carolina S da Silva ^b, Isadora C Trevizoli ^c, Vanessa A Scheffer ^d, Cíntia Steinhaus ^e, Melina U Melere ^f, Luiza S Nader ^g, Matias Epifânio^h, Elisa de Carvalho ⁱ, Cristina H T Ferreira ^j

Authors' most important titles:

^a Master's student in Pediatrics: Child and Adolescent Health Care - Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA).

^b Master's Degree in Pediatrics: Child and Adolescent Health Care - Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA).

^c Pediatric gastroenterologist of Childrens Hospital of Brasília José Alencar.

^d Master in Child and Adolescent Health – Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)

^e Master's student in Pediatrics: Child and Adolescent Health Care - Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA).

^f Master's Degree in Hepatology from the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)

^g Master's Degree in Pediatrics: Child and Adolescent Health Care - Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)

^h PhD in Medicine Pediatrics and Child Health - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS).

ⁱ PhD in Health Sciences – University of Brasilia (UnB)

^j PhD in Gastroenterology - Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS).

Authors' full affiliation:

a, b, d, e, f, g, h, j Pediatric gastroenterologists, Department of Pediatrics at Childrens Hospital Santo Antônio, Hospital Complex Santa Casa of Porto Alegre. Porto Alegre/ Brazil.

c, i Pediatric gastroenterologists, Department of Pediatrics, Childrens Hospital of Brasília José Alencar. Brasília/Brazil

Institution to which the work is linked:

Postgraduate Program in Pediatrics: Child and Adolescent Health Care at the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Children's Hospital Santo Antônio - Hospital Complex Santa Casa de Porto Alegre, Department of Pediatric Gastroenterology, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Children's Hospital of Brasília José Alencar - Department of Pediatrics. Brasília, Federal District/Brazil

E-mail address

^a cmontagnerdias@gmail.com

^b carolina.soaresdasilva@yahoo.com.br

^c ct.isadora@gmail.com

^d vanessascheeffe@gmail.com

^e cintiasteinhaus@yahoo.com.br

^f mel_melere@hotmail.com

^g luizasnader@gmail.com

^h mepifanino@hotmail.com

ⁱ elisacarvalho@terra.com.br

^j targaferreira@gmail.com

Authors' Lattes curriculum vitae:

^a <http://lattes.cnpq.br/2490081404734831>

^b <http://lattes.cnpq.br/8837791065795940>

^c <http://lattes.cnpq.br/5777086195694309>

^d <http://lattes.cnpq.br/2416397773800243>

^e <http://lattes.cnpq.br/5142484906359279>

f <http://lattes.cnpq.br/7191828506219258>

g <http://lattes.cnpq.br/1852806803791839>

h <http://lattes.cnpq.br/1494056177695268>

i <http://lattes.cnpq.br/0863312674260460>

j <http://lattes.cnpq.br/9939169812873038>

ORCID:

a 0009-0001-7737-6079

b 0000-0003-0155-7057

c 0000-0003-1462-6859

d 0000-0001-8913-7377

e 0000-0002-9933-0821

f 0000-0003-2611-3161

g 0000-0001-7803-1964

h 0000-0002-7676-8513

i 0000-0002-5079-5011

j 0000-0002-9899-9478

Each author's specific contribution to the study:

a preparing the research project, data collection, preparing the database, extracting and analyzing the data, and article's writing.

b preparing the research project, collecting data, preparing the database

c preparing the research project

d data collection

e data collection

f data collection

g data collection

h data collection and review of the article's writing

i preparing the research project

j preparing the research project, data collection, guidance in all stages of the research and reviewing the article's writing.

Conflict of interest: None to declare

Author for correspondence:

Caroline Montagner Dias. E-mail: cmontagnerdias@gmail.com Address: Hospital da Criança Santo Antônio do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, andar M1 sala da Gastropediatria. Rua Professor Annes Dias, 295. Centro Histórico, Porto Alegre/RS – Brasil. CEP: 90020-090. Telephone: +55 (51) 993530392

Financial support: Partly funded by the Danone Nutricia Research Grant and Pensi Institute.

Total word count of text: 2.861

Total word Count of summary: 227

Number of tables and figures: 4

ABSTRACT:

Objectives: to understand the microbiome of infants with allergic proctocolitis induced by food protein, and to quantify fecal calprotectin to evaluate it as a diagnostic marker for allergic proctocolitis.

Methods: This was a cross-sectional study analyzing the stools of infants under 6 months of age, exclusively breastfed, diagnosed with allergic proctocolitis for having blood in their stools, with no other comorbidities, and excluding other causes of bleeding. The fecal microbiome was analyzed by shotgun sequencing and fecal calprotectin by immunoassay.

Results: Nine full-term infants between 27 and 133 days old were included. Four infants had fecal calprotectin higher than 1,000 $\mu\text{g/g}$, while one infant had calprotectin of 172 $\mu\text{g/g}$. The alpha diversity assessed by the Shannon index was normal. All the infants had bacteria of the phyla Firmicutes (average 28.5%), Proteobacteria (average 55.4%), Bacteroidetes (average 7.4%) and Actinobacteria (average 6.9%). *Clostridium* was the most prevalent genus, present in 8 of the 9 infants (average 14.4%). *Klebsiella* was present in 7 infants, with a mean of 17.0% (SD14.8), and the species found were *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella aerogenes*. Four of the nine infants in the study did not have the *Bifidobacterium* and *Bacteroides* genus.

Conclusion: Infants with allergic proctocolitis show dysbiosis, despite having adequate diversity, with an increase in Proteobacteria such as *Klebsiella* and a reduction in *Bacteroides* and *Bifidobacterium*. Calprotectin was non-specific, with high and low values in allergic proctocolitis.

Keywords: infants; food allergy; gut microbiome; shotgun sequencing

INTRODUCTION

Food allergy results from a specific immune response, which is reproducible to exposure to a particular food.(1) There has been a significant increase in the number of children with food allergies over the last two decades, reaching epidemic levels, according to the World Health Organization (WHO).(1,2) Food protein-induced allergic proctocolitis is a commonly recognized form of non-IgE-mediated food allergy in early childhood, with a prevalence of up to 17%, according to the US prospective cohort study GMAP (Gastrointestinal Microbiome and Allergic Proctocolitis).(3)

The pathogenesis of food allergy is not yet fully understood, but there is a growing amount of evidence that the intestinal microbiota plays a fundamental role in its development.(4,5) Possible reasons suggested for this increase are sociocultural and demographic conditions, the route of delivery, the use of antibiotics and other medications, and nutritional factors.(4,6)

The intestinal microbiota is the set of microorganisms that resides in the human gastrointestinal tract, composed in number and diversity. Evidence suggests that epigenetic changes to the microbiome can be replicated transgenerationally.(7) The microbiota plays an important role in maintaining the health of the host. A complex conversation between the intestinal microbiota, food antigens, intestinal inflammation, and the innate immune system contributes to the acquisition of healthy tolerance or the development of food allergy.(6) Recent advances in next-generation sequencing methods have revealed the presence of dysbiosis in patients with allergic diseases.(8) In fact, prospective studies have revealed dysbiosis even before the onset of allergic disease, suggesting that this alteration in the microbiota is probably one of the causes of allergic diseases.(5,6,8,9)

The first colonizers of the intestinal microbiota in the neonatal period are typically facultative anaerobes (such as Proteobacteria), followed in the next 6 months by obligate anaerobes such as *Bifidobacterium*, *Bacteroides* and *Clostridium*.(4,7,10) A reduction in the abundance of Proteobacteria is the normal process expected as part of intestinal microbial colonization, and a disturbance of this pattern may be linked to an increased risk of developing diseases.(10)

The diagnosis of non-IgE-mediated food allergy represents a challenge, especially due to the lack of a diagnostic method with adequate sensitivity and specificity. In the search for markers, fecal calprotectin appears as a possibility, since

it is a protein found predominantly in neutrophils, monocytes, and macrophages and reflects the presence of inflammation of the intestinal mucosa. Its role is already well-established in patients with inflammatory bowel disease.(11,12)

The consensus that guide clinical practice emphasize the need for exclusion testing of the allergen for a certain period and after reintroduction of the allergen for diagnostic confirmation of food allergy.(13) However, some studies show that this is often not the case in clinical practice, with an empirical restriction of the diet, with the allergen only being reintroduced at around 1 year of age. (3)

This study aims to understand the microbiome of infants with food protein-induced allergic proctocolitis, to compare the microbiome of infants with allergic proctocolitis with the literature, and to quantify fecal calprotectin in these infants.

METHODS

Stool analysis of infants under 6 months of age, exclusively breastfed, diagnosed with food protein-induced allergic proctocolitis. The patients came from the private practices of pediatric gastroenterologists in the city of Porto Alegre. The collection took place between September 2022 and August 2023.

The diagnosis of allergic proctocolitis was made through clinical criteria based on blood in the stool, with no other causes for the bleeding. Considering that this study evaluates the microbiome of allergic patients, 2 to 4 weeks of diet could lead to changes in the microbiome, so the sample was taken at the very first visit.

Were excluded from the study: infants with growth deficits, neurodevelopmental or neurological alterations, infants who had been hospitalized for any reason, who had used antibiotics, corticoids, antiallergic drugs or proton pump inhibitors, infants with other comorbidities who could present with blood in the stool (e.g. acute diarrhea, anal fissure), other presentations of food allergy (e.g. enteropathy, FPIES, eosinophilic esophagitis, or nonspecific symptoms...), guardians of infants who have not agreed to collect stool from the infant.

Data collection procedure:

Infants diagnosed with allergic proctocolitis were invited to take part in the study and, when they agreed, a free and informed consent form (FICF) was obtained from the patient's legal guardian. At this point, the questionnaire for individual

characterization was applied. Stool samples were taken during the consultation, when available. When this wasn't possible, the person responsible took the kit with the guidelines for home collection with them before the diet began. The researcher would pick up the stool samples as soon as they had been collected, and then send part of the samples to the Biogenética Laboratory, Florianópolis/SC, via courier, for analysis of the microbiome, and part would be frozen in biofreezers (-80°C) for later analysis of fecal calprotectin.

Fecal calprotectin analysis:

The stool sample was placed in extraction tubes supplied by BÜHLMANN, and stored frozen at -80°C, as instructed by the manufacturer, in UFCSPA Biofreezers until the day before the reading, when it was left at room temperature (between 18-28°C).

Fecal calprotectin was quantified using the BÜHLMANN Quantum Blue fCAL extended kit, an *in vitro* diagnostic test, which allows quantitative determination of the calprotectin antigen using a sandwich immunoassay.

Calprotectin results are quantified by the BÜHLMANN Quantum Blue® Reader, and described in quantitative values up to 1,000µg/g, but not quantified when they exceed this value.

Analysis of the fecal microbiome

Participants received a stool collection kit (OMNIgene.GUT from DNA Genotek) with collection instructions. The samples contained around 520 mg of stools and were kept at temperatures of 15 to 25°C.

The sequencing of the genetic material of the microbiota present was carried out in a specific laboratory using the Whole genome sequencing shotgun technique, using the Nexseq500 sequencer (Illumina), at the Biogenética Laboratory, in Florianópolis/SC.

The sequences obtained by sequencing shotgun are analyzed by a pipeline developed by Biogenética (www.biogenetika.com.br) to identify and classify the microorganisms in the sample analyzed. The levels and abundance estimate from phylum to species level of the different organisms found were verified. The diversity index was also evaluated.

STATISTICAL ANALYSIS

The data collected was recorded in a Microsoft Excel spreadsheet. The quantitative variables were described using the mean, standard deviation (SD), minimum value, and maximum value. A measure of central tendency (mean) and three other measures were used to assess the dispersion of the data (SD, minimum value and maximum value). On the other hand, categorical variables were described using absolute frequency (count) and relative frequency (proportion). The data was organized and presented using tables and graphs, and statistical analyses were carried out using the Python programming language.

ETHICAL ASPECTS:

All procedures were approved by the Research Ethics Committee of the Santo Antônio Children's Hospital/Santa Casa de Porto Alegre/RS, under CAAE: 45246021.2.3001.5553. This study complies with Resolution 466/2012 of the National Health Council.

RESULTS

General characteristics:

The study included 9 infants under 6 months of age, exclusively breastfed, born at term, with no health problems and who had never been hospitalized. Four (44.4%) of them were taking vitamin A+D.

The average age of the patients was 87 days, ranging from 22 to 133 days. Four patients (44.4%) were under 3 months old and another 5 patients (55.6%) were between 3 and 6 months old.

All the infants had blood in their stools, as this was a diagnostic criterion for allergic proctocolitis. The signal that was most associated was the presence of mucus in the stool (N8 – 88.9%), followed by colic and irritability which were present in 6 infants (66.7%). Perineal rash and gas appeared in 4 infants (44.4%) while vomiting and diarrhea in only 3 infants (33.3%). None of them had skin lesions or dermatitis at diagnosis.

Table 1. Characterization of the sample of patients with allergic proctocolitis

Variables	N (%)
Female gender	8 (88.9%)
Male gender	1 (11.1%)
Skin color / Race (white)	9 (100%)
Type of delivery (vaginal)	4 (44.4%)
Type of delivery (cesarean section)	5 (55.6%)
Maternal use of antibiotics during pregnancy	0 (0%)
Maternal use of antibiotics during delivery	1 (11.1%)
Maternal use of antibiotics while breastfeeding	5 (55.6%)
Use of infant formula ^a	4 (44.4%)
Family history of food allergy ^b	2 (22.2%)
Family history of atopic dermatitis ^b	5 (55.6%)
Family history of allergic rhinitis ^b	6 (66.7%)
Family history of asthma ^b	2 (22.2%)

^a Isolated consumption of infant formula at some point since birth

^b Family history of a first-degree relative (parents or siblings)

N- Absolute number of patients

Fecal calprotectin

Fecal calprotectin varied greatly, with 4 of the 9 infants having values above 1,000 µg/g, 3 of them over 3 months old. Only 1 infant had a lower dosage of 172 µg/g. The other 4 infants in the study had values of 653, 477, 770 and 871 µg/g.

Gut microbiome

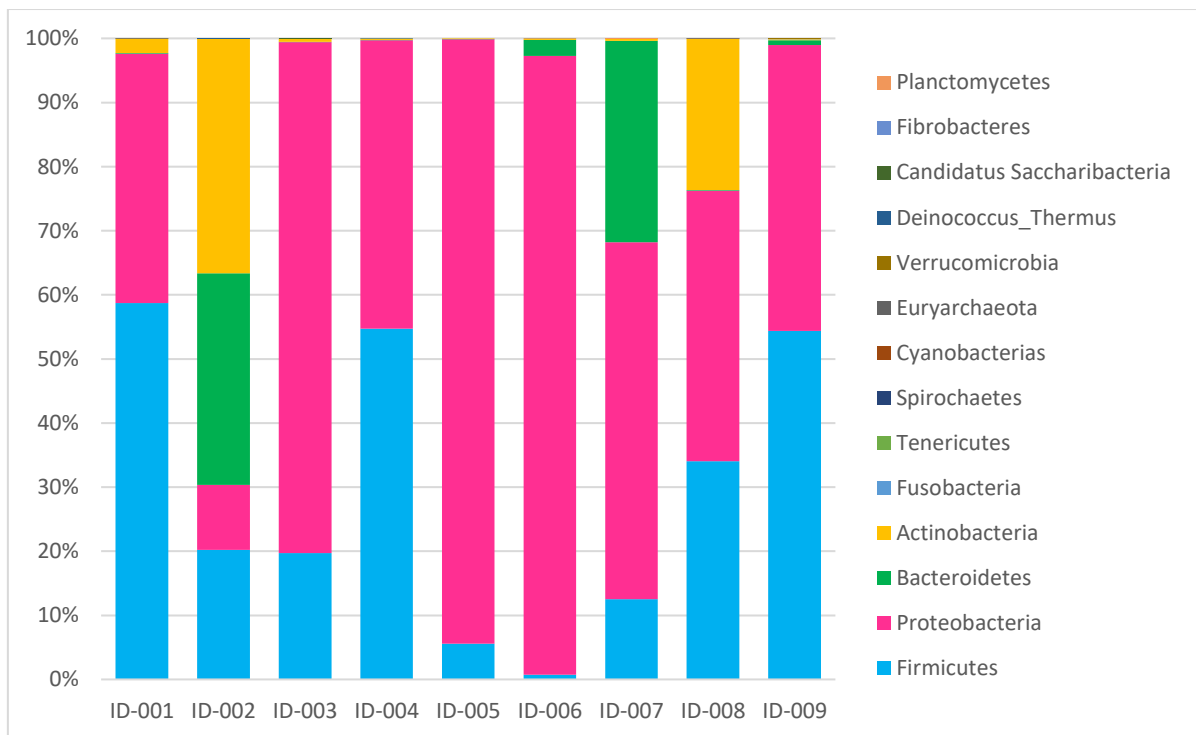
The alpha diversity index of the microbiome (calculated using the Shannon index) ranged from 1.6 to 3.7, with an average of 2.6 and a standard deviation of 0.5. These results are within the range of good to high diversity of the microbiota.

Microbiome - Phylum:

A total of 14 different phyla were found among the 9 infants, with an average of 7 phyla (SD 2), with a minimum of 4 and a maximum of 10 phyla per infant. All the infants had bacteria from the phyla Firmicutes (mean 28.5% - SD 21.9; min 0.7 – max 57.5), Proteobacteria (mean 55.4, SD 28.1; min 9.9 – max 94.6), Bacteroidetes (mean

7.4, SD 13.8; min 0.04 – max 32.5) and Actinobacteria (mean 6.9, SD 13.2; min 0.08 – max 36.0), while the phyla Fusobacteria, Spirochaetes and Cyanobacteria were present in 6 of the 9 infants, with very low abundances ($\leq 0.03\%$). In short, most infants had a predominance of Proteobacteria, suggesting dysbiosis, as do other studies that report an increase in Proteobacteria as a reflection of dysbiosis.(10) Graph 1 shows the distribution of relative abundance by phylum and by sample.

Graph 1: Distribution of relative abundance by phyla and by samples of the Gut Microbiome of infants analyzed by sequencing shotgun, showing an increase in Proteobacteria.



Microbiome – Genus

The genus included in the analysis were those with an abundance greater than 0.5%. Thus, 22 genus were found among the 9 patients, varying between 4 and 11 genus per individual, and are described in Table 2.

Table 2: Genus identified with abundance greater than 0.5% in the fecal microbiome of 9 infants with allergic proctocolitis

Genus	N (%) - mean (SD; Min - Max)
- <i>Clostridium</i>	8 (88.9%) - 14.4 (11.9; 0.9 – 33.3)
- <i>Klebsiella</i>	7 (77.8%) - 17.0 (14.8; 0.6 – 42.3)
- <i>Streptococcus</i>	6 (66.7%) - 7.2 (9.2; 0.6 – 22.4)
- <i>Citrobacter</i>	6 (66.7%) - 7.8 (13.1; 1.0 – 34.2)
- <i>Escherichia</i>	4 (44.4%) - 15.0 (9.4; 4.1 – 23.5)
- <i>Veillonella</i>	4 (44.4%) - 5.2 (5.0; 1.1 – 12.5)0
- <i>Bifidobacterium</i>	3 (33.3%) - 19.2 (16.5; 1.2 – 33.8)
- <i>Bacteroides</i>	3 (33.3%) - 18.7 (14.3; 2.1 – 27.3)
- <i>Enterobacter</i>	3 (33.3%) - 2.5 (3.4; 0.5 – 6.4)
- <i>Haemophilus</i>	3 (33.3%) - 1.2 (0.8; 0.5 – 2.2)
- <i>Raoultella</i>	3 (33.3%) - 0.7 (0.2; 0.5 – 1.01)
- <i>Enterococcus</i>	2 (22.2%) - 0.7 (0.02; 0.65 – 0.68)
- <i>Pseudoalteromonas</i>	2 (22.2%) - 0.6 (0.07; 0.6 – 0.7)
- <i>Hungatella</i>	1 (11.1%) - 34.6 (N/A; 34.6 – 34.6)
- <i>Kluyvera</i>	1 (11.1%) - 21.0 (N/A; 21.0 – 21.0)
- <i>Stenotrophomonas</i>	1 (11.1%) - 11.9 (N/A; 11.9 – 11.9)
- <i>Mediterraneibacter</i>	1 (11.1%) - 11.2 (N/A; 11.2 – 11.2)
- <i>Salmonella</i>	1 (11.1%) - 1.05 (N/A; 1.05 – 1.05)
- <i>Pseudomonas</i>	1 (11.1%) - 0.9 (N/A; 0.9 – 0.9)
- <i>Serratia</i>	1 (11.1%) - 0.72 (N/A; 0.72 – 0.72)
- <i>Parabacteroides</i>	1 (11.1%) - 0.6 (N/A; 0.6 – 0.6)
- <i>Prevotella</i>	1 (11.1%) - 0.5 (N/A; 0.5 – 0.5)

N- The absolute number of patients with a given genus

Mean: Average abundance of genus found among patients

SD – Standard Deviation

Min – minimum value found among patients

Max – maximum value found among patients

N/A – Not Applicable

Microbiome – Species

The species found in an abundance of more than 0.5% in the fecal microbiome of the 9 infants are described in Table 3. Each patient had between 10 and 24 different species.

Of the bacteria found in an abundance of less than 0.5%, *Faecalibacterium prausnitzii* stands out, which is described as one of the most abundant species found in the colon of healthy humans, representing more than 5% of the intestinal bacterial population.(14) In the present study, 7 of the 9 infants had *Faecalibacterium prausnitzii* in their microbiome, but with very low abundances, ranging from 0.01 to 0.02%.

Hungatella hathewayi was present in one infant in increased abundance, with 34.6%, but another 6 infants also had this bacterium in low proportions such as 0.01 to 0.02%.

Table 3. Species found in an abundance greater than 0.5% in the fecal microbiome of 9 infants with allergic proctocolitis.

Species	N (%) - mean (SD; Min - Max)
- <i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (11.1%) – 1.6 (N/A)
- <i>Bacteroides fluxus</i>	1 (11.1%) – 0.7 (N/A)
- <i>Bacteroides fragilis</i>	1 (11.1%) – 1.8 (N/A)
- <i>Bacteroides stercoris</i>	1 (11.1%) – 0.6 (N/A)
- <i>Bacteroides uniformis</i>	2 (22.2%) – 18.3 (0.6; 17.9 – 18.7)
- <i>Bifidobacterium animalis</i>	1 (11.1%) – 1.1 (N/A)
- <i>Bifidobacterium breve</i>	2 (22.2%) – 2.4 (0.4; 2.1 – 2.7)
- <i>Bifidobacterium longum</i>	2 (22.2%) – 12.8 (2.1; 11.4 – 14.4)
- <i>Bifidobacterium saguini</i>	2 (22.2%) – 0.8 (0.2; 0.7 – 0.9)
- <i>Citrobacter freundii</i>	2 (22.2%) – 2.6 (3.0; 0.5 – 4.8)
- <i>Citrobacter koseri</i>	2 (22.2%) – 15.8 (16.1; 2.4 – 29.1)
- <i>Clostridium botulinum</i>	6 (66.7%) – 10.2 (10.2; 0.5 – 28.0)
- <i>Clostridium butyricum</i>	2 (22.2%) – 5.8 (1.8; 4.5 – 7.03)
- <i>Clostridium neonatele</i>	2 (22.2%) – 4.1 (1.9; 2.7 – 5.4)
- <i>Clostridium perfringens</i>	5 (55.6%) – 2.5 (1.5; 1.5 – 5.1)
- <i>Clostridium sp.</i>	1 (11.1%) – 3.9 (N/A)
- <i>Enterobacter asburiae</i>	1 (11.1%) – 0.7 (N/A)

- <i>Enterobacter cloacae</i>	1 (11.1%) – 3.23 (N/A)
- <i>Enterococcus faecalis</i>	2 (22.2%) – 0.54 (0.04; 0.51 – 0.57)
- <i>Erwinia teleogrylli</i>	1 (11.1%) – 0.5 (N/A)
- <i>Escherichia coli</i>	4 (44.4%) – 15.0 (9.4; 4.2 – 23.5)
- <i>Haemophilus influenzae</i>	3 (33.3%) – 0.8 (0.9; 0.5 – 1.8)
- <i>Hungatella hathewayi</i>	1 (11.1%) – 34.6 (N/A)
- <i>Klebsiella aerogenes</i>	3 (33.3%) – 9.8 (15.7; 0.5 – 28.0)
- <i>Klebsiella oxytoca</i>	4 (44.4%) – 3.9 (4.0; 0.5 – 8.7)
- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6 (66.7%) - 9.9 (9.4; 0.6 – 26.5)
- <i>Kluyvera ascorbata</i>	1 (11.1%) – 17.9 (N/A)
- <i>Kluyvera intermedia</i>	1 (11.1%) – 0.54 (N/A)
- <i>Leclercia adecarboxylata</i>	1 (11.1%) – 0.64 (N/A)
- <i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	2 (22.2%) – 0.6 (0.08; 0.59 – 0.70)
- <i>Raoultella ornithinolytica</i>	3 (33.3%) – 0.77 (0.22; 0.58 – 1.01)
- <i>Ruminococcus gnavus</i>	1 (11.1%) – 10.9 (N/A)
- <i>Salmonella bongori</i>	1 (11.1%) – 0.84 (N/A)
- <i>Serratia ficaria</i>	1 (11.1%) – 0.61 (N/A)
- <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1 (11.1%) – 11.2 (N/A)
- <i>Streptococcus equinus</i>	2 (22.2%) – 3.2 (3.3; 0.9 – 5.6)
- <i>Streptococcus parasanguinis</i>	1 (11.1%) – 0.67 (N/A)
- <i>Streptococcus salivarius</i>	2 (22.2%) – 4.9 (3.9; 2.2 – 7.7)
- <i>Streptococcus sp.</i>	1 (11.1%) – 0.5 (N/A)
- <i>Streptococcus thermophilus</i>	1 (11.1%) – 0.7 (N/A)
- <i>Veillonella dispar</i>	1 (11.1%) – 0.5 (N/A)
- <i>Veillonella parvula</i>	4 (44.4%) – 2.5 (2.9; 0.59 – 6.97)
- <i>Veillonella sp.</i>	1 (11.1%) – 0.51 (N/A)

N- Absolute number of patients with a given species

Mean: Average abundance of species found among patients

SD – Standard Deviation

Min – minimum value found among patients

Max – maximum value found among patients

N/A – Not Applicable

DISCUSSION

The present study analyzed the microbiome using sequencing shotgun in infants with food protein-induced allergic proctocolitis, and identified a dysbiosis with an increase in Proteobacteria such as *Klebsiella*, associated with a low abundance or even absence of healthy bacteria such as *Faecalibacterium prausnitzii*. In addition, fecal calprotectin did not prove to be specific, despite the small sample size.

Perinatal antibiotic use in this study occurred in 66.7% of infants, only maternal use, where 55.6% were used during breastfeeding and 11.1% during delivery. In the GMAP prospective cohort by Martin et al (3), the use of antibiotics was not a risk factor for allergic proctocolitis, however, other studies have shown dysbiosis in infants when the mother uses antibiotics intrapartum. (15,16)

Isolated consumption of infant formula at some point since birth was present in 44.4% of patients, which is slightly more prevalent than in the multicenter study by Buyuktiryaki et al (17), where 33.5% of patients had consumed infant formula at least once. However, it is worth noting that 56% of those who had never consumed formula had the condition.

Although the study by Martin et al (3) describes food allergy in a first-degree relative as a risk factor for allergic proctocolitis, in this study it was only 22.2% who had a family history of food allergy in a first-degree relative, while allergic rhinitis and atopic dermatitis were more prevalent.

A study carried out in Iran analyzed the calprotectin of breastfed infants under 1 year old diagnosed with allergic colitis and measured calprotectin at diagnosis, 2 and 6 weeks after the maternal exclusion diet. It showed a significant decrease in calprotectin after the exclusion diet, but it was not significantly related to the clinical symptoms of diarrhea, blood or mucus in the stool, concluding that calprotectin is not a good indicator of clinical improvement in allergic colitis.(18) The current study showed huge variation in fecal calprotectin in infants with allergic proctocolitis, with an intersection with low/normal calprotectin values, showing the non-specificity of this exam in these patients.

In all the patients in this study, the diversity index found was within the normal range, corresponding to good to high diversity. This leads us to think that the diversity value alone may not be responsible for a healthy microbiome, but rather the predominance of certain species. Indeed, a longitudinal study by Martin et al,

comparing the microbiome of infants with food protein-induced allergic proctocolitis with healthy control infants, through 16S rRNA gene sequencing, showed no difference in measures of richness or diversity between the groups.(19)

In general, the Firmicutes and Bacteroidetes phyla are predominant in the gut microbiota, while Proteobacteria, Actinobacteria and Verrucomicrobia are less abundant. (20) Several studies show that an increase in Proteobacteria in the gut reflects dysbiosis.(10,21,22) This study showed a high abundance of the Proteobacteria, but with high variability between infants (minimum of 9.9% and maximum of 94.6%). It is noteworthy that the infant who had 9.9% of Proteobacteria had a predominance of the Actinobacteria phylum, mainly due to the *Bifidobacterium* (33.85%), which raises the question of whether this infant could still be at the very beginning of the allergic condition, or whether there is a predisposition to a better evolution of the condition, with earlier resolution. This case highlights the importance of a longitudinal study.

Kourosch et al,(23) compared the microbiome of food allergy patients with non-allergic siblings and healthy controls, and found different Clostridiales species when separating food allergic from non-allergic siblings groups, indicating different functions and disease associations within the same class. This shows the importance of species-level identification to assess their role in the microbiome of allergy patients.(23) In the present study, the *Clostridium* was present in 88.9% of infants (average 14.4%), and the species identified were *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium neonatale* and *Clostridium perfringens*.(20)

Studies show that certain species of *Bifidobacterium* and *Bacteroides* colonize the microbiota of breastfed infants, due to the oligosaccharides in breast milk.(24) In this study, although all the infants were breastfed, only 3 of them had *Bifidobacterium*, one of them with *Bifidobacterium animalis*, and the other 2 infants with *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, and *Bifidobacterium saguini*. *Bacteroides* were also present in only 3 infants, with the species *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides fluxus*, *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides stercoris*. Four of the nine infants in the study did not have the *Bifidobacterium* and *Bacteroides* genus. It is possible that the allergic state is capable of reducing or even eliminating these beneficial bacteria.

No study was found linking *Hungatella hathewayi* with food allergy. However, a study carried out on infants in Hong Kong, analyzing the microbiome through 16S rRNA sequencing, found an abundance of this bacterium significantly associated with the

development of eczema.(25) This suggests that this bacterium may play a role in atopic diseases.

The bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is described as one of the most abundant species found in the colon of healthy humans, representing more than 5% of the intestinal bacterial population.(14) It produces energy for the colonocytes, as well as anti-inflammatory metabolites that cooperate with intestinal health (26). The process of prebiotic fermentation, which stimulates healthy microbiota, is considered to be the main contribution to the metabolism of *F. Prausnitzii*. It is one of the best-known butyrate-producing bacteria in the gastrointestinal tract, essential for maintaining the intestinal barrier.(14) In the infants in this study, *F. Prausnitzii* was absent in 2 infants, and when present, it was in extremely low quantities (0.01-0.02%), suggesting an increase in intestinal permeability secondary to dysbiosis.

This study is the first in Brazil to analyze the fecal microbiome of infants with allergic proctocolitis. In addition, the analysis of the microbiome, which was carried out using sequencing shotgun, stands out for providing greater precision in the identification of microorganisms down to species level, when compared to 16S ribosomal RNA sequencing, which is the method used in most studies.

LIMITATIONS

A limitation of the study was the small sample size, given the high cost of shotgun microbiome analysis. A study with a larger sample and/or paired with healthy controls would be interesting for further conclusions. Another limitation lies in the fact the analysis of fecal calprotectin, which in this study did not quantify values above 1,000, so it was not possible to calculate an average. Neither has calprotectin been measured after the allergen exclusion diet to compare with evolution. Despite the fact that its non-specificity has already been demonstrated.

CONCLUSIONS

The microbiome of infants with allergic proctocolitis in this study, despite presenting adequate diversity, shows dysbiosis, with an increase in Proteobacteria such as *Klebsiella* and a reduction in *Bacteroides* and *Bifidobacterium*. There is also a low abundance or even absence of beneficial bacteria such as *Faecalibacterium*

prausnitzii. Calprotectin proved to be non-specific, with high and low values in allergic proctocolitis

This sample shows the variations in the microbiome and the lack of a specific pattern in infants with allergic proctocolitis. The nonspecificity of the findings perhaps demonstrates the multifactorial nature of allergic proctocolitis. Little is known about the microbiome of infants with allergic proctocolitis, so more studies are needed to find out the potential effects and correlations of the numerous species found. A single dose of calprotectin does not help diagnose allergic proctocolitis.

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to the Biogenética laboratory in Florianópolis/SC, Brazil, for their analysis and help in evaluating the microbiomes.

Special thanks also go to the Buhlmann laboratory, which carried out the fecal calprotectin analysis on our infants.

And special thanks to our statistician Álvaro Rösler.

FINAL CONSIDERATIONS:

This study is nested within a larger study of two pediatric gastroenterology centers in Brazil, ours in Porto Alegre/RS and the other in Brasília/DF. We will also analyze the human milk oligosaccharides (HMO), and a subsequent comparison of the HMOs with the microbiome of the respective infants.

REFERENCES

1. Venter C, Brown T, Meyer R, Walsh J, Shah N, Nowak-Węgrzyn A, et al. Better recognition, diagnosis and management of non-IgE-mediated cow's milk allergy in infancy: IMAP - An international interpretation of the MAP (Milk Allergy in Primary Care) guideline. *Clin Transl Allergy*. 2017;7(1):1–9.
2. Meyer R, Fox AT, Chebar Lozinsky A, Michaelis LJ, Shah N. Non-IgE-mediated gastrointestinal allergies—Do they have a place in a new model of the Allergic March. Vol. 30, *Pediatric Allergy and Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 149–58.
3. Martin VM, Virkud Y V., Seay H, Hickey A, Ndahayo R, Rosow R, et al. Prospective Assessment of Pediatrician-Diagnosed Food Protein-Induced Allergic Proctocolitis by Gross or Occult Blood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2020 May 1;8(5):1692-1699.e1.

4. Bianca ACC Dela, Barreto BAP, Kuschnir FC, Franco JM, Cunha LAO, Pereira RA. O Microbioma e as Doenças Alérgicas. Vol. N° 68, Documento Científico SBP. 2023.
5. Akagawa S, Kaneko K. Gut microbiota and allergic diseases in children. Vol. 71, *Allergology International*. Japanese Society of Allergology; 2022. p. 301–9.
6. Savage JH, Lee-Sarwar KA, Sordillo J, Bunyavanich S, Zhou Y, O'Connor G, et al. A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018 Jan 1;73(1):145–52.
7. Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ. The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. Vol. 27, *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2019. p. 131–47.
8. Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P, et al. Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016 Oct 1;138(4):1122–30.
9. Łoś-Rycharska E, Gołębiowski M, Sikora M, Grzybowski T, Gorzkiewicz M, Popielarz M, et al. A combined analysis of gut and skin microbiota in infants with food allergy and atopic dermatitis: A pilot study. *Nutrients*. 2021 May 1;13(5).
10. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Vol. 33, *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2015. p. 496–503.
11. Beşer ÖF, Sancak S, Erkan T, Kutlu T, Çokuğraş H, Cokuğraş FÇ. Can fecal calprotectin level be used as a markers of inflammation in the diagnosis and follow-up of cow's milk protein allergy? *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014;6(1):33–8.
12. Sipponen T, Kolho KL. Fecal calprotectin in diagnosis and clinical assessment of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2014;50(1):74–80.
13. Skypala IJ, Venter C, Meyer R, Dejong NW, Fox AT, Groetch M, et al. The development of a standardised diet history tool to support the diagnosis of food allergy. *Clin Transl Allergy*. 2015;5(1).
14. Leylabadlo HE, Ghotaslou R, Feizabadi MM, Farajnia S, Moaddab SY, Ganbarov K, et al. The critical role of *Faecalibacterium prausnitzii* in human health: An overview. *Microb Pathog*. 2020 Dec;149:104344.
15. Aloisio I, Quagliariello A, De Fanti S, Luiselli D, De Filippo C, Albanese D, et al. Evaluation of the effects of intrapartum antibiotic prophylaxis on newborn intestinal microbiota using a sequencing approach targeted to multi hypervariable 16S rDNA regions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Jun 1;100(12):5537–46.
16. Stearns JC, Simioni J, Gunn E, McDonald H, Holloway AC, Thabane L, et al. Intrapartum antibiotics for GBS prophylaxis alter colonization patterns in the early infant gut microbiome of low risk infants. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
17. Buyuktiryaki B, Kulhas Celik I, Erdem SB, Capanoglu M, Civelek E, Guc BU, et al. Risk Factors Influencing Tolerance and Clinical Features of Food Protein-induced Allergic Proctocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2020;70(5):574–9.
18. Atae P, Zoghali M, Nikkhoo B, Ghaderi E, Mansouri M, Nasiri R, et al. Diagnostic value of fecal calprotectin in response to mother's diet in breast-fed infants with cow's milk allergy colitis. *Iran J Pediatr*. 2018 Aug 1;28(4).

19. Martin VM, Virkud Y V., Dahan E, Seay HL, Itzkovits D, Vlamakis H, et al. Longitudinal disease-associated gut microbiome differences in infants with food protein-induced allergic proctocolitis. *Microbiome*. 2022 Dec 1;10(1).
20. Reyman M, van Houten MA, Watson RL, Chu MLJN, Arp K, de Waal WJ, et al. Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial. *Nat Commun*. 2022 Feb 16;13(1):893.
21. Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol*. 2011;12(5).
22. Mennini M, Fierro V, Di Nardo G, Pecora V, Fiocchi A. Microbiota in non-IgE-mediated food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2020;20(3):323–8.
23. Kourosh A, Luna RA, Balderas M, Nance C, Anagnostou A, Devaraj S, et al. Fecal microbiome signatures are different in food-allergic children compared to siblings and healthy children. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2018 Aug 1;29(5):545–54.
24. Underwood MA, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: champion colonizer of the infant gut. *Pediatr Res*. 2015 Jan 10;77(1–2):229–35.
25. Chan CWH, Leung TF, Choi KC, Tsui SKW, Wong CL, Chow KM, et al. Association of early-life gut microbiome and lifestyle factors in the development of eczema in Hong Kong infants. *Exp Dermatol*. 2021 Jun 19;30(6):859–64.
26. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Oct 28;105(43):16731–6.

11.2. Aprovação Comitê de Ética

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relação entre os oligossacarídeos do leite materno e microbioma intestinal em lactentes com proctocolite alérgica em duas regiões do Brasil

Pesquisador: CRISTINA HELENA TARGA FERREIRA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 45246021.2.3001.5553

Instituição Proponente: Hospital da Criança de Brasília José Alencar

Patrocinador Principal: INSTITUTO DE PESQUISA

PENSI Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório

Parcial Detalhe:

Justificativa: Relatório parcial sobre o andamento do projeto de pesquisa

Data do Envio: 21/01/2022

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.226.638

Apresentação da Notificação:

Trata-se de notificação em forma de relatório parcial que informa dificuldades técnico operacionais para a análise de oligossacarídeos.

A pesquisadora informa atraso no início da coleta de dados.

Objetivo da Notificação:

Trata-se de notificação em forma de relatório parcial que informa dificuldades técnico operacionais para a análise de oligossacarídeos.

A pesquisadora informa atraso no início da coleta de dados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Dificuldades na execução de análise de oligossacarídeos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Relatório parcial aprovado.

Caso haja necessidade de extensão no prazo inicialmente previsto para a coleta de dados, tal solicitação deve ser feita via 'Emenda'.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	relatorioparcial2.docx	21/01/2022 18:41:39	CRISTINA HELENA TARGA FERREIRA	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 07 de Fevereiro de 2022

Assinado por:

Maria Cristina de Paula Scandiuizzi
(Coordenador(a))

11.3 Normas de publicação: Jornal de Pediatria SBP

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Pediatria

ISSN: 1678-4782

DESCRIÇÃO

Publicação bimensal da Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP), em circulação desde 1934. O Jornal de Pediatria publica artigos originais e artigos de revisão, abrangendo as diversas áreas da pediatria. Através da publicação e divulgação de relevantes contribuições científicas da comunidade médico-científica nacional e internacional da área de pediatria, o Jornal de Pediatria busca elevar o padrão da prática pediátrica e do atendimento médico especializado em crianças e adolescentes.

FATOR DE IMPACTO

2018: 1,689 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

FONTES DE INDEXAÇÃO

MEDLINE®

LILACS - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde

Index Medicus

EMBASE

SciELO - Scientific Electronic Library Online

University Microfilms International

Excerpta Medica

Sociedad Iberoamericana de Informacion Científica (SIIC) Data Bases

Science Citation Index Expanded

Journal Citation Reports - Science Edition

COMITÊ EDITORIAL

Editor-chefe

Renato Soibelman Procianoy, Professor titular, Departamento de Pediatria e Cuidados Infantis,
Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Editores Associados

Antonio José Ledo da Cunha – Professor Titular, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Crésio de Aragão Dantas Alves – Professor Associado, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

Dirceu Solé – Professor Titular, Departamento de Pediatria, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

Gisélia Alves Pontes da Silva – Professora Titular, Departamento de Gastroenterologia Pediátrica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

João Guilherme Bezerra Alves – Professor Titular, Departamento de Pediatria, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brasil

Magda Lahorgue Nunes – Professora Associada, Departamento de Pediatria e Medicina Interna/ Neurologia, Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Marco Aurélio Palazzi Sáfy – Professor Associado, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brasil

Paulo Augusto Moreira Camargos – Professor Titular, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

Conselho Editorial

- **Namasivayam Ambalavanan** - Birmingham, EUA
- **Stephane Auvin** - Paris, França
- **Eduardo Bancalari** - Miami, EUA
- **Werther Brunow de Carvalho** - São Paulo, Brasil
- **Andrew Bush** - Londres, Inglaterra
- **Joseph A. Carcillo** - Pittsburgh, EUA
- **Stefano Cianfarani** - Roma, Italia
- **Antonio Condino Neto** - São Paulo, Brasil
- **Jaderson da Costa** - Porto Alegre, Brasil
- **Janet Englund** - Seattle, EUA

- **Ruth Guinsburg** - São Paulo, Brasil
- **Philip John Cooper** - Londres, Inglaterra
- **Satyan Lakshminrusimha** - Sacramento, EUA
- **Danièle de Luca** - Paris, França
- **Asunción Mejías** - Columbus, EUA
- **Krisa Page van Meurs** - Stanford, EUA
- **Mauro Batista de Moraes** - São Paulo, Brasil
- **T. Michael O'Shea** - Chapel Hill, EUA
- **Richard Polin** - Nova York, EUA
- **Tina Quanbee Tan** - Chicago, EUA
- **Salmo Raskin** - Curitiba, Brasil
- **Nelson Augusto Rosário Filho** - Curitiba, Brasil
- **Bruce Kalman Rubin** - Richmond, EUA
- **Pablo J. Sanchez** - Columbus, EUA
- **Shlomo Shinnar** - Bronx, EUA
- **Luciana Rodrigues Silva** - Salvador, Brasil
- **Alexandre Tellechea Rotta** - Durham, EUA
- **Yvan Vandenplas** - Bruxelas, Bélgica

Tipos de Artigo

O Jornal de Pediatria aceita submissões de artigos originais, artigos de revisão e cartas ao editor. **Artigos originais** incluem relatos de estudos controlados e randomizados, estudos de triagem e diagnóstico e outros estudos descritivos e de intervenção, bem como registros sobre pesquisas básicas realizadas com animais de laboratório (ver seção **Resultados dos ensaios clínicos** mais adiante). Os manuscritos nesta categoria não devem exceder 3.000 palavras (excluindo página de rosto, referências e anexos), 30 referências e quatro tabelas e figuras. Acesse <http://www.equator-network.org/> para informações sobre as diretrizes a serem seguidas na pesquisa em saúde para esse tipo de artigo.

Artigos de revisão incluem meta-análises, avaliações sistemáticas e críticas da literatura sobre temas de relevância clínica, com ênfase em aspectos como causa e prevenção de doenças, diagnóstico, tratamento e prognóstico. Os artigos de revisão não devem exceder 6.000 palavras (excluindo página de rosto, referências e tabelas)

e devem citar no mínimo 30 referências atualizadas. Normalmente, profissionais de reconhecida experiência são convidados a escrever artigos de revisão. As metanálises estão incluídas nesta categoria. O Jornal de Pediatria também considera artigos de revisão não solicitados. Entre em contato pelo e-mail assessoria@jped.com.br para submeter um esboço ou roteiro ao Conselho Editorial antes de submeter o manuscrito completo. Acesse <http://www.equator-network.org/> para informações sobre as diretrizes a serem seguidas na pesquisa em saúde para esse tipo de artigo. **Cartas ao editor** costumam expressar uma opinião, discutir ou criticar artigos publicados anteriormente no Jornal de Pediatria. As cartas não devem exceder 1.000 palavras e seis referências. Sempre que possível, uma resposta dos autores do artigo ao qual a carta se refere será publicada junto com a carta. **Editoriais e comentários**, que normalmente fazem referência a artigos selecionados, são solicitados a especialistas na área. O Conselho Editorial pode considerar a publicação de comentários não solicitados, desde que os autores apresentem um esboço ao Conselho Editorial antes de submeter o manuscrito.

Idioma

A partir de 9 de dezembro de 2019, os trabalhos devem ser enviados em inglês, pois serão publicados apenas em inglês (html e pdf). A grafia adotada é a do inglês americano.

Check-list para submissão

Você pode usar esta lista para fazer um check-list final do seu artigo antes de enviá-lo para avaliação pela revista. Por favor, verifique a seção relevante neste Guia para Autores para obter mais detalhes. **Certifique-se de que os seguintes itens estão presentes:**

Um autor foi designado como o autor para correspondência, incluindo-se seus detalhes de contato: e-mail e endereço postal completo.

Todos os arquivos necessários foram entregues:

Manuscrito

Incluir palavras-chave

Todas as figuras (incluir legendas relevantes)

Todas as tabelas (incluindo títulos, descrição, notas de rodapé)

Certifique-se de que todas citações de figuras e tabelas no texto correspondem aos arquivos enviados Arquivos Suplementares (quando necessário)

Considerações adicionais

A gramática e ortografia foram verificadas

Todas as referências mencionadas na seção Referências são citadas no texto, e vice-versa

Foi obtida permissão para uso de material protegido por direitos autorais de outras fontes (incluindo a Internet)

Foram feitas declarações de conflitos de interesse relevantes. As políticas da revista detalhadas neste guia foram revisadas. Para mais informações, visite o nosso Centro de suporte.

ANTES DE COMEÇAR

Ética na publicação

Por favor veja nossas páginas informativas sobre Ética na publicação e Diretrizes éticas para publicação em revistas científicas.

Declaração de conflito de interesse

Todos os autores devem divulgar quaisquer relações financeiras e pessoais com outras pessoas ou organizações que possam influenciar de forma inadequada (viés) seu trabalho. Exemplos de potenciais conflitos de interesse incluem empregos, consultorias, propriedade de ações, honorários, testemunhos de peritos remunerados, pedidos de patentes/inscrições e subsídios ou outros tipos de financiamento. Caso não haja conflitos de interesse, por favor, registre isso: "Conflitos de interesse: nenhum". Mais Informações.

Declaração de envio e verificação

A submissão de um manuscrito implica que o trabalho descrito não foi publicado anteriormente (exceto sob a forma de resumo ou como parte de uma palestra ou tese acadêmica publicada, ou como pré-impressão eletrônica, consulte a seção "Publicação múltipla, redundante ou concorrente" de nossa política de ética para mais informações), que não está sendo avaliado para publicação em outro lugar, que sua publicação foi aprovada por todos os autores e tácita ou explicitamente pelas

autoridades responsáveis onde o trabalho foi realizado e que, se aceito, não será publicado em outro lugar na mesma forma, em inglês ou em qualquer outro idioma, inclusive eletronicamente, sem o consentimento por escrito do detentor dos direitos autorais. Para verificar a originalidade do manuscrito, ele pode ser verificado pelo serviço de detecção de originalidade CrossCheck.

Colaboradores

Cada autor é obrigado a declarar sua contribuição individual para o artigo: todos os autores devem ter participado substancialmente da pesquisa e/ou da preparação do artigo, de modo que o papel de cada um dos autores deve ser descrito. A afirmação de que todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito deve ser verdadeira e incluída na Cover Letter aos editores.

Autoria

Todos os autores devem ter contribuído de forma substancial em todos os seguintes aspectos: (1) concepção e delineamento do estudo, ou aquisição de dados, ou análise e interpretação de dados, (2) escrita do artigo ou revisão crítica do conteúdo intelectual relevante, (3) aprovação final da versão a ser submetida.

Mudanças na autoria

Espera-se que os autores avaliem cuidadosamente a lista e a ordem dos autores **antes** de submeter seu manuscrito e que forneçam a lista definitiva de autores no momento da submissão. Qualquer adição, remoção ou rearranjo de nomes de autores na lista de autoria deve ser feita somente **antes** da aceitação do manuscrito e somente se aprovado pelo editor da revista. Para solicitar tal alteração, o editor deve receber do autor para correspondência o seguinte: (a) o motivo da mudança na lista de autores e (b) confirmação por escrito (e-mail, carta) de todos os autores concordando com a adição, remoção ou rearranjo. No caso de adição ou remoção de autores, isso inclui a confirmação do autor adicionado ou removido.

Somente em circunstâncias excepcionais, o editor aceitará a adição, supressão ou rearranjo de autores após o manuscrito ter sido aceito. Enquanto o editor estiver avaliando o pedido, a publicação do manuscrito permanecerá suspensa. Se o manuscrito já tiver sido publicado on-line, qualquer solicitação aprovada pelo editor resultará em uma retificação.

Resultados dos ensaios clínicos

Um ensaio clínico é definido como qualquer estudo de pesquisa que designe prospectivamente participantes humanos ou grupos de seres humanos a uma ou mais intervenções relacionadas à saúde, para avaliar os efeitos dos desfechos de saúde. As intervenções relacionadas à saúde incluem qualquer intervenção realizada para modificar um desfecho biomédico ou relacionado à saúde (por exemplo, fármacos, procedimentos cirúrgicos, dispositivos, tratamentos comportamentais, intervenções alimentares e mudanças nos procedimentos de cuidados). Os desfechos de saúde incluem quaisquer medidas biomédicas ou relacionadas à saúde obtidas em pacientes ou participantes, incluindo medidas farmacocinéticas e eventos adversos.

De acordo com a posição do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), a revista não aceitará os resultados publicados no mesmo registro de ensaios clínicos no qual o registro primário seja uma publicação anterior se os resultados publicados forem apresentados sob a forma de um breve resumo ou tabela estruturados (menos de 500 palavras). No entanto, a divulgação de resultados em outras circunstâncias (por exemplo, reuniões de investidores) é desencorajada e pode impedir a aceitação do manuscrito. Os autores devem divulgar em sua totalidade as publicações em registros de resultados do mesmo trabalho ou relacionados a ele.

Relatos de ensaios clínicos

Ensaio controlado randomizado devem ser apresentados de acordo com as diretrizes CONSORT. Na submissão do manuscrito, os autores devem fornecer a lista de verificação CONSORT acompanhada de um fluxograma que mostre o progresso dos pacientes ao longo do ensaio, incluindo recrutamento, inscrição, randomização, remoção e conclusão, e uma descrição detalhada do procedimento de randomização. A lista de verificação CONSORT e o modelo do fluxograma estão disponíveis no seguinte link: <http://www.consort-statement.org/>. Acesse <http://www.equator-network.org/> para informações sobre as diretrizes a serem seguidas na pesquisa em saúde para esse tipo de artigo.

Registro de ensaios clínicos

A inclusão em um registro público de ensaios clínicos é uma condição para a publicação de ensaios clínicos nesta revista, de acordo com as recomendações do *International Committee of Medical Journal Editors*. Os ensaios devem ser registrados no início ou antes da inclusão dos pacientes. O número de registro do ensaio clínico

deve ser incluído no fim do resumo do artigo. Estudos puramente observacionais (aqueles em que a designação da intervenção médica não está a critério do investigador) não exigirão registro.

Direitos autorais

Após a aceitação de um artigo, os autores devem assinar o *Journal Publishing Agreement* (Acordo de Publicação de Artigo) (ver mais informações sobre esse item) de forma a atribuir à Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) os direitos autorais do manuscrito e de quaisquer tabelas, ilustrações ou outro material submetido para publicação como parte do manuscrito (o “Artigo”) em todas as formas e mídias (já conhecidas ou desenvolvidas posteriormente), em todo o mundo, em todos os idiomas, por toda a duração dos direitos autorais, efetivando-se a partir do momento em que o Artigo for aceito para publicação. Um e-mail será enviado ao autor para correspondência confirmando o recebimento do manuscrito junto com o *Journal Publishing Agreement* ou um link para a versão on-line desse acordo.

Direitos do Autor

Como autor, você (ou seu empregador ou instituição) tem certos direitos de reuso do seu trabalho. Mais Informações.

A Elsevier apoia o compartilhamento responsável

Descubra como você pode compartilhar sua pesquisa publicada nas revistas da Elsevier.

Papel da Fonte de Financiamento

Deve-se identificar quem forneceu apoio financeiro para a realização da pesquisa e/ou preparação do artigo e descrever brevemente o papel do(s) patrocinador(es), se houver, no delineamento do estudo; na coleta, análise e interpretação de dados; na redação do manuscrito; e na decisão de enviar o artigo para publicação. Se a fonte (ou fontes) de financiamento não teve (ou tiveram) tal participação, isso deve ser mencionado.

Acesso aberto

Esta revista é uma revista revisada por pares, de acesso aberto subsidiado pelo qual a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) arca com a maior parte dos custos de publicação da revista.

Autores de artigos submetidos a partir de **1º de setembro de 2018**, que sejam aceitos para publicação no *Jornal de Pediatria*, deverão pagar uma taxa de publicação à SBP a fim de contribuir com os custos de publicação. Ao submeterem o manuscrito a esta revista, os autores concordam com esses termos.

Valores

Se qualquer um dos autores for associado quite com a SBP: R\$ 1.500,00 por manuscrito aceito

Se nenhum dos autores for associado à SBP: R\$ 2.200,00 por manuscrito aceito
Autor estrangeiro: USD 1.000,00 por manuscrito aceito.

Quando o manuscrito for aceito para publicação, os autores receberão instruções sobre a taxa de publicação. Para mais informações, por favor, entre em contato com assessoria@jped.com.br.

Direitos do usuário

A permissão de reuso é definida pela seguinte licença de usuário final:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

Para fins não comerciais, permite que outros distribuam e copiem o artigo, e o incluam em um trabalho coletivo (como uma antologia), desde que se dê crédito ao(s) autor(es) e desde que não se altere ou modifique o artigo.

Elsevier Publishing Campus

O Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) é uma plataforma online que oferece palestras gratuitas, treinamento interativo e conselhos profissionais para apoiá-lo na publicação de sua pesquisa. A seção College of Skills oferece módulos sobre como preparar, escrever e estruturar seu artigo e explica como os editores analisarão o seu artigo quando ele for submetido para publicação. Use esses recursos para garantir que sua publicação seja a melhor possível.

Idioma (uso e serviços de edição)

Por favor, escreva o seu texto em inglês de boa qualidade (o inglês americano é usado nesta revista). Os autores que sentirem necessidade de edição do manuscrito na língua inglesa, para eliminar possíveis erros gramaticais ou ortográficos de forma a atender à demanda do correto uso do inglês científico, podem contratar o Serviço de Edição da Língua Inglesa disponível no *WebShop* da Elsevier.

Consentimento Informado e detalhes do paciente

Estudos envolvendo pacientes ou voluntários requerem a aprovação do comitê de ética e o consentimento informado, que devem ser documentados no artigo. Consentimentos, permissões e desobrigações pertinentes devem ser obtidos sempre que um autor desejar incluir detalhes de casos ou outras informações pessoais ou imagens de pacientes e de quaisquer outros indivíduos em uma publicação da Elsevier. Os consentimentos por escrito devem ser mantidos pelo autor e cópias dos consentimentos ou provas de que tais consentimentos foram obtidos devem ser fornecidos à Elsevier mediante solicitação. Para mais informações, reveja a Política da Elsevier sobre o Uso de Imagens ou Informações Pessoais de Pacientes ou Outros Indivíduos. A menos que você tenha permissão por escrito do paciente (ou, se for o caso, dos parentes mais próximos ou tutores), os detalhes pessoais de qualquer paciente incluído em qualquer parte do artigo e em qualquer material complementar (incluindo todas as ilustrações e vídeos) devem ser removidos antes da submissão.

Submissão

Nosso sistema de submissão on-line é um guia passo-a-passo dos procedimentos para inserção dos detalhes do seu manuscrito e para o upload de seus arquivos. O sistema converte os arquivos de seu artigo em um único arquivo PDF usado no processo de revisão por pares (peer-review). Arquivos editáveis (por exemplo, Word, LaTeX) são necessários para compor seu manuscrito para publicação final. Toda a correspondência, incluindo a notificação da decisão do Editor e os pedidos de revisão, são enviados por e-mail.

Submeta seu manuscrito

Por favor envie o seu manuscrito por meio do site <https://www.editorialmanager.com/jpediatria>.

PREPARAÇÃO

Revisão duplo-cega

Esta revista usa revisão duplo-cega, o que significa que as identidades dos autores não são conhecidas pelos revisores e vice-versa. Mais informações estão disponíveis em nosso site. Para facilitar o processo, deve-se incluir separadamente o seguinte:

Página de abertura (com detalhes do autor): deve incluir o título, os nomes dos autores, as afiliações, os agradecimentos e qualquer Declaração de Interesse, e o endereço completo do autor para correspondência, incluindo um endereço de e-mail.

Manuscrito cego (sem detalhes do autor): O corpo principal do artigo (incluindo referências, figuras, tabelas e quaisquer agradecimentos) não deve incluir nenhuma identificação, como os nomes ou afiliações dos autores.

Uso de Processador de Texto

É importante que o arquivo seja salvo no formato original do processador de texto utilizado. O texto deve estar em formato de coluna única. Mantenha o layout do texto o mais simples possível. A maioria dos códigos de formatação será removida e substituída no processamento do artigo. Em particular, não use as opções do processador de texto para justificar texto ou hifenizar palavras. Destaques como negrito, itálico, subscrito, sobrescrito, etc. podem ser usados. Ao preparar tabelas, se você estiver usando uma grade na criação das tabelas, use apenas uma grade para cada tabela individualmente, e não uma grade para cada linha. Se nenhuma grade for utilizada, use a tabulação, e não espaços, para alinhar as colunas. O texto eletrônico deve ser preparado de forma muito semelhante ao dos manuscritos convencionais (veja também o *Guia para Publicar com a Elsevier*). Observe que os arquivos de origem das figuras, das tabelas e dos gráficos serão necessários, independentemente se você irá embuti-los ou não no texto. Veja também a seção sobre imagens eletrônicas.

Para evitar erros desnecessários, é aconselhável usar as funções “verificação ortográfica” e “verificação gramatical” do seu processador de texto.

Estrutura do Artigo

Subdivisão – Seções não numeradas

O texto principal nos **artigos originais** deve conter as seguintes seções, indicadas por uma legenda: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. As seções nos **artigos de revisão** podem variar dependendo do tópico tratado. Sugerimos que os autores incluam uma breve introdução, na qual eles expliquem (da perspectiva da literatura médica) a importância daquela revisão para a prática da pediatria. Não é necessário descrever como os dados foram selecionados e coletados. A seção de conclusões deve correlacionar as ideias principais da revisão para possíveis

aplicações clínicas, mantendo generalizações dentro do escopo do assunto sob revisão.

Introdução

Indique os objetivos do trabalho e forneça um background adequado, evitando uma avaliação detalhada da literatura ou um resumo dos resultados. Faça uma introdução breve, incluindo apenas referências estritamente relevantes para sublinhar a importância do tópico e para justificar o estudo. No fim da introdução, os objetivos do estudo devem estar claramente definidos.

Materiais e Métodos

Forneça detalhes suficientes para viabilizar a reprodução do trabalho. Métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: apenas as modificações relevantes devem ser descritas. Esta seção deve descrever a população estudada, a amostra a ser analisada e os critérios de seleção; também deve definir claramente as variáveis em estudo e descrever detalhadamente os métodos estatísticos empregados (incluindo referências apropriadas sobre métodos estatísticos e software). Procedimentos, produtos e equipamentos devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir a reprodução do estudo. Deve ser incluída uma declaração relativa à aprovação pelo comitê de ética de pesquisa (ou equivalente) da instituição em que o trabalho foi realizado.

Resultados

Os resultados do estudo devem ser apresentados de forma clara e objetiva, seguindo uma sequência lógica. As informações contidas em tabelas ou figuras não devem ser repetidas no texto. Use figuras no lugar de tabelas para apresentar dados extensos.

Discussão

Os resultados devem ser interpretados e comparados com dados publicados anteriormente, destacando os aspectos novos e importantes do presente estudo. Devem-se discutir as implicações dos resultados e as limitações do estudo, bem como a necessidade de pesquisas adicionais. As conclusões devem ser apresentadas ao fim da seção Discussão, levando em consideração a finalidade do trabalho. Relacione as conclusões com os objetivos iniciais do estudo, evitando declarações não embasadas pelos achados e dando a mesma ênfase aos achados positivos e

negativos que tenham importância científica similar. Se relevante, inclua recomendações para novas pesquisas.

Informações essenciais sobre a página de abertura

A página de abertura deve conter as seguintes informações: a) título conciso e informativo. Evite termos e abreviaturas desnecessários; evite também referências ao local e/ou cidade onde o trabalho foi realizado; b) título curto com não mais de 50 caracteres, incluindo espaços, mostrado nos cabeçalhos; c) nomes dos autores (primeiro e último nome e iniciais do meio) e o ORCID ID. O ORCID ID deve estar na página de abertura e, também, no perfil do EVISE de todos os autores. Para isso, o autor deve ir em Update your Details, campo ORCID. Se algum dos autores não tem esta ID, deve registrar-se em <https://orcid.org/register>; d) grau acadêmico mais elevado dos autores; e) endereço de e-mail de todos os autores; f) se disponível, URL para o curriculum vitae eletrônico (“Currículo Lattes” para autores brasileiros, ORCID etc.); g) contribuição específica de cada autor para o estudo; h) declaração de conflitos de interesse (escreva nada a declarar ou divulgue explicitamente quaisquer interesses financeiros ou outros que possam causar constrangimento caso sejam revelados após a publicação do artigo); i) instituição ou serviço com o/a qual o trabalho está associado para indexação no Index Medicus/MEDLINE; j) nome, endereço, número de telefone, número de fax e e-mail do autor para correspondência; k) nome, endereço, número de telefone, número de fax e e-mail do autor encarregado do contato pré-publicação; l) fontes de financiamento, ou nome de instituições ou empresas fornecedoras de equipamentos e materiais, se aplicável; m) contagem de palavras do texto principal, sem incluir resumo, agradecimentos, referências, tabelas e legendas para figuras; n) contagem de palavras do resumo; o) número de tabelas e figuras.

Resumo

É necessário um resumo conciso e factual. O resumo deve indicar de forma breve o objetivo da pesquisa, os principais resultados e as conclusões mais importantes. Um resumo é frequentemente apresentado separadamente do artigo, por isso deve ser capaz de ser compreendido sozinho. Por esse motivo, as referências devem ser evitadas, mas, se necessário, cite o(s) autor(es) e ano(s). Além disso, abreviações não padrão ou incomuns devem ser evitadas, mas, se forem essenciais, devem ser definidas em sua primeira menção no próprio resumo. O resumo não deve ter mais de

250 palavras ou 1.400 caracteres. Não inclua palavras que possam identificar a instituição ou cidade onde o estudo foi realizado, para facilitar a revisão cega. Todas as informações no resumo devem refletir com precisão o conteúdo do artigo. O resumo deve ser estruturado conforme descrito a seguir:

Resumo para artigos originais

Objetivo: Declarar por que o estudo foi iniciado e as hipóteses iniciais. Defina com precisão o objetivo principal do estudo; apenas os objetivos secundários mais relevantes devem ser listados. *Método:* Descrever o desenho do estudo (se apropriado, indique se o estudo é randomizado, cego, prospectivo, etc.), local (se apropriado, descreva o nível de atendimento, isto é, se primário, secundário ou terciário, clínica privada ou instituição pública, etc.), pacientes ou participantes (critérios de seleção, número de casos no início e no final do estudo etc.), intervenções (incluem informações essenciais, como métodos e duração do estudo) e critérios utilizados para medir os resultados. *Resultados:* Descrever os achados mais importantes, os intervalos de confiança e a significância estatística dos achados. *Conclusões:* Descrever apenas conclusões que refletem o objetivo do estudo e fundamentadas por suas descobertas. Discutir possíveis aplicações das descobertas, com igual ênfase em resultados positivos e negativos de mérito científico similar.

Resumo para artigos de revisão

Objetivo: Explicar por que a revisão foi realizada, indicando se a mesma se concentra em um fator especial, tal como etiologia, prevenção, diagnóstico, tratamento ou prognóstico da doença. *Fontes:* Descrever todas as fontes de informação, definindo bancos de dados e anos pesquisados. Indicar brevemente os critérios de seleção dos artigos para a revisão e avaliar a qualidade da informação. *Resumo dos achados:* Indique os principais achados quantitativos ou qualitativos. *Conclusões:* Indique suas conclusões e sua aplicação clínica, mantendo generalizações dentro do escopo do assunto sob revisão.

Palavras-chave

Imediatamente após o resumo, forneça um máximo de 6 palavras-chave, utilizando a ortografia americana e evitando termos gerais e plurais e múltiplos conceitos (evite, por exemplo, 'e', 'de'). Use poucas abreviações: apenas aquelas fi rmente

estabelecidas no campo de pesquisa podem ser escolhidas. Essas palavras-chave serão usadas para fins de indexação. Por favor, utilize os termos listados no *Medical Subject Headings* (MeSH), disponíveis em <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>. Quando descritores adequados não estiverem disponíveis, novos termos podem ser utilizados.

Abreviações

Seja moderado no uso de abreviações. Todas as abreviações devem ser explicadas em sua primeira menção no texto. As abreviações não padrão no campo da pediatria devem ser definidas em uma nota de rodapé a ser colocada na primeira página do artigo. Evite o uso de abreviações no resumo; aquelas que são inevitáveis no resumo devem ser definidas em sua primeira menção, bem como na nota de rodapé. Assegure-se da consistência das abreviações em todo o artigo.

Agradecimentos

Agrupe os agradecimentos em uma seção separada ao fim do artigo antes das referências e, portanto, não os inclua na página de abertura, como uma nota de rodapé para o título ou de outra forma. Liste aqui os indivíduos que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo ajuda linguística, assistência escrita ou prova de leitura do artigo, etc.). Somente indivíduos ou instituições que contribuíram significativamente para o estudo, mas não são qualificados para autoria, devem ser mencionados. Os indivíduos citados nesta seção devem concordar por escrito com a inclusão de seus nomes, uma vez que os leitores podem inferir o endosso das conclusões do estudo.

Formatando as fontes de financiamento

Listar as fontes de financiamento usando a forma padrão para facilitar o cumprimento dos requisitos do financiador:

Financiamento: Esse trabalho recebeu financiamento do National Institutes of Health [números dos financiamentos xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [número do financiamento zzzz]; e dos United States Institutes of Peace [número do financiamento aaaa].

Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou tipo de financiamento e prêmios. Quando a verba recebida é parte de um financiamento maior ou de outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra

instituição de pesquisa, cite o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento.

Se nenhum financiamento foi fornecido para a pesquisa, inclua a seguinte frase:

Esta pesquisa não recebeu nenhum financiamento específico de agências de financiamento dos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Unidades

Siga as regras e convenções internacionalmente aceitas: use o sistema internacional (SI) de unidades. Se outras unidades forem mencionadas, forneça seu equivalente em SI.

Fórmulas matemáticas

Por favor, cite equações matemáticas como texto editável e não como imagens. Apresente fórmulas simples de acordo com o texto normal sempre que possível e use a barra oblíqua (/) em vez de uma linha horizontal para pequenos termos fracionários, por exemplo, X/Y . Em princípio, as variáveis devem ser apresentadas em itálico. Potências de e são frequentemente mais convenientemente indicadas pela exponencial. Numere consecutivamente quaisquer equações a serem exibidas separadamente do texto (se referidas explicitamente no texto).

Notas de rodapé

Notas de rodapé não devem ser usadas. Em vez disso, incorpore as informações relevantes no texto principal.

Imagens

Manipulação de imagem

Embora seja aceito que os autores às vezes precisem manipular imagens para obter maior clareza, a manipulação para fins de dolo ou fraude será vista como abuso ético científico e será tratada de acordo. Para imagens gráficas, esta revista aplica a seguinte política: nenhum recurso específico pode ser aprimorado, obscurecido, movido, removido ou introduzido em uma imagem. Os ajustes de brilho, contraste ou equilíbrio de cores são aceitáveis se, e enquanto não obscurecerem ou eliminarem qualquer informação presente no original. Os ajustes não lineares (por exemplo, alterações nas configurações de gama) devem ser divulgados na legenda da figura.

Imagens eletrônicas

Pontos Gerais

- Certifique-se de usar letras uniformes e dimensionamento de suas imagens originais.
- Incorpore as fontes usadas se o aplicativo fornecer essa opção.
- Prefira usar as seguintes fontes em suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol ou use fontes similares.
- Numere as ilustrações de acordo com sua sequência no texto.
- Use uma convenção de nomeação lógica para seus arquivos de imagens.
- Forneça legendas para ilustrações separadamente.
- Dimensione as ilustrações próximas às dimensões desejadas da versão publicada.
- Envie cada ilustração como um arquivo separado.

Um guia detalhado sobre imagens eletrônicas está disponível.

Você é convidado a visitar este site; alguns trechos das informações detalhadas são fornecidos aqui.

Formatos

Se as suas imagens eletrônicas forem criadas em um aplicativo do Microsoft Office (Word, PowerPoint, Excel), forneça “como está” no formato de documento original.

Independentemente do aplicativo utilizado que não seja o Microsoft Office, quando sua imagem eletrônica for finalizada, utilize “Salvar como” ou converta as imagens para um dos seguintes formatos (observe os requisitos de resolução para desenhos em linha contínua, meio-tom e combinações de desenho/meio-tom descritos a seguir).

EPS (ou PDF): Desenhos vetoriais, incorporar todas as fontes utilizadas.

TIFF (ou JPEG): Fotografias em cores ou em tons de cinza (meios-tons), mantenha um mínimo de 300 dpi. TIFF (ou JPEG): Desenho de linha de bitmap (pixels pretos e brancos puros), mantenha um mínimo de 1000 dpi.

TIFF (ou JPEG): Combinações de linha de bitmap/meio-tom (colorido ou escala de cinza), mantenha um mínimo de 500 dpi.

Por favor não:

- Forneça arquivos otimizados para o uso da tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG); esses formatos tipicamente têm um baixo número de pixels e um conjunto limitado de cores;
- Forneça arquivos com resolução muito baixa;
- Envie gráficos desproporcionalmente grandes para o conteúdo.

Imagens Coloridas

Por favor certifique-se de que os arquivos de imagens estão em um formato aceitável (TIFF [ou JPEG), EPS [ou PDF] ou arquivos do MS Office) e com a resolução correta. Se, juntamente com o seu artigo aceito, você enviar figuras de cor utilizáveis, a Elsevier assegurará, sem custo adicional, que essas figuras aparecerão em cores (por exemplo, ScienceDirect e outros sites).

Serviços de ilustração

O Elsevier's WebShop oferece serviços de ilustração aos autores que estão se preparando para enviar um manuscrito, mas estão preocupados com a qualidade das imagens que acompanham o artigo. Os experientes ilustradores da Elsevier podem produzir imagens científicas, técnicas e de estilo médico, bem como uma gama completa de quadros, tabelas e gráficos. O "polimento" da imagem também está disponível; nossos ilustradores trabalham suas imagens e as aprimoram para um padrão profissional. Visite o site para saber mais a respeito disso.

Legendas de figuras

Certifique-se de que cada figura tenha uma legenda. Forneça as legendas separadamente, não anexadas às figuras. Uma legenda deve incluir um breve título (**não** na figura em si) e uma descrição da ilustração. Mantenha o texto curto nas ilustrações propriamente ditas, mas explique todos os símbolos e abreviações utilizados.

Tabelas

Por favor, envie as tabelas como texto editável e não como imagem. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo, ou em páginas separadas no fim. Numere as tabelas de forma consecutiva de acordo com sua ordem no texto e coloque as notas de tabela abaixo do corpo da mesma. Seja moderado no uso das tabelas, e assegure-se de que os dados apresentados nas mesmas não duplicam os resultados

descritos em outro lugar no artigo. Evite usar grades verticais e sombreamento nas células da tabela.

Referências

Citação no texto

Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estão presentes na lista de referências (e vice-versa). Qualquer referência citada no resumo deve ser fornecida na íntegra. Não recomendamos o uso de resultados não publicados e comunicações pessoais na lista de referências, mas eles podem ser mencionados no texto. Se essas referências estiverem incluídas na lista de referências, elas devem seguir o estilo de referência padrão da revista e devem incluir uma substituição da data de publicação por “Resultados não publicados” ou “Comunicação pessoal”. A citação de uma referência como *in press* implica que o item foi aceito para publicação.

Links de referência

Maior exposição da pesquisa e revisão por pares de alta qualidade são asseguradas por links on-line às fontes citadas. Para permitir-nos criar *links* para serviços de resumos e indexação, como Scopus, CrossRef e PubMed, assegure-se de que os dados fornecidos nas referências estão corretos. Lembre-se que sobrenomes, títulos de revistas/livros, ano de publicação e paginação incorretos podem impedir a criação de *links*. Ao copiar referências, por favor tenha cuidado, porque as mesmas já podem conter erros. O uso do DOI — identificador de objeto digital (Digital Object Identifier) é encorajado.

Um DOI pode ser usado para citar e criar um *link* para artigos eletrônicos em que um artigo está *in-press* e detalhes de citação completa ainda não são conhecidos, mas o artigo está disponível on-line. O DOI nunca muda, então você pode usá-lo como um *link* permanente para qualquer artigo eletrônico.

Um exemplo de uma citação usando um DOI para um artigo que ainda não foi publicado é: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Por favor, observe que o formato dessas citações deve seguir o mesmo estilo das demais referências no manuscrito.

Referências da Web

A URL completa deve ser fornecida e a data em que a referência foi acessada pela última vez. Qualquer informação adicional, se conhecida (DOI, nomes de autores, datas, referência a uma publicação-fonte etc.), também deve ser fornecida. As referências da Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referências) sob um título diferente, se desejado, ou podem ser incluídas na lista de referência.

Referências de dados

Esta revista sugere que você cite conjuntos de dados subjacentes ou relevantes em seu manuscrito citando-os em seu texto e incluindo uma referência de dados em sua lista de referências. As referências de dados devem incluir os seguintes elementos: nome(s) do(s) autor(es), título do conjunto de dados, repositório de dados, versão (quando disponível), ano e identificador persistente. Adicione [conjunto de dados] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-la corretamente como uma referência de dados. O identificador [conjunto de dados] não aparecerá no seu artigo publicado. Os usuários do Mendeley Desktop podem facilmente instalar o estilo de referência para esta revista clicando no seguinte link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/jornal-de-pediatria>

Ao preparar seu manuscrito, você poderá selecionar esse estilo utilizando os plug-ins do Mendeley para o Microsoft Word ou o LibreOffice.

Estilo de Referências

As referências devem seguir o estilo Vancouver, também conhecido como o estilo de Requisitos Uniformes, fundamentado, em grande parte, em um estilo do American National Standards Institute, adaptado pela National Library of Medicine dos EUA (NLM) para suas bases de dados. Os autores devem consultar o *Citing Medicine, o Guia de estilo da NLM para autores, editores e editoras*, para obter informações sobre os formatos recomendados para uma variedade de tipos de referência. Os autores também podem consultar exemplos de referências (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html), em uma lista de exemplos extraídos ou baseados no Citing Medicine para fácil uso geral; esses exemplos de referências são mantidos pela NLM. As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto entre colchetes. Não use numeração automática, notas de rodapé ou de pé de página para referências. Artigos não publicados aceitos para publicação

podem ser incluídos como referências se o nome da revista estiver incluído, seguido de “in press”. Observações e comunicações pessoais não publicadas não devem ser citadas como referências; se for essencial para a compreensão do artigo, essa informação pode ser citada no texto, seguida pelas observações entre parênteses, observação não publicada ou comunicação pessoal. Para mais informações, consulte os “Requisitos Uniformes para Manuscritos Submetidos a Revistas Biomédicas”, disponíveis em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142758/>. Na sequência, apresentamos alguns exemplos do modelo adotado pelo Jornal de Pediatria.

Artigos em revistas

1. A té seis autores: Araújo LA, Silva LR, Mendes FA. Digestive tract neural control and gastrointestinal disorders in cerebral palsy. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88:455-64.
2. Mais de seis autores: Ribeiro MA, Silva MT, Ribeiro JD, Moreira MM, Almeida CC, Almeida-Junior AA, et al. Volumetric capnography as a tool to detect early peripheral lung obstruction in cystic fibrosis patients. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88:509-17.
3. Organização como autor: Mercier CE, Dunn MS, Ferrelli KR, Howard DB, Soll RF; Vermont Oxford Network ELBW Infant Follow-Up Study Group. Neurodevelopmental outcome of extremely low birth weight infants from the Vermont Oxford network: 1998-2003. *Neonatology*. 2010;97: 329-38.
4. Nenhum autor fornecido: Informed consent, parental permission, and assent in pediatric practice. Committee on Bioethics, American Academy of Pediatrics. Committee on Bioethics, American Academy of Pediatrics. *Pediatrics*. 1995;95:314-7.
5. Artigo publicado eletronicamente antes da versão impressa: Carvalho CG, Ribeiro MR, Bonilha MM, Fernandes Jr M, Procianny RS, Silveira RC. Use of off-label and unlicensed drugs in the neonatal intensive care unit and its association with severity scores. *J Pediatr (Rio J)*. 2012 Oct 30. [Epub ahead of print]

Livros

Blumer JL, Reed MD. Principles of neonatal pharmacology. In: Yaffe SJ, Aranda JV, eds. Neonatal and Pediatric Pharmacology. 3rd ed. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins; 2005. p. 146-58.

Estudos Acadêmicos

Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertação]. Mount Pleasant, MI: Central Michigan University; 2002.

CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB. Andersons electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002.

Homepage/website

R Development Core Team [Internet]. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2003 [cited 2011 Oct 21].

Available from: <http://www.R-project.org> **Paper presentation**

Bugni VM, Okamoto KY, Ozaki LS, Teles FM, Molina J, Bueno VC, et al. Development of a questionnaire for early detection of factors associated to the adherence to treatment of children and adolescents with chronic rheumatic diseases - "the Pediatric Rheumatology Adherence Questionnaire (PRAQ)". Paper presented at the ACR/ARHP Annual Meeting; November 5-9, 2011; Chicago, IL.

Fonte de abreviações da Revista

Os nomes das Revistas devem ser abreviados de acordo com a Lista de Abreviações de Palavras do Título.

Vídeo

A Elsevier aceita material de vídeo e sequências de animação para apoiar e aprimorar suas pesquisas científicas. Os autores que têm arquivos de vídeo ou animação que desejam enviar com seu artigo são fortemente encorajados a incluir links para estes dentro do corpo do artigo. Isso pode ser feito da mesma maneira que uma figura ou tabela, referindo-se ao conteúdo de vídeo ou animação e mostrando no corpo do texto onde ele deve ser colocado. Todos os arquivos enviados devem ser devidamente identificados de modo que se relacionem diretamente com o conteúdo do arquivo de vídeo. Para garantir que seu vídeo ou material de animação esteja apropriado para

uso, por favor forneça os arquivos em um dos nossos formatos de arquivo recomendados com um tamanho máximo total de 150 MB. Qualquer arquivo único não deve exceder 50 MB. Os arquivos de vídeo e animação fornecidos serão publicados on-line na versão eletrônica do seu artigo nos produtos de web da Elsevier, incluindo o ScienceDirect. Por favor forneça imagens estáticas com seus arquivos: você pode escolher qualquer quadro do vídeo ou animação ou fazer uma imagem separada. Essa imagem estática será usada em vez de ícones padrão, para personalizar o link para seus dados de vídeo. Para obter instruções mais detalhadas, visite nossas páginas de instruções de vídeo.

Nota: uma vez que o vídeo e a animação não podem ser incorporados à versão impressa da revista, por favor forneça o texto para ambas as versões eletrônica e impressa para as partes do artigo que se referem a esse conteúdo.

Material suplementar

Materiais suplementares, como tabelas, imagens e clipes de som, podem ser publicados com seu artigo para aprimorá-lo. Os itens suplementares enviados são publicados exatamente como são recebidos (arquivos do Excel ou PowerPoint aparecerão dessa forma on-line). Por favor, envie seu material junto com o artigo e forneça uma legenda concisa e descritiva para cada arquivo suplementar. Se você deseja fazer alterações no material suplementar durante qualquer etapa do processo, certifique-se de fornecer um arquivo atualizado. Não anote quaisquer correções em uma versão anterior. Por favor, desabilite a opção “Controlar alterações” nos arquivos do Microsoft Office, pois estas aparecerão na versão publicada.

DADOS DA PESQUISA

Esta revista incentiva e permite que você compartilhe dados que suportem a publicação de sua pesquisa onde for apropriado, e permite que você interligue os dados com seus artigos publicados. Dados de pesquisa referem-se aos resultados de observações ou experimentação que validam os achados da pesquisa. Para facilitar a reprodutibilidade e o reuso dos dados, esta revista também incentiva a compartilhar seu software, código, modelos, algoritmos, protocolos, métodos e outros materiais úteis relacionados com o projeto.

A seguir são mostradas várias maneiras pelas quais você pode associar dados ao seu artigo ou fazer uma declaração sobre a disponibilidade de seus dados ao enviar seu

manuscrito. Se estiver compartilhando dados de uma dessas maneiras, você é encorajado a citar os dados em seu manuscrito e na lista de referências. Consulte a seção “Referências” para obter mais informações sobre a citação de dados. Para obter mais informações sobre o depósito, compartilhamento e uso de dados de pesquisa e outros materiais de pesquisa relevantes, visite a página de Dados de Pesquisa.

Vinculação de dados

Se você disponibilizou seus dados de pesquisa em um repositório de dados, é possível vincular seu artigo diretamente ao conjunto de dados. A Elsevier colabora com uma série de repositórios para vincular artigos no ScienceDirect a repositórios relevantes, dando aos leitores acesso a dados subjacentes que lhes dará uma melhor compreensão da pesquisa descrita.

Existem diferentes maneiras de vincular seus conjuntos de dados ao seu artigo. Quando disponível, você pode vincular diretamente seu conjunto de dados ao seu artigo, fornecendo as informações relevantes no sistema de submissão. Para mais informações, visite a página de vinculação de bancos de dados.

Para os repositórios de dados suportados, um banner do repositório aparecerá automaticamente ao lado do seu artigo publicado no ScienceDirect.

Além disso, você pode vincular a dados ou entidades relevantes através de identificadores dentro do texto de seu manuscrito, utilizando o seguinte formato: Banco de Dados: xxxx (por ex., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

Esta revista é compatível com o Mendeley Data, permitindo que você deposite quaisquer dados de pesquisa (incluindo dados brutos ou processados, vídeos, códigos, software, algoritmos, protocolos

e métodos) associados ao seu manuscrito em um repositório de acesso aberto e gratuito. Durante o processo de submissão, depois de fazer o upload de seu manuscrito, você terá a oportunidade de fazer o upload de seus conjuntos de dados relevantes diretamente para o Mendeley Data. Os conjuntos de dados serão listados e estarão acessíveis diretamente aos leitores ao lado do seu artigo publicado on-line.

Para mais informações, visite a página Mendeley Data para Revistas.

Declaração de dados

Para promover a transparência, encorajamos os autores a declarar a disponibilidade de seus dados ao submeter o artigo. Isso pode ser um requisito da instituição de fomento. Caso seus dados não estejam disponíveis para acesso ou não forem adequados para publicação, você terá a oportunidade de descrever o motivo durante o processo de submissão, afirmando, por exemplo, que os dados da pesquisa são confidenciais. A declaração aparecerá com seu artigo publicado no ScienceDirect. Para obter mais informações, visite a página sobre declaração de dados.

APÓS A ACEITAÇÃO

Disponibilidade do artigo aceito

Esta revista disponibiliza os artigos on-line o mais rapidamente possível após a aceitação. Um identificador de objeto digital (DOI — Digital Object Identifier) é atribuído a seu artigo, tornando-o totalmente citável e pesquisável por título, nome(s) do(s) autor(es) e o texto completo.

Provas

Um conjunto de provas (em arquivos PDF) será enviado por e-mail para o autor correspondente ou um link será fornecido no e-mail para que os autores possam baixar os próprios arquivos. A Elsevier agora fornece aos autores provas em PDF que podem receber anotações; para isso, você precisará fazer o download do programa Adobe Reader, versão 9 (ou posterior). As instruções sobre como fazer anotações nos arquivos PDF acompanharão as provas (também fornecidas on-line). Os requisitos exatos do sistema são fornecidos no site da Adobe.

Se não desejar usar a função de anotações em PDF, você pode listar as correções (incluindo as respostas ao Formulário de Consulta) e devolvê-las por e-mail. Por favor, liste suas correções citando o número da linha. Se, por qualquer motivo, isso não for possível, marque as correções e quaisquer outros comentários (incluindo as respostas ao Formulário de consulta) em uma impressão de sua prova, escaneie as páginas e devolva-as por e-mail. Por favor, use esta prova apenas para verificar a composição, edição, integridade e exatidão do texto, tabelas e figuras. Alterações significativas no artigo aceito para publicação só serão consideradas nesta etapa com permissão do editor-chefe da revista. Faremos todo o possível para que seu artigo seja publicado com rapidez e precisão. É importante garantir que todas as correções sejam enviadas

de volta para nós em uma única comunicação: por favor, verifi que atentamente antes de responder, pois a inclusão de quaisquer correções subsequentes não será garantida. A revisão é responsabilidade exclusiva do autor.

PERGUNTAS DOS AUTORES

Visite o Centro de Apoio da Elsevier para encontrar as respostas de que você precisa. Aqui você encontrará tudo, desde Perguntas Frequentes até maneiras de entrar em contato.

Você também pode verificar o status do seu artigo enviado ou verificar quando seu artigo aceito será publicado.

11.4 Confirmação da submissão do artigo

24/03/2024, 11:19

Gmail - Confirming submission to Jornal de Pediatria



Caroline Montagner Dias

Confirming submission to Jornal de Pediatria

1 mensagem

Jornal de Pediatria <em@editorialmanager.com> 24 de março de 2024 às 11:16

Responder a: Jornal de Pediatria <assessoria@jped.com.br>

Para: Caroline Montagner Dias <cmontagnerdias@gmail.com>

This is an automated message.

Gut Microbiome by shotgun and fecal calprotectin in food protein-induced allergic proctocolitis infants Dear Ms Dias,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Jornal de Pediatria.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/jpediatria/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Jornal de Pediatria

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub:

<https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site:

<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials.

You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

At Elsevier, we want to help all our authors to stay safe when publishing. Please be aware of fraudulent messages requesting money in return for the publication of your paper. If you are publishing open access with Elsevier, bear in mind that we will never request payment before the paper has been accepted. We have prepared some guidelines (<https://www.elsevier.com/connect/authors-update/seven-top-tips-on-stopping-apc-scams>) that you may find helpful, including a short video on Identifying fake acceptance letters (<https://www.youtube.com/watch?v=o5l8thD9XtE>). Please remember that you can contact Elsevier's Researcher Support team (<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>) at any time if you have questions about your manuscript, and you can log into Editorial Manager to check the status of your manuscript (https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/29155/c/10530/supporthub/publishing/kw/status/).

11.5 Questionário:

QUESTIONÁRIO

Data: ___/___/_____

Nome paciente:

Data de nascimento: ___/___/_____

Responsável:

Telefones de contato:

E- mail de contato:

—> INFORMAÇÕES GERAIS:

Sexo: Masculino Feminino

Peso (atual):

Estatura (atual):

Cor ou raça/etnia:

Cor: Branca Preta Parda Amarela Raça/etnia indígena

—> SINTOMAS E DIAGNÓSTICO:

Sintomas no diagnóstico (assinalar os sintomas apresentados pelo bebê):

Sangue nas fezes Muco nas fezes Diarreia Assadura
 Cólica Vômitos Gases Choro / irritabilidade
 Perda de peso Não ganho de peso
 Lesões de pele Dermatite atópica

Quando começou o sangue nas fezes (idade)?

< 1 mês de idade Entre 3-4 meses
 Entre 1-2 meses Entre 4-5 meses
 Entre 2-3 meses Entre 5-6 meses

Data do diagnóstico de APLV: ___/___/_____

→ GESTAÇÃO / PARTO:Tipo: Vaginal CesáreaUso de antibiótico na gestação: Sim Não
Se sim, qual?Uso de antibiótico pela mãe no parto: Sim Não
Se sim, qual?Uso de antibiótico pela mãe durante a lactação: Sim Não
Se sim, qual?**→ DADOS DO NASCIMENTO:**

Idade gestacional:

Peso:

Comprimento:

Uso de antibiótico ou outra medicação antes da alta da maternidade:

 Sim Não

Se sim, qual?

→ USO DE FÓRMULAS:Fez uso de alguma fórmula? Sim Não

Se sim, quando usou?

Qual fórmula?

Por quanto tempo?

→ OUTRAS INFORMAÇÕES:Problemas de saúde: Sim Não

Se sim, qual:

Uso de medicação contínua: Sim Não

Se sim:

Vitamina A+D Ferro Qual?Colicalm Outros Qual?

—> HISTÓRIA FAMILIAR: em parente de primeiro grauAlergia alimentar: Sim Não Quem? Pai Mãe Irmã(o)Dermatite atópica: Sim Não Quem? Pai Mãe Irmã(o)Rinite alérgica: Sim Não Quem? Pai Mãe Irmã(o)Asma: Sim Não Quem? Pai Mãe Irmã(o)

11.6 Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(s) responsável(is),

Gostaríamos de obter o seu consentimento para o menor _____, participar como voluntário da pesquisa intitulada “**Relação entre os oligossacarídeos do leite materno e microbioma intestinal em lactentes com proctocolite alérgica em duas regiões do Brasil**”

O(s) objetivo(s) deste estudo é avaliar a flora intestinal de crianças menores de 6 meses, com sangue nas fezes devido a alergia alimentar, e avaliar alguns açúcares presentes no leite das suas mães (chamados oligossacarídeos); além disso iremos comparar com a flora intestinal de crianças que não tenham sangramento nem alergia, e os açúcares do leite das mães destas crianças também. Os resultados contribuirão para conhecer a flora intestinal das crianças que possuem sangue nas fezes por alergia alimentar e também das crianças saudáveis, além de aprofundarmos no conhecimento da composição de açúcares do leite materno, e se existe alguma diferença nesta composição entre as mães de crianças alérgicas e não alérgicas. Esses resultados podem auxiliar futuros estudos para propor intervenções que melhorem os estados alérgicos.

A participação nesta pesquisa consistirá em: responder um questionário com dados gerais da criança desde o nascimento até o momento da consulta, informações dos pais e irmãos (quando for o caso). Será realizado exame físico na criança com aferição de peso, comprimento e circunferência da cabeça. Após será coletada uma pequena quantidade de fezes que estejam na fralda da criança, que será enviado para análise.

São esperados os seguintes benefícios desta participação (benefícios): auxiliar a caracterização da flora intestinal das crianças com sangue nas fezes, causado por alergia, bem como crianças saudáveis e a composição do leite das respectivas mães, podendo servir de base para no futuro surgirem novos tratamentos. Considerando que toda pesquisa oferece algum tipo de risco, nesta pesquisa os riscos são mínimos, visto

que faz apenas coleta de dados por questionário, coleta de fezes já eliminadas pela criança e coleta de uma pequena quantidade de leite materno por ordenha manual.

As informações fornecidas por você e seu filho serão consideradas confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os participantes da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma, garantindo o anonimato.

Não será cobrado nada, não haverá gastos decorrentes de sua participação, se houver algum dano decorrente da pesquisa, o participante será indenizado nos termos da Lei.

Gostaríamos de deixar claro que a participação é voluntária e você e seu filho tem o direito de desistir da participação nesta pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade ou prejuízo de qualquer natureza e sem que isso prejudique o acesso do seu filho aos demais serviços da instituição.

Desde já, agradecemos a atenção e a participação e colocamo-nos à disposição para maiores informações.

Cristina Targa Ferreira
gastropedhcsa@gmail.com

Telefone: (51) 3214-8647

E-mail:

Você poderá ainda entrar em Contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação José Luiz Egydio Setúbal, Avenida Angélica, 2071, 1º andar – Secretaria do CEP, Higienópolis - CEP 01227-200 - São Paulo/SP, no telefone: (11) 94513-2583, de segunda e terça-feira, das 13h às 16h se você tiver qualquer dúvida com relação aos seus direitos como participante do projeto de pesquisa. Você também poderá entrar em contato pelo e-mail: etica.pesquisa@fundacaojles.org.br.

Ainda para dúvidas com relação aos seus direitos como participante do projeto de pesquisa, você poderá entrar em contato também com o Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital da Criança Santo Antônio/Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Avenida Independência, 155, andar M1, secretaria do CEP, Centro Histórico de Porto Alegre/RS, no telefone: (51) 3214-8997.

Esse termo terá suas páginas rubricadas pelo pesquisador que aplicará o termo e pelo(s) responsável (is) e será assinado em duas vias, das quais uma ficará com o participante e a outra com pesquisador.

Ao fornecer o meu consentimento assinando este Termo, eu declaro que recebi todas as informações sobre o projeto de pesquisa de forma clara e completa e que minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente. Tenho conhecimento de que posso desistir da participação do meu filho a qualquer momento e que receberei uma via deste documento assinado por mim.

Participante

Nome Completo do Participante da Pesquisa

Mãe/Representante Legal

Nome Completo da Mãe/Representante Legal, em letra legível

Assinatura da Mãe/Representante Legal

Data (dd-MMM-aaaa)

Pesquisador

Eu confirmo que expliquei a natureza e o objetivo desta pesquisa, e os possíveis riscos e benefícios ao participante da pesquisa. Declaro que cumprirei as exigências contidas nos itens IV.3 e IV.4, este último se pertinente, conforme Resolução CNS nº 466/12.

Nome do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador

Data (dd-MMM-aaaa)