

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ASSOCIAÇÃO DO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL PRÉ-GESTACIONAL E
GANHO DE PESO GESTACIONAL E A MICROBIOTA INTESTINAL INFANTIL
NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA

NATHALIA CRISTINA DE FREITAS COSTA

RIO DE JANEIRO

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Associação do índice de massa corporal pré-gestacional e ganho de peso gestacional e a microbiota intestinal infantil no primeiro mês de vida

Nathalia Cristina de Freitas Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN), do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Nutrição Humana.

Orientador: Professor Dr. Gilberto Kac

Rio de Janeiro
Fevereiro, 2020

ASSOCIAÇÃO DO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL PRÉ-GESTACIONAL E
GANHO DE PESO GESTACIONAL E A MICROBIOTA INTESTINAL INFANTIL
NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA

Nathalia Cristina de Freitas Costa

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO DO INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DE GRAU DE **MESTRE EM NUTRIÇÃO HUMANA**.

Examinada por:

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Revisor)

Prof. Dra. Taís de Souza Lopes

Universidade Federal do Rio de Janeiro (Examinador)

Prof. Dra. Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vivolo

Universidade de São Paulo (Examinador)

Prof. Dr. Gilberto Kac

Universidade Federal do Rio de Janeiro (Orientador)

RIO DE JANEIRO, RJ-BRASIL

FEVEREIRO, 2020

Costa, Nathalia Cristina de Freitas

Associação do índice de massa corporal pré-gestacional e ganho de peso gestacional e a microbiota intestinal infantil no primeiro mês de vida / Nathalia Cristina de Freitas Costa – Rio de Janeiro: UFRJ/INJC, 2020.

XIII, 162 p: il.; 29,7 cm.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Kac

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2020.

Referências Bibliográficas: p. 80-97

1. Microbiota intestinal infantil. 2. Índice de massa corporal pré-gestacional. 3. Ganho de peso gestacional. 4. Aleitamento materno. I. Kac, Gilberto. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, INJC, Programa de Pós-graduação em Nutrição. III. Associação do índice de massa corporal pré-gestacional e ganho de peso gestacional e a microbiota intestinal infantil no primeiro mês de vida.

Dedicatória

Dedico minha dissertação a meus pais, Claudia e Antônio, pelo amor, educação e apoio e a minhas avós, Sandra e Aparecida, pelo cuidado e amor.

Agradecimentos

A Deus pelo amor e amparo incondicional.

A meu pai, Antônio, e minha mãe, Claudia, que sempre foram incansáveis em tudo que foi necessário para minha educação, me apoiando e amparando, e pelo amor incondicional de sempre.

A meu irmão Pedro pelo apoio e incentivo durante minha trajetória acadêmica.

Aos meus avôs, Aparecida, Sandra, Antônio e Constantino, pela ajuda em toda a minha trajetória escolar com o carinho e cuidado de sempre.

A minhas madrinhas, Graça e Sabrina, que sempre se felicitaram com a minha alegria e sempre que possível colaboraram com minha trajetória.

Ao meu marido, Ayrton, pelo incentivo, apoio e cuidado durante esses anos de vida acadêmica, especialmente durante esses dois anos de mestrado, estando comigo nos melhores e piores momentos.

A meus primos, Geovani, Diego, Samuel e Larissa, pelo amor e carinho.

A minha amiga Márcia (*in memoriam*) que durante nossa intensa e curta amizade me inspirou em tantas coisas, dentre elas a vida acadêmica.

A minhas amigas de graduação, Geannetti, Leysimar, Vanessa, Hellen, Carina e Juliana, pelo carinho e amizade.

A meu orientador, prof. Gilberto, durante a iniciação científica e o mestrado, pelas trocas de conhecimento imensuráveis, pelo apoio e oportunidades em minha recente trajetória acadêmica.

A minhas co-orientadoras de iniciação científica que hoje eu tenho o privilégio de chamar de amigas, Camila, Amanda e Lorena, que me ajudaram e ensinaram com muito carinho, e pela amizade e apoio na rotina do dia-a-dia.

As minhas amigas do projeto Curvas, Thais, Monica e Dayana, pelo conhecimento e pelo crescimento que tanto colaboraram nessa minha trajetória.

A ao grupo do Observatório de Epidemiologia Nutricional, muitos já seguiram seu caminho de sucesso, e outros na convivência atual, por todo o aprendizado e carinho.

A todos os professores pelas trocas de conhecimentos.

Epígrafe

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Lista de quadros

Quadro 1. Características dos estudos que avaliaram a relação entre IMC pré-gestacional e o ganho de peso gestacional e a microbiota intestinal infantil.	27
Quadro 2. Classificação do estado nutricional pré-gestacional materno e recomendação de ganho de peso gestacional.....	38
Quadro 3. Definição de tipo de aleitamento materno.....	40
Quadro 4. Definição das variáveis combinadas de IMC pré-gestacional e GPG com o AM.....	41

Lista de tabelas

Artigo

Tabela 1. Características dos pares de mães-filhos acompanhados no Rio de Janeiro, Brasil, 2016-2019.

Characteristics of mother-child pairs followed in Rio de Janeiro, Brazil, 2016–2019. 60

Tabela S1. Características dos pares de mães-filhos de acordo com o IMC pré-gestacional e o tipo de aleitamento materno

Characteristics of mother-child pairs according to combined categories of pre-pregnancy body mass index and breastfeeding. 69

Tabela S2. Características dos pares de mães-filhos de acordo com o ganho de peso gestacional e o tipo de aleitamento materno

Characteristics of mother-child pairs according to combined categories of gestational weight gain adequacy and breastfeeding. 71

Tabela S3. Diferenças entre a alfa diversidade da microbiota intestinal infantil de acordo com o ganho de peso gestacional e o tipo de aleitamento

Differences between infant gut microbiota alpha-diversity (Shannon Index) according to gestational weight gain adequacy and breastfeeding. 73

Tabela S4. Regressão de alfa diversidade com a variável combinada de ganho de peso gestacional e tipo de aleitamento materno.

Regression of alpha-diversity with combined variable including gestational weigh gain and breastfeeding status. 74

Lista de figuras

Figura 1. Classificação taxonômica do subconjunto de microrganismos encontrados no trato gastrointestinal humano.....	20
Figura 2. Transferência de microbiota materna.....	24
Figura 3. Fluxograma adaptado do estudo maior indicando o detalhamento da linha de base (28-35 semanas gestacionais) e da onda de seguimento 3 (26-50 dias pós-parto).	35
Figura 4. Fluxo de coleta e armazenamento das amostras de fezes infantil.....	39

Artigo

Figura 1. Composição da microbiota intestinal infantil de acordo com o gênero com um mês.

Infant gut microbiota composition at genus level at one month..... 63

Figura 2. (A) Alfa diversidade (Shannon index), (B) espécies observadas e (C) índice de Faith – diversidade filogenética da microbiota intestinal infantil de acordo com o IMC pré-gestacional.

Infant gut microbiome (A) alfa-diversity (Shannon index), (B) observed species and (C) Faith index - phylogenetic diversity (PD) according to pre-pregnancy BMI. 64

Figura 3. (A) Alfa diversidade (Shannon index), (B) espécies observadas e (C) índice de Faith – diversidade filogenética da microbiota intestinal infantil de acordo com o ganho de peso gestacional.

Infant gut microbiome (A) alfa-diversity (Shannon index), (B) observed species and (C) Faith index - phylogenetic diversity (PD) according to gestational weight gain. 65

Figura 4. Análise de coordenadas principais de acordo com IMC pré-gestacional para (A) dissimilaridade de Bray-Curtis, (B) Unweight UniFrac e (C) Weight UniFrac.

Principal coordinate analysis according to pre-pregnancy BMI for (A) Bray-Curtis dissimilarity, (B) Unweight UniFrac and (C) Weight UniFrac. 66

Figura 5. Análise de coordenadas principais de acordo com ganho de peso gestacional para (A) dissimilaridade de Bray-Curtis, (B) Unweight UniFrac e (C) Weight UniFrac.

Principal coordinate analysis according to gestational weight gain adequacy for (A) Bray-Curtis dissimilarity, (B) Unweight UniFrac and (C) Weight UniFrac. 67

Figura 6. Tamanho do efeito da análise discriminante linear de acordo com o (A) IMC pré-gestacional e o (B) ganho de peso gestacional.

Linear discriminant analysis effect size according to (A) pre-pregnancy BMI and (B) GWG. 68

Figura S1. Composição da microbiota intestinal infantil de acordo o (A) IMC pré-gestacional e o tipo de aleitamento materno e de acordo com o (B) ganho de peso gestacional e o tipo de aleitamento materno

Infant gut microbiota composition at 1 month by (A) maternal pre-pregnancy BMI and breastfeeding status and by (B) GWG and breastfeeding status. 75

Figura S2. (A) Alfa diversidade (Shannon index), (B) espécies observadas e (C) índice de Faith – diversidade filogenética da microbiota intestinal infantil de acordo com o IMC pré-gestacional e o tipo de aleitamento materno.

Infant gut microbiome (A) alfa-diversity (Shannon index), (B) observed species and (C) Faith index - phylogenetic diversity (PD) according to pre-pregnancy BMI and breastfeeding status. 76

Figura S3. (A) Alfa diversidade (Shannon index), (B) espécies observadas e (C) índice de Faith – diversidade filogenética da microbiota intestinal infantil de acordo com o ganho de peso gestacional e o tipo de aleitamento materno.

Infant gut microbiome (A) alfa-diversity (Shannon index), (B) observed species and (C) Faith index - phylogenetic diversity (PD) according to GWG and breastfeeding status. 77

Figura S4. Análise de coordenadas principais de acordo com IMC pré-gestacional e o tipo de aleitamento materno para (A) dissimilaridade de Bray-Curtis, (B) Unweight UniFrac e (C) Weight UniFrac.

Principal coordinate analysis according to pre-pregnancy BMI and breastfeeding for (A) Bray-Curtis dissimilarity, (B) Unweight UniFrac and (C) Weight UniFrac. 77

Figura S5. Análise de coordenadas principais de acordo com ganho de peso gestacional e o tipo de aleitamento materno para (A) dissimilaridade de Bray-Curtis, (B) Unweight UniFrac e (C) Weight UniFrac.

Principal coordinate analysis according to GWG and breastfeeding for (A) Bray-Curtis dissimilarity, (B) Unweight Unifrac and (C) Weight Unifrac. 78

Lista de abreviações

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AM	Aleitamento Materno
AME	Aleitamento Materno Exclusivo
APC	Aleitamento Predominante/Complementar
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
GPG	Ganho de Peso Gestacional
OLH	Oligossacarídeos do Leite Humano
IMC	Índice de Massa Corporal
IOM	Instituto de Medicina (<i>Institute of Medicine</i>)
MI	Microbiota Infantil
NIH	Instituto Nacional de Saúde (<i>National Institute of Health</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
QUIIME 2	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
RN	Recém-Nascido
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossômico
SG	Semana Gestacional
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Sumário

Apresentação	14
Resumo	15
Abstract	16
1. Introdução	17
2. Revisão de literatura	19
2.1 Microbiota intestinal infantil.....	19
2.2 Transferência de microbiota materna.....	22
2.3 Estado nutricional materno e microbiota intestinal infantil.....	25
2.4 Aleitamento materno e microbiota intestinal infantil	30
3. Justificativa	32
4. Pergunta de estudo e hipóteses	33
5. Objetivos	34
5.1. Objetivo geral	34
5.2. Objetivos específicos	34
6. Métodos	35
6.1 Delineamento do estudo, área e população-alvo.....	35
6.2 Captação das participantes	36
6.3 Critérios de elegibilidade	36
6.4 Critérios de exclusão.....	36
6.5 Variáveis do estudo.....	37
6.5.1 Coleta de dados.....	37
6.5.2 Antropometria materna.....	37
6.5.3 Ganho de peso gestacional	38
6.5.4 Coleta de amostra de fezes	38
6.5.5 Análise de microbiota intestinal infantil.....	39
6.5.6 Aleitamento materno	40
6.5.7 Variáveis combinadas segundo IMC, GPG e AM.....	40
6.5.8 Covariáveis	41
6.6 Análise estatística	41
6.7 Aspectos éticos	42
6.8 Participação do autor	42
7. Resultados	43
8. Considerações finais	79

Anexos..... 92

Apresentação

A presente dissertação faz parte de um estudo de maior abrangência intitulado “Compostos bioativos do leite humano e associação com a saúde materna e o desenvolvimento infantil” desenvolvido pelos pesquisadores do Observatório de Epidemiologia Nutricional do Instituto de Nutrição Josué de Castro (INJC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Trata-se de uma coorte prospectiva de acompanhamento de gestantes e seus filhos, cuja linha de base iniciou-se no terceiro trimestre gestacional (28-35 semanas gestacionais (SG)) e terminou quando a criança completou um ano de vida.

A coleta de dados ocorreu na Clínica da Família Assis Valente, situada na Ilha do Governador, zona norte do município do Rio de Janeiro. O recrutamento aconteceu entre Outubro de 2016 a Janeiro de 2019. O estudo maior foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e pela Universidade de Columbia, por meio de parceria com o professor Brent Williams. A produção desse material foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) com a concessão de uma bolsa de estudo.

Esta dissertação tem o objetivo de investigar as associações do índice de massa corporal (IMC) pré-gestacional e do ganho de peso gestacional (GPG) com a composição e diversidade de microbiota intestinal (MI) infantil no primeiro mês de vida, considerando o tipo de aleitamento materno (AM) como efeito modificador dessas relações.

Este documento está de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e encontra-se subdividido das seções: resumo/abstract, introdução, revisão de literatura, justificativa, pergunta do estudo e hipóteses, objetivos, método, resultados e discussão, considerações finais, referências e anexos.

As seções resultados e discussão estão dispostas como o artigo, intitulado *Relationship between maternal pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain with infant gut microbiome: Results from a prospective birth cohort* a ser submetido ao *Journal of Nutrition*.

Resumo

Introdução: O excesso de peso materno pode alterar a microbiota materna durante a gravidez e essa microbiota alterada pode ser transmitida para o filho. Além disso, a amamentação também afeta a microbiota intestinal infantil. **Objetivo:** Avaliar as associações do índice de massa corporal (IMC) pré-gestacional e do ganho de peso gestacional (GPG) com a composição e diversidade de microbiota intestinal infantil (MI) no primeiro mês de vida, considerando o tipo de aleitamento materno (AM) como efeito modificador dessas relações. **Métodos:** Coorte prospectiva com 56 pares de mãe e filhos realizada no Rio de Janeiro, Brasil. O IMC pré-gestacional foi classificado como adequado ($<25,0 \text{ kg/m}^2$) e sobrepeso/obesidade ($\geq 25,0 \text{ kg/m}^2$). O GPG foi categorizado em adequado ou excessivo, de acordo com as recomendações do Instituto de Medicina Americano. O tipo de AM foi classificado como AM exclusivo (AME) e AM predominante/complementar (APC). As amostras de fezes (26-50 dias) foram sequenciadas usando gene 16S rRNA (MiSeq). As análises estatísticas incluíram: índices de alfa diversidade, beta diversidade, teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*, regressão linear múltipla, análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) e tamanho do efeito da análise discriminante linear (do inglês, *Linear Discriminant Analysis Effect Size* - LEfSe). **Resultados:** A composição da MI foi diferente para filhos de mães com IMC pré-gestacional de sobrepeso/obesidade e GPG excessivo. Observou-se maior mediana de alfa diversidade em crianças nascidas de mães com GPG excessivo e essa categoria de GPG foi positivamente associada a alfa diversidade. A MI de lactentes de mães com IMC de sobrepeso/obesidade foram enriquecidas com o gênero *Dialister* e as espécies *Lactobacillus ruminis*, *Haemophilus parainfluenzae* e *Veillonella parvula*. Lactentes de mães com GPG excessivo apresentaram maior abundância do gênero *Staphylococcus*, família *Staphylococcaceae*, ordem *Bacillales* e classe *Bacilli*. O APC modificou a composição da microbiota intestinal infantil nos grupos com excesso de peso materno, aumentando a abundância dos gêneros *Streptococcus* e *Veillonella*, e diminuindo a abundância de *Bifidobacterium*. **Conclusão:** O excesso de peso materno modificou sobretudo a abundância da MI infantil e o APC modificou o efeito do excesso do IMC pré-gestacional e do GPG.

Palavras-chave: Índice de massa corporal pré-gestacional; Ganho de peso gestacional; Microbiota intestinal infantil; aleitamento materno.

Abstract

Background: Maternal obesity may change maternal microbiota during pregnancy and this altered microbiota can be transmitted to the infant. Moreover, infant feeding mode can also affect the infant gut microbiota. **Objective:** To evaluate the association of pre-pregnancy excessive body mass index (BMI) and gestational weight gain (GWG) adequacy on infant gut microbiota and the role of breastfeeding on this association. **Methods:** Prospective cohort conducted in Rio de Janeiro, Brazil. Maternal pre-pregnancy BMI (<25; ≥ 25 kg/m², normal/excessive) and GWG adequacy (adequate; excessive) were the exposures and breastfeeding practice status (exclusively breastfeeding EBF; predominant/complementary feeding PCF) was analyzed as an effect modifier. Infant stool samples were collected for 56 infants between 26-50 days. Samples were sequenced using 16S rRNA gene sequencing (MiSeq). Analysis included alpha diversity indices, beta diversity metrics and Wilcoxon-Mann-Whitney Test, linear regression, permutational multivariate analysis of variance and linear discriminant analysis effect size. **Results:** Microbiota composition presented higher abundance of *Bifidobacterium*, *Veillonella* and *Escherichia* and an increase of *Escherichia* and decrease of *Streptococcus* among pre-pregnancy excessive BMI and excessive GWG women. A higher median alpha diversity in infants born from mothers with excessive GWG was observed, and excessive GWG was positively associated with alpha diversity. The microbiota of infants born from mothers with excessive pre-pregnancy BMI were enriched with *Dialister* genus and *Lactobacillus ruminis*, *Haemophilus parainfluenzae* and *Veillonella parvula* species and those born from mothers with excessive GWG had higher abundance of *Staphylococcus* genus, *Staphylococcaceae* family, *Bacillales* order and *Bacilli* class. PCF status decreased the abundance of *Bifidobacterium* only among excessive BMI/GWG. Excessive GWG and PCF practice were associated with high infant gut microbiota alpha diversity. **Conclusion:** Maternal overweight modified infant gut microbiota abundance and PCF seems to modify the effect of excessive GWG and pre-pregnancy BMI on infant gut microbiota.

Keywords: Pre-pregnancy body mass index; Gestational weight gain; Breastfeeding; gastrointestinal microbiome; Infant.

1. Introdução

A microbiota humana está concentrada no intestino formando a MI (LOZUPONE *et al.*, 2012; YANG, I. *et al.*, 2016). Estudos recentes demonstraram que a MI humana possui papel essencial no desenvolvimento fetal e infantil. Essa importância ocorre especialmente nos primeiros mil dias de vida (da concepção ao segundo ano de vida), período em que se dá, simultaneamente, a colonização da MI infantil e o desenvolvimento dos sistemas biológicos (ROBERTSON *et al.*, 2019; SELMA-ROYO *et al.*, 2019).

A MI infantil desempenha funções importantes no crescimento e maturação do sistema imunológico, endócrino, tecido mucoso e sistema nervoso central nos primeiros meses de vida (BRANISTE *et al.*, 2014; MACPHERSON *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2016). Diversos fatores exercem influência na MI nos primeiros meses de vida, a exemplo do IMC pré-gestacional, o GPG, a dieta materna durante a gravidez, o uso de antibiótico perinatal, o tipo de parto, a idade gestacional (IG) no nascimento, o tipo de AM e a alimentação complementar (BACKHED *et al.*, 2015; YASSOUR *et al.*, 2016).

O excesso de peso materno tem sido associado com a origem e desenvolvimento de doenças em seus filhos (DRAKE; REYNOLDS, 2010). A hipótese da transmissão de uma microbiota obesogênica para os filhos, durante a gestação e a lactação constitui-se em um dos possíveis mecanismos explicativos para essa relação (MUELLER *et al.*, 2015; WALLACE *et al.*, 2016). As células dendríticas parecem ser capazes de transportar bactérias do lúmen intestinal para a circulação linfática, permitindo que atinjam outros órgãos, como placenta, útero e glândulas mamárias (NIKKARI *et al.*, 2001; STINSON *et al.*, 2017).

Alguns estudos já demonstraram diferentes padrões de composição de MI infantil de acordo com o estado nutricional materno pré-gestacional e durante a gestação (CHU *et al.*, 2016; COLLADO *et al.*, 2010; GALLEY *et al.*, 2014; MUELLER *et al.*, 2016; STANISLAWSKI *et al.*, 2017). Entretanto, os resultados ainda são inconclusivos (DREISBACH *et al.*, 2020). Alguns estudos demonstraram diminuição da abundância das *Bifidobacterias* na MI infantil quando expostas ao sobrepeso materno (COLLADO *et al.*, 2010; SANTACRUZ *et al.*, 2010; STANISLAWSKI *et al.*, 2017). Esse gênero de bactéria é encontrado em grande proporção em crianças nos primeiros meses de vida (HO *et al.*, 2018). Esses estudos também observaram aumento do filo de *Firmicutes* (COLLADO *et al.*, 2008; 2010; GALLEY *et al.*, 2014; MUELLER *et al.*, 2016; SANTACRUZ *et al.*, 2010; STANISLAWSKI *et al.*, 2017), frequentemente, relacionado

com a presença de doenças como dermatite tópica, desordens intestinais e autismo (LIU *et al.*, 2019; MAYER *et al.*, 2014; RANGEL; PALLER, 2018).

Adicionalmente, o tipo de AM nos primeiros meses de vida parece ser capaz de modular a colonização precoce do intestino infantil (MINIELLO *et al.*, 2015). Isso ocorre porque o leite humano é composto por uma série de bactérias (MILANI *et al.*, 2017), células imunológicas e imoglobulinas e oligossacarídeos (OLH). Os OLH são carboidratos complexos não digeríveis pelo intestino humano, que servem de substrato para o crescimento das bactérias da MI consideradas potencialmente benéficas (JAMES *et al.*, 2019; MANTHEY *et al.*, 2014). Por outro lado, a oferta de fórmulas infantis também tem impacto na MI infantil. Crianças alimentadas parcialmente ou exclusivamente por fórmulas infantis apresentam maior diversidade de MI, por não terem contato com a MI e os OLH do leite materno e por serem expostos a microbiota resultante da higiene e manipulação desses alimentos.

Crianças amamentadas apresentam MI com maior abundância de *Bifidobacteria* quando comparados a crianças alimentadas com fórmula (HO *et al.*, 2018). Isso ocorre, sobretudo, por esse gênero de bactérias usarem os OLH como substrato para seu crescimento. Além disso, o tipo de AM parece impactar também na espécie de *Bifidobactéria* encontrada. A *B. infantis* é tipicamente encontrada na MI de crianças em AM exclusivo (AME) e a *B. fragilis* na MI de crianças alimentados apenas com fórmula infantil (PENDERS *et al.*, 2006).

2. Revisão de literatura

2.1 Microbiota intestinal infantil

A microbiota humana é definida como um complexo de microrganismos que vivem de forma simbiótica no corpo humano. A microbiota é composta principalmente de bactérias, mas também de vírus, fungos, arqueias e bacteriófagos (MILANI *et al.*, 2017). As bactérias encontradas na MI podem ser taxonomicamente classificadas de forma hierárquica em filo, classe, ordem, família, gênero e espécie (**Figura 1**) (CHUNG *et al.*, 2018).

O filo *Firmicutes* é composto por diferentes gêneros, como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Ruminococcus*. O aumento de alguns desses gêneros está relacionado com a presença e desenvolvimento de doenças. Indivíduos com excesso de peso apresentam diferença na proporção de *Firmicutes* quando comparado com eutróficos (GERARD, 2017). Em crianças do espectro autista tem sido observado maior abundância de gêneros específicos de *Firmicutes* quando comparadas com as com desenvolvimento típico (CAO *et al.*, 2013). Esse filo também está associado à síndrome do intestino irritável e à dermatite atópica (MAYER *et al.*, 2014; RANGEL; PALLER, 2018; VOGT *et al.*, 2017).

Os *Bacteroidetes* exercem funções essenciais, incluindo a produção de energia ao participarem do catabolismo de polissacarídeos complexos (CHU *et al.*, 2016; MARCOBAL *et al.*, 2011; SALYERS *et al.*, 1977), regulação da imunidade intestinal, e promoção da síntese de células T e de interleucina (MAZMANIAN *et al.*, 2005; ROUND; MAZMANIAN, 2010). A depleção de *Bacteroidetes* tem sido associada com desenvolvimento de asma, alergias e obesidade (BJORKSTEN *et al.*, 1999; RIVA *et al.*, 2017). Outros estudos, no entanto, encontraram associações direta entre abundância de *Bacteroides* e aumento do risco de obesidade (VAEL *et al.*, 2011) e bronquiolite (HASEGAWA *et al.*, 2016).

As *Acnobacterias* são representadas principalmente pelo gênero das *Bifidobactérias* (ARUMUGAM *et al.*, 2011), e estão entre as primeiras colonizadoras do intestino de recém-nascidos (RN) e lactentes. Essas bactérias desempenham funções essenciais na modulação da fisiologia da mucosa e imunidade inata do hospedeiro (DURANTI *et al.*, 2016; ROUND; MAZMANIAN, 2009; TURRONI *et al.*, 2014). Além disso, esse gênero de bactéria está relacionado com o AM, principalmente pela presença dos OLH (HO *et al.*, 2018; LÉBOUDER *et al.*, 2006).

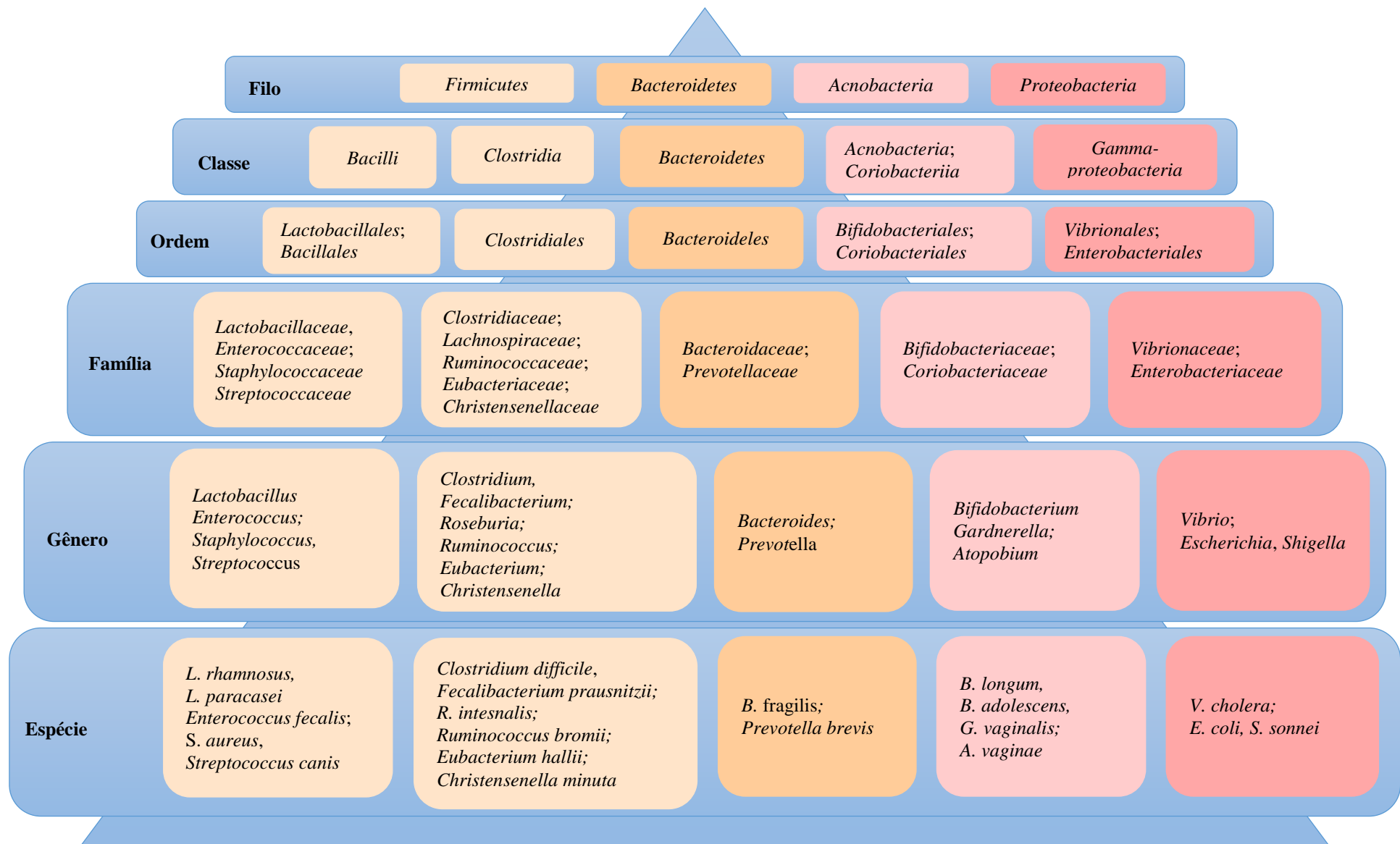


Figura 1. Classificação taxonômica do subconjunto de microrganismos encontrados no trato gastrointestinal humano.

Adaptado de Chung et al. (2017).

As *Proteobacterias* são encontradas em grande proporção na MI humana, e a família das *Enterobacterias* se destacam. Essas bactérias são comumente encontradas na MI de crianças nascidas pré-termo, pois essas crianças em geral são submetidas a incubadoras e à procedimentos invasivos, com maior exposição de bactérias ambientais do que a bactérias maternas (ITANI *et al.*, 2018; ITANI *et al.*, 2017). Adicionalmente, esse filo tem sido relacionado com a fase aguda da doença inflamatória intestinal (KOSTIC *et al.*, 2014), além de desordens agudas, como infecções de trato gastrointestinal (KOLENDA *et al.*, 2015).

A MI logo após o nascimento tem predominância de bactérias anaeróbicas facultativas, como as *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (ADLERBERTH *et al.*, 2006; YASSOUR *et al.*, 2016). A partir do nascimento, com a disponibilidade de oxigênio, observa-se aumento de bactérias anaeróbicas restritas, incluindo espécies de *Bifidobacterium*, *Bacteróides* e *Clostridium* (PALMER *et al.*, 2007; ROTIMI; DUERDEN, 1981; YASSOUR *et al.*, 2016). Ao final do primeiro ano de vida, a MI é composta em sua maioria por bactérias aeróbicas (TALARICO *et al.*, 2017; YASSOUR *et al.*, 2016). Durante os primeiros três anos de vida, ocorre a formação da MI (TAMBURINI *et al.*, 2016). Já o intestino adulto é colonizado em maior proporção pelas *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, e menor abundância pelas *Proteobacterias*, *Actinobacterias*, *Fusobacterias*, *Cyanobacteriaes* e *Verrucomicrobias* (MINIELLO *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2017; TREMAROLI; BACKHED, 2012).

Logo após o nascimento, a MI desempenha funções essenciais, como a proteção contra a proliferação de organismos patogênicos, a digestão e metabolização, a síntese de vitaminas, o crescimento e diferenciação das células epiteliais intestinais, a homeostase do sistema imunológico e nervoso (ARRIETA *et al.*, 2014; CHU *et al.*, 2017; MARTIN *et al.*, 2016).

Dessa forma, o desequilíbrio entre as comunidades de MI pode levar a consequências a longo prazo. Alterações na MI neonatal têm sido associadas com uma série de desordens pediátricas, como alergias, asma, obesidade e diabetes infantil (ARRIETA *et al.*, 2015; DOUGLAS-ESCOBAR *et al.*, 2013; FULDE; HORNEF, 2014; GULDEN *et al.*, 2015; JOHNSON; OWNBY, 2016; WALLACE *et al.*, 2016). Acredita-se que existe uma janela crítica na primeira infância, e possivelmente no útero, durante a qual a relação entre a MI e os sistemas biológicos (principalmente imunológico e metabólico) podem levar ao desenvolvimento desses sistemas e impactar na saúde futura (BACKHED *et al.*, 2005; LEE; MAZMANIAN, 2010; TAMBURINI *et al.*, 2016).

Estudos que já tenham avaliado a MI em crianças brasileiras são escassos (BRANDT *et al.*, 2012). Um estudo realizado com 10 crianças na cidade de São Paulo avaliou a MI de crianças nascidas a termo, de parto vaginal e em AME. Esse estudo revelou que RN (2-7 dias) apresentaram elevada abundância relativa de *Escherichia* e *Clostridium*, e baixa de *Staphylococcus* e *Bacteroides*. Já com um mês de vida, a MI era composta predominantemente de espécies aeróbicas, como *Bifidobacterium* e *Clostridium*, além de anaeróbios facultativos, como o gênero *Escherichia* (BRANDT *et al.*, 2012). Um outro estudo brasileiro, também realizado na cidade de São Paulo, com 12 lactentes nascidas de parto vaginal e em AME no primeiro ano de vida, observou que até os três meses há aumento na proporção de *Bifidobacterium*, seguido de uma diminuição de *E. coli* na MI infantil (TALARICO *et al.*, 2017). Esse mesmo estudo demonstrou a presença da *Faecalibacterium prausnitzii* na MI aos 12 meses, espécie de bactéria do filo *Firmicutes* e característica da MI de adultos.

A MI também pode ser avaliada por meio de índices de diversidade além da composição e abundância das bactérias presentes. Esses índices dizem respeito à variação de espécies diferentes de bactérias presentes na MI. Os parâmetros mais utilizados são o de alfa e beta diversidade. A alfa diversidade refere-se à diversidade dentro de uma amostra específica (WHITTAKER, 1960; 1972). Já a beta diversidade avalia a mudança na diversidade de espécies entre as amostras, contando o número total de espécies únicas para cada uma das amostras e comparando entre as amostras (WHITTAKER, 1960; 1972).

A MI de crianças no primeiro ano de vida apresenta baixa diversidade, uma vez que a alimentação nessa idade é comumente monótona, especialmente nos primeiros seis meses, enquanto a diversidade de MI de um adulto é alta (ROBERTSON *et al.*, 2019). Estudos brasileiros que avaliem a diversidade de microbiota são escassos, especialmente em crianças saudáveis. Um estudo realizado na cidade de Porto Alegre com 59 RN (mecônio e 1-2 dias) demonstrou que o mecônio tem maior alfa diversidade comparado a MI no 1-2 dias (MUELLER *et al.*, 2017). Os mesmos autores, observaram diferenças na beta diversidade da MI infantil de acordo com o tipo de parto (MUELLER *et al.*, 2017).

2.2 Transferência de microbiota materna

Estudos recentes têm demonstrado que a colonização intestinal começa ainda durante a gestação, por meio da transferência da microbiota da mãe para o RN (ARRIETA *et al.*, 2014; AVERSHINA *et al.*, 2014; MUNYAKA *et al.*, 2014). Essa informação é

diferente do que era conhecido anteriormente, pois acredita-se que ao nascer, o RN era estéril, e que seu primeiro contato com microrganismos se dava no momento do parto (ARRIETA *et al.*, 2014; AVERSHINA *et al.*, 2014; MUNYAKA *et al.*, 2014; WOPEREIS *et al.*, 2014). O ácido desoxirribonucleico (DNA, em inglês: Deoxyribonucleic Acid) bacteriano já foi encontrado na placenta (AAGAARD *et al.*, 2014; ANTONY *et al.*, 2015; COLLADO *et al.*, 2016; RAUTAVA *et al.*, 2012), no cordão umbilical (JIMENEZ *et al.*, 2005), no líquido amniótico (COLLADO *et al.*, 2016; RAUTAVA *et al.*, 2012), em membranas fetais (RAUTAVA *et al.*, 2012; STEEL *et al.*, 2005) e no mecônio de crianças nascidas a termo (38-41 SG), de parto cesárea e de gestantes aparentemente saudáveis (COLLADO *et al.*, 2016; JIMENEZ *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2016; NAGPAL *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2018).

O mecônio é a primeira amostra de fezes do RN e pode ser usado como proxy para avaliar o conteúdo do trato gastrointestinal fetal. Ao avaliar a microbiota presente no mecônio, a maioria dos estudos identificam comunidades microbianas transitórias de relativa alta diversidade (GOSALBES *et al.*, 2013; JIMENEZ *et al.*, 2008). Além disso, espécies bacterianas como *Enterococcus sp.* e *Escherichia sp.*, normalmente encontradas na MI do adulto, também foram encontradas no mecônio (GOSALBES *et al.*, 2013; JIMENEZ *et al.*, 2008). Hu *et al.* (2013) descreveram a microbiota presente no mecônio de filhos de mulheres com diabetes *mellitus* e observaram a presença de bactérias comumente encontradas no intestino de diabéticos.

Collado *et al.* (2016) compararam a composição da MI materna, placenta, líquido amniótico, colostro, mecônio e fezes infantis em 15 pares mãe-filho. Esses autores observaram que a placenta e o líquido amniótico apresentam MI de baixa diversidade, e que o mecônio apresentava composição da microbiota parecida com a placenta, com o líquido amniótico e do colostro (COLLADO *et al.*, 2016). Esses resultados indicam a existência de transferência pré-natal de bactérias da mãe para o filho.

Apesar da barreira epitelial intestinal impedir a entrada bacteriana na corrente sanguínea, as células dendríticas penetram ativamente no epitélio intestinal, permitindo o alcance da circulação linfática. Dessa forma, essas bactérias acabam atingindo diversos órgãos (**Figura 2**) (NIKKARI *et al.*, 2001; STINSON *et al.*, 2017). Esse mecanismo parece ocorrer de forma independente do estado gravídico. Entretanto, Perez *et al.* (2007) demonstraram que camundongos apresentaram 60% mais bactérias em seus linfonodos mesentéricos durante a gestação. Isso pode indicar um possível aumento do transporte de bactérias durante a gestação (KERR *et al.*, 2015; PEREZ *et al.*, 2007). Alguns estudos

sugerem que isto ocorre devido às concentrações de progesterona, que modula a permeabilidade intestinal, permitindo a translocação bacteriana (STINSON *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2018).

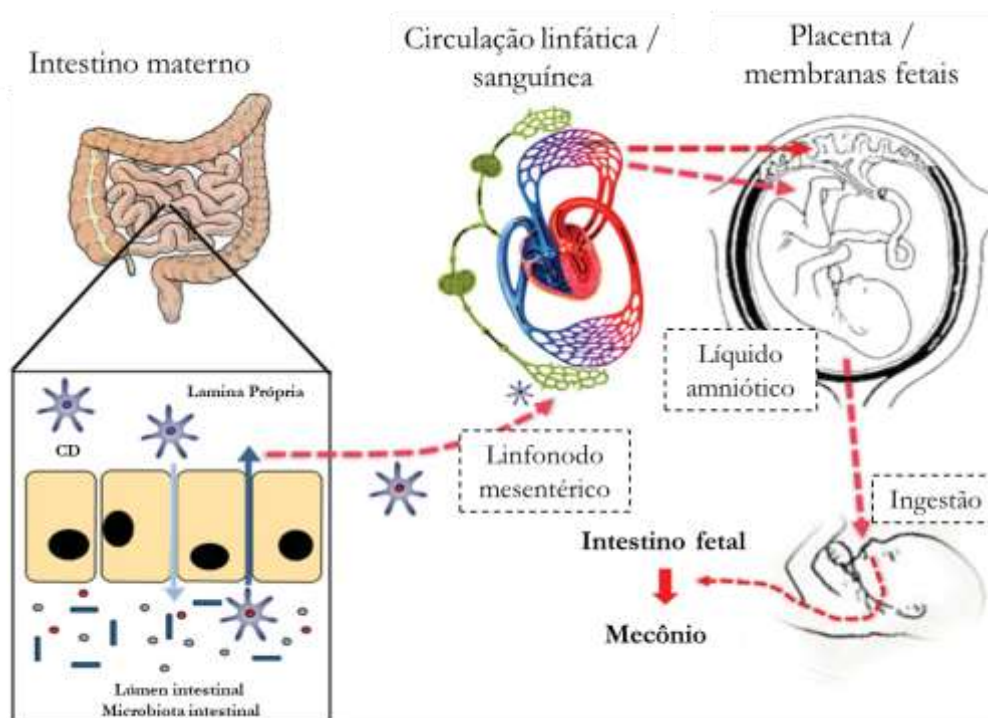


Figura 2. Transferência de microbiota materna.
Traduzido de Stinson *et al.* (2017).

Outros resultados revelaram que a permeabilidade intestinal e o espectro de bactérias abrigadas na placenta decresce com a IG no parto, sendo, portanto, maior entre os prematuros (DOYLE *et al.*, 2014; STEEL *et al.*, 2005; STOUT *et al.*, 2013; VAN ELBURG *et al.*, 2003). Esses resultados indicam uma espécie de “janela” de transferência de microbiota, possivelmente relacionada com a produção hormonal que atinge o pico no último trimestre gestacional (KUMAR; MAGON, 2012; LU *et al.*, 2018).

O mesmo mecanismo de transporte de bactérias citado anteriormente, parece permitir o alcance das glândulas mamárias (KHODAYAR-PARDO *et al.*, 2014; VAN ELBURG *et al.*, 2003) e a transferência da MI ao RN pela amamentação (HEIKKILA; SARIS, 2003; MARTÍN *et al.*, 2009). Estudos têm mostrado semelhança entre a microbiota encontrada no mecônio e no colostro, o que reforça a ideia de atuação de um mecanismo semelhante em ambas as situações (COLLADO *et al.*, 2016; PEREZ-MUNOZ *et al.*, 2017).

2.3 Estado nutricional materno e microbiota intestinal infantil

Diversos fatores que podem alterar a MI materna também podem impactar na MI infantil nos primeiros meses de vida. Isso ocorre sobretudo porque há transferência de microbiota materna para o RN. O estado nutricional materno durante a gestação e no pós-parto são determinantes importantes da MI (SUGINO *et al.*, 2019).

O estado nutricional pré-gestacional materno deve ser avaliado por meio do IMC pré-gestacional, utilizando-se o peso materno anterior a concepção. Já o estado nutricional gestacional é definido de acordo com a adequação do GPG (INSTITUTE OF MEDICINE, 2009). Um número crescente de mulheres em idade fértil e grávidas apresenta sobrepeso ou obesidade (IMC > 25 kg/m² ou GPG acima do recomendado) (BARROS; VICTORA, 2008; CHU *et al.*, 2009; HESLEHURST *et al.*, 2007). Estima-se que no Brasil o excesso de peso materno teve um aumento de 11,3%, ou seja de 501,8 para 558,7 mil entre 2005 e 2014 (CHEN *et al.*, 2018). Vários estudos observacionais têm mostrado que alterações no estado nutricional pré-gestacional ou no início da gravidez impactam na saúde materna e infantil (RAHMAN *et al.*, 2015). O excesso de peso materno pode resultar em um risco de dois a cinco vezes maior de obesidade para os filhos (MURRIN *et al.*, 2012; WHITAKER *et al.*, 2010; WIDEN *et al.*, 2016). A obesidade é capaz de modular a MI materna, que por sua vez, pode ser transmitida os filhos, durante a gestação e a lactação (MUELLER *et al.*, 2015; WALLACE *et al.*, 2016).

Diferenças na MI materna durante a gestação têm sido observadas de acordo com o excesso de peso materno pré-gestacional e o GPG (COLLADO *et al.*, 2008; KOREN *et al.*, 2012; NURIEL-OHAYON *et al.*, 2016; STANISLAWSKI *et al.*, 2017). Ao comparar a MI materna no primeiro e no terceiro trimestre gestacional, alguns autores relataram diminuição da alfa-diversidade e diferenças na beta-diversidade ao longo da gestação (GOMEZ-ARANGO *et al.*, 2016; KOREN *et al.*, 2012; STANISLAWSKI *et al.*, 2017). Stanislawski *et al.* (2017) observaram que mulheres com excesso de peso pré-gestacional apresentaram maior proporção de *Firmicutes* e menor de *Bacteroidetes* quando comparadas com mulheres com IMC adequado. Esses autores mostraram ainda que a MI de mulheres com GPG excessivo apresentou o mesmo comportamento da MI de mulheres com excesso de peso pré-gestacional. Outros estudos relataram um aumento na abundância dos filos *Actinobacterias*, *Bacteriodes* e *Firmicutes* em mulheres com obesidade pré-gestacional (COLLADO *et al.*, 2008; GOMEZ-ARANGO *et al.*, 2016; HOUTTU *et al.*, 2018).

O IMC pré-gestacional tem sido associado diretamente com a MI infantil (CERDO *et al.*, 2018; COLLADO *et al.*, 2010; GALLEY *et al.*, 2014; MUELLER *et al.*, 2016). Um estudo realizado na Finlândia com 42 pares de mães-filhos, mostrou que mulheres com IMC pré-gestacional ≥ 25 kg/m² tiveram filhos com contagem de bactérias significativamente menor no primeiro mês de vida, e MI diferente quanto a abundância de *Bacterioides* e *Prevotella*, com um mês, e quanto *C. Histolyticum*, com seis meses, quando comparados a filhos de mães com IMC pré-gestacional < 25 kg/m² (COLLADO *et al.*, 2010). O IMC pré-gestacional materno foi associado com menores concentrações de *Bacterioides*, com um mês de vida, e com maiores concentrações de *C. Histolyticum*, com seis meses de vida (COLLADO *et al.*, 2010).

Muller *et al.* (2016) avaliaram a MI de 74 RN brasileiros nascidos em Porto Alegre na primeira semana de vida. Os autores observaram diferença na beta-diversidade da MI infantil de filhos de mães com obesidade pré-gestacional comparado a de RN de mães com peso adequado, entre as crianças nascidas de parto normal. RN de parto normal e de mães obesas apresentaram maior proporção de *Bacteroides* e depleção da família *Xanthomonadaceae*, comparados aos RN de mães eutróficas. Além disso, a MI de RN de parto normal e de mães com excesso de peso era majoritariamente composta por bactérias com função de metabolização de carboidrato, enquanto bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta foram encontrados em maiores proporções entre crianças nascidas de parto normal e de mães com peso adequado.

O GPG também está relacionado com diferentes padrões de composição de MI infantil. Ao comparar a MI de crianças americanas menores de um ano, Robinson *et al.* (2017) observaram uma associação negativa entre o GPG e a abundância de *Bacterioidetes* e diferenças na alfa diversidade na MI de crianças nascidas de mães com GPG excessivo, quando comparadas com crianças nascidas de mães com GPG adequado. Um outro estudo realizado nas Filipinas com 42 pares de mãe-filhos, avaliou a MI infantil no primeiro e sexto meses e observou menores taxas de *Bacterioides-Prevotella* e maior abundância de *Clostridium histolyticum* em filhos de mães com GPG excessivo ao comparar com filhos de mães com GPG adequado (COLLADO *et al.*, 2010).

Quadro 1. Características dos estudos que avaliaram a relação entre IMC pré-gestacional e o ganho de peso gestacional e a microbiota intestinal infantil.

Autor e ano	Objetivo	Critérios de inclusão e exclusão	Período da amostra	N	Método de avaliação da MI	Principais resultados (Para filhos de mães com excesso de peso)
(COLLADO <i>et al.</i> , 2010)	Avaliar a associação entre o peso pré-gestacional materno e o GPG na aquisição e desenvolvimento da MI infantil durante os primeiros seis meses de vida	Mulheres livres de DCNT Sem informação quanto ao AM	Um e seis meses pós-parto	42	RNA ribossômico 16S PCR para espécies escolhidas pelos autores	Menor proporção de <i>Bacteriodes-Provotella</i> , com um mês, e maior de <i>C. Histolyticum</i> , com seis meses IMC pré-gestacional foi associado com menores concentrações de <i>Bacterioides</i> , com um mês de vida, e com maiores concentrações de <i>C. Histolyticum</i> , com seis meses de vida O GPG foi associado com menores concentrações de <i>Bacterioides</i> , e com maiores concentrações de <i>C. Histolyticum</i> , com um mês de vida
(GALLEY <i>et al.</i> , 2014)	Avaliar a associação entre a obesidade materna e a MI de crianças com dois anos de vida	Crianças saudáveis Amamentadas ou não	Dois anos	79	PCR A leitura das seqüências de DNA foram realizadas no QIIME 1.7.0	Tanto alfa e riqueza de MI foram maiores entre filhos de mães com obesidade Diferença na beta-diversidade Ao estratificar segundo a renda, as diferenças só se mantiveram para as mulheres com renda alta
(LEMAS <i>et al.</i> , 2016)	Avaliar a relação entre a concentração de leptina e insulina no leite e a MI de crianças com duas semanas	Crianças em AM e nascidas a termo (>37 SG) Sem uso de antibiótico 15 dias antes do parto	Duas semanas pós-parto	30	Região V1-V2 do RNA ribossômico 16S Sequenciamento realizado na plataforma MiSeq	Não foram encontradas diferenças na composição da MI Menor abundância do filo das <i>Proteobacterias</i> e da classe de <i>Gammaproteobacteria</i>

Autor e ano	Objetivo	Crítérios de inclusão e exclusão	Período da amostra	N	Método de avaliação da MI	Principais resultados (Para filhos de mães com excesso de peso)
(MUELLER <i>et al.</i> , 2016)	Avaliar se o IMC pré-gestacional está relacionado com a estrutura de MI infantil, em nascidos de parto normal comparados aos nascidos de cesariana eletiva	Nascidos a termo, em AM ou não; Livres de DCNT Não fumantes Sem dieta restrita Sem uso de antibiótico no 3º trimestre gestacional	Dois dias	74	Região V4 RNA ribossômico 16S Sequenciamento realizado na plataforma MiSeq. A leitura das sequências foi realizada no QIIME 1.8.0	Não foi encontrada diferença para alfa-diversidade Diferença significativa na beta-diversidade, apenas entre as crianças nascidas de parto normal Menor abundância de <i>Bacteroides</i> , nos nascidos de parto normal
(STANISLAWSKI <i>et al.</i> , 2017)	Determinar a relação entre o IMC pré-gestacional e o GPG excessivo e a MI materna no parto e a MI infantil no primeiro ano de vida	Feto único nascimentos a termo ou pós-termo, em AM ou não	Quatro e 10 dias, um, quatro e 12 meses pós-parto	16 9	Região V4 do RNA ribossômico 16S PCR Sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq	Menor média de alfa-diversidade de MI materna As características maternas não foram relacionadas com a composição da MI infantil
(ROBINSON <i>et al.</i> , 2017)	Determinar as associações de GPG com o perfil, riqueza e índice de diversidade de Shannon na MI infantil	IG no parto \geq 34 semanas Sem alterações graves de saúde, uso de antibiótico nos sete dias anteriores e em em AM ou não	<1 ano	84	Região V4 do RNA ribossômico 16S PCR Illumina MiSeq platform	Associação negativa com a abundância de <i>Bacteroidetes</i> Diferenças na média de alfa diversidade entre crianças nascidas de mães com GPG abaixo, acima e dentro da faixa de recomendação pelo <i>Institute of Medicine</i> (2009)

Autor e ano	Objetivo	Crítérios de inclusão e exclusão	Período da amostra	N	Método de avaliação da MI	Principais resultados (Para filhos de mães com excesso de peso)
(CERDO <i>et al.</i> , 2018)	Explorar a composição da MI de crianças com 18 meses, nascidas de mães obesas e eutróficas	Mulheres com Diabetes <i>Mellitus</i> Gestacional 18-45 anos Livres de DCNT pré-gestacionais e infecções durante a gestação Crianças em AM ou não	18 meses	39	Região V1-V2 do RNA ribossômico 16S PCR; Illumina MiSeq platform	Maior abundância de <i>Bacteroidetes</i> e menor abundância de <i>Firmicutes</i>
(SUGINO <i>et al.</i> , 2019)	Investigar a associação entre o IMC pré-gestacional e a MI materna e infantil, controlando os efeitos de outros fatores, como AM e tipo de parto	Não especificado Crianças em AM ou não	Uma semana	43	Região V4 do RNA ribossômico 16S PCR Illumina MiSeq platform	Sem diferenças para alfa e beta diversidade e riqueza de MI Maior abundância de <i>Megasphaera</i> , <i>Acidaminococcus</i> e <i>Akkermansia</i> e menor abundância de <i>Staphylococcus</i>

Nota: DCNT: Doenças crônicas não transmissíveis; RNA: Ácido ribonucleico; DNA: Ácido desoxirribonucleico; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; QUIIME: Quantitative Insights Into Microbial Ecology; GPG: ganho de peso gestacional; IMC: índice de massa corporal; AM: aleitamento materno; IG: idade gestacional.

2.4 Aleitamento materno e microbiota intestinal infantil

A alimentação, o AME ou uso de fórmulas infantis, também exercem influência sobre a MI da criança (BODE, 2012). A amamentação é essencial para a colonização precoce do intestino infantil (MINIELLO *et al.*, 2015), uma vez que o leite humano contém uma série de compostos que influenciam o desenvolvimento da MI infantil (MILANI *et al.*, 2017). Entre esses compostos, destaca-se a presença de bactérias, que são transferidas por meio da amamentação.

Lactentes em AME apresentam diferença em sua MI, e possuem menor diversidade e contagem total de bactérias, em relação às crianças alimentadas com fórmulas infantis (BACKHED *et al.*, 2015; DRAKE; REYNOLDS, 2010; MARTIN *et al.*, 2016). Crianças em AME abrigam MI duas vezes mais abundante em *Bifidobacteria* quando comparados a crianças alimentadas com fórmula. Entre as *Bifidobactérias*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* e *B. adolescentis* foram isoladas em lactentes alimentados em AM misto, enquanto *B. infantis* é típica do AME e *B. fragilis* de crianças alimentados apenas com fórmula infantil (PENDERS *et al.*, 2006).

Alguns estudos revelaram variações na composição bacteriana do leite humano de acordo com características maternas. A avaliação da composição bacteriana do leite materno em mulheres saudáveis revelou a presença de grande variedade de bactérias, incluindo *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *E. coli* (HEIKKILA; SARIS, 2003; MARTIN *et al.*, 2007). Por outro lado, o leite materno de mães com obesidade abrigou uma comunidade bacteriana diferente e menos diversa do que a de indivíduos com peso normal, incluindo maior abundância de *Staphylococcus* e *A. muciniphila* e menor abundância de *Bifidobacterium* (CABRERA-RUBIO *et al.*, 2012; COLLADO *et al.*, 2012).

Os OLH são outra classe de compostos presente no leite humano com mais de 200 diferentes tipos já descritos. Os OLH são carboidratos complexos não digeríveis pelo intestino humano (SELA *et al.*, 2011) e consistem no segundo carboidrato mais abundante no leite materno. Esses compostos servem de substrato para o crescimento das bactérias da MI consideradas potencialmente benéficas (MANTHEY *et al.*, 2014; SELA *et al.*, 2011; ZIVKOVIC *et al.*, 2011), e para a produção de ácidos graxos de cadeia curta (CHAMBERS *et al.*, 2018). Dessa forma, potencializa a proliferação de *Bifidobacterias* e os *Lactobacillus*, consideradas bactérias de gênero ‘saudável’ (ZIVKOVIC *et al.*, 2011).

Nesse sentido, crianças amamentadas permanecem por mais tempo sendo expostas à transferência de MI materna, e a presença de OLH, hormônios maternos e

outros compostos bioativos (MARTÍN *et al.*, 2009). Isso permite que a MI adquirida ao longo da gestação e no parto seja modulada pela presença desses compostos no leite humano (MUSILOVA *et al.*, 2014). Por outro lado, crianças que recebem fórmula infantil e outros tipos de alimentos também são submetidos a microbiota presente nesses alimentos, levando a uma maior diversidade da MI infantil (LEVIN *et al.*, 2016).

Martin *et al.* (2016) observaram que apenas a presença do AM foi capaz de modular a MI aos três meses, independentemente do tipo de parto. Crianças nascidas de parto cesáreo, após três meses de AME, atingiram proporção semelhante de *B. bifidum* e *L. gasseri* em sua MI quando comparadas com crianças nascidas de parto normal (MARTIN *et al.*, 2016). Ambas as espécies de bactérias fazem uso dos OLH presentes no leite humano como substrato (STINSON *et al.*, 2017). Dessa forma, a presença dos OLH favoreceu o crescimento dessas espécies. Essa foi a primeira vez que essa interação entre o tipo de parto e o AM com a MI infantil foi relatada (MARTIN *et al.*, 2016). Contudo, ainda são escassos estudos que investigaram a interação entre o IMC pré-gestacional e o AM com a MI infantil.

3. Justificativa

A relação da MI com a saúde humana tem sido foco de recentes investigações, sendo o excesso de peso um dos principais fatores estudados. Diversos estudos têm avaliado o impacto da MI de adultos como fator de risco para o desenvolvimento de DCNT em um contexto no qual o aumento da prevalência de obesidade tornou-se um problema de saúde pública.

O período da primeira infância até três anos de vida é essencial na formação da MI do adulto. Assim, é muito importante que seja feita a identificação de fatores modificáveis que possam favorecer uma MI menos patológica na vida adulta. Entretanto, ainda são escassos os estudos a respeito da MI infantil, especialmente em crianças saudáveis.

Um número considerável de estudos tem avaliado o impacto do tipo de parto na MI infantil, uma vez que se acreditava que o útero fosse um ambiente estéril. Recentemente, com a possibilidade da existência da transferência de microbiota da mãe para o feto, novos fatores modificáveis têm sido investigados. Resultados da literatura indicam que fatores como o estado nutricional materno e o AM são importantes determinantes da composição da MI infantil.

As evidências sobre o impacto do estado nutricional materno na MI infantil são controversas, devido ao número pequeno de crianças avaliadas e o uso de diferentes técnicas de avaliação da MI. Além disso, a maioria dos estudos não considera o efeito do AM nessa relação, fator fundamental nos primeiros meses de vida da criança. Somado a isso, estudos brasileiros são escassos, já que apenas um avaliou a relação entre o IMC pré-gestacional e a MI infantil.

O presente estudo tem como objetivo fornecer evidências sobre o impacto do estado nutricional materno e o papel do aleitamento materno na MI infantil. Adicionalmente, visa contribuir para o conhecimento do comportamento da MI infantil de crianças brasileiras, uma vez que a MI pode ser influenciada pela localização geográfica e cultura populacional local.

4. Pergunta de estudo e hipóteses

Perguntas: O excesso de peso materno influencia a MI no primeiro mês de vida? O AM pode modificar a relação do IMC pré-gestacional e GPG com a MI no primeiro mês de vida?

Hipótese 1: Filhos de mulheres com IMC pré-gestacional de sobrepeso/obesidade e GPG excessivo apresentam MI diferente no primeiro mês de vida, quanto a abundância relativa, alfa e beta-diversidade, quando comparada a filhos nascidos de mulheres com IMC pré-gestacional e GPG adequado.

Hipótese 2: Crianças em AME apresentam MI no primeiro mês de vida diferente, quanto a abundância relativa, alfa e beta-diversidade, quando comparada a crianças em APC.

Hipótese 3: Filhos de mulheres com IMC pré-gestacional e/ou GPG excessivo e em AME, apresentam MI semelhante, quanto a abundância relativa, a de crianças nascidas de mães com IMC pré-gestacional e/ou GPG adequado e em AME.

5. Objetivos

5.1. Objetivo geral

Investigar as associações do índice de massa corporal (IMC) pré-gestacional e do ganho de peso gestacional (GPG) com a composição e diversidade de microbiota intestinal (MI) infantil no primeiro mês de vida, considerando o tipo de aleitamento materno (AM) como efeito modificador dessas relações.

5.2. Objetivos específicos

- I. Determinar a abundância, alfa e beta diversidade da MI infantil no primeiro mês de vida de acordo as categorias de IMC pré-gestacional e GPG.
- II. Verificar a associação do IMC pré-gestacional e do GPG com a MI infantil no primeiro mês de vida.
- III. Avaliar a abundância, alfa e beta diversidade da MI infantil de acordo com o tipo de AM.
- IV. Investigar o papel do tipo do AM nas possíveis associações do IMC pré-gestacional e do GPG com a MI infantil no primeiro mês de vida.

6. Métodos

6.1 Delineamento do estudo, área e população-alvo

A presente dissertação faz parte de um estudo maior com delineamento do tipo longitudinal prospectivo, que foi desenvolvido considerando a linha de base e cinco ondas de seguimento: pré-natal (28 – 35 SG - linha de base), puerpério imediato (2 – 8 dias), um mês (26 – 50 dias), três meses (88 – 119 dias), seis meses (180 – 216 dias) e um ano pós-parto (365 – 404 dias). Para este trabalho, foram utilizados dados relativos a linha de base e o primeiro mês pós-parto (**Figura 3**).

O presente estudo investigou uma amostra de gestantes usuárias da Clínica de Família Assis Valente, localizada na Ilha do Governador, Zona Norte da cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. A clínica funciona de acordo com o Programa de Saúde da Família (BRASIL, 2012) e dispõem de seis equipes de saúde da família, sendo responsável pelo atendimento de mais de 7.000 famílias, e aproximadamente, 20.000 usuários.

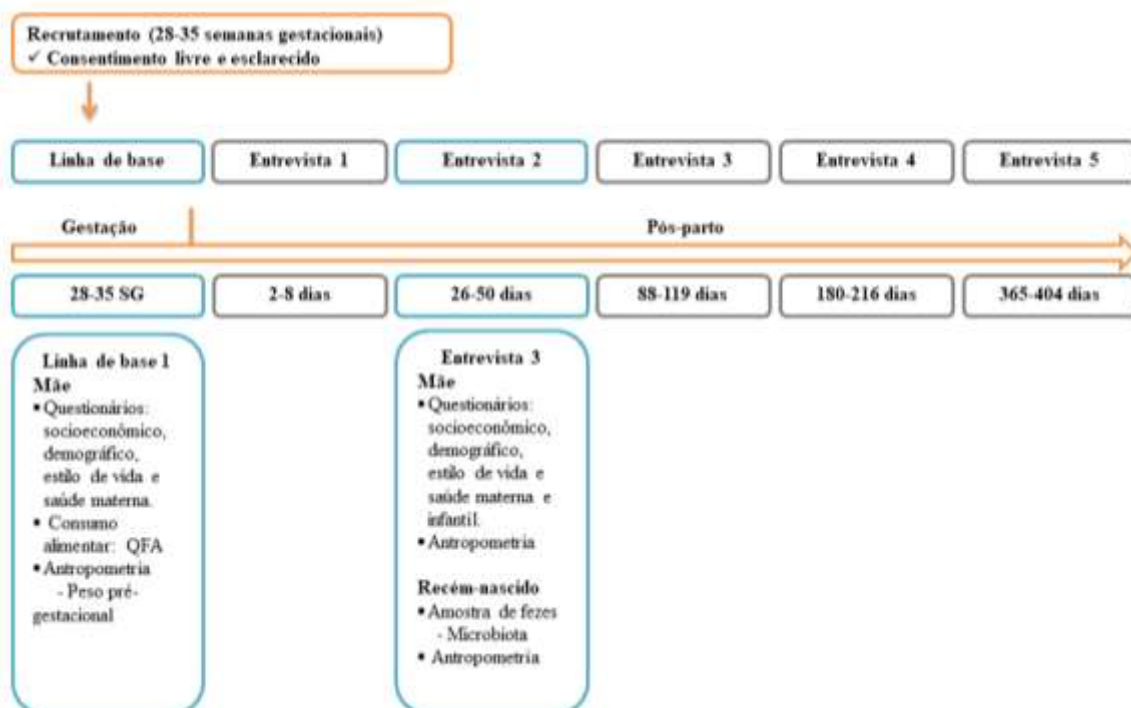


Figura 3. Fluxograma adaptado do estudo maior indicando o detalhamento da linha de base (28-35 semanas gestacionais) e da onda de seguimento 3 (26-50 dias pós-parto).

SG: semanas gestacionais; QFA: questionário de frequência alimentar.

6.2 Captação das participantes

As gestantes eram encaminhadas para iniciar o pré-natal, logo após o teste imunológico de gravidez. O acompanhamento da gestante era feito pelo médico, enfermeiro e dentista da estratégia de Saúde da Família. Dentro da rotina de atendimento, a gestante realizava o exame para doenças sexualmente transmissíveis, o teste oral de tolerância a glicose e o hemograma.

Durante o período de espera para as consultas, as gestantes eram abordadas pela equipe do estudo, para a aplicação de um questionário de rastreamento envolvendo questões básicas como nome, idade, intenção em permanecer residindo na área programática após o parto, IG, diagnóstico de DNCT ou doenças sexualmente transmissíveis, uso de medicamentos para tratamento de doença psiquiátrica, interesse em amamentar, peso pré-gestacional e telefone de contato.

Um contato telefônico para agendamento de um encontro era realizado com todas as gestantes que se enquadravam nos critérios de elegibilidade. As gestantes elegíveis que tiveram interesse foram convidadas a participar do estudo. Todas as gestantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

6.3 Critérios de elegibilidade

As gestantes que atenderam aos seguintes critérios de elegibilidade, no momento de recrutamento, foram convidadas a participar do estudo:

- Ter idade entre 18 e 40 anos;
- Realizar o acompanhamento pré-natal no local de estudo;
- Apresentar IG entre 28 e 35 semanas;
- Estar livre de DNCT (exceto obesidade, $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$), e de doenças infecciosas;
- Não apresentar gestação gemelar;
- Desejar amamentar;
- Não fazer uso de medicamento psiquiátrico;
- Residir na área geográfica de cobertura da Clínica da Família Assis Valente.

6.4 Critérios de exclusão

Para a amostra final, foram excluídas:

- As gestantes que desenvolverem alguma alteração da saúde durante a gestação, como pré-eclâmpsia ou diabetes gestacional;
- As mulheres que fizeram uso de medicação antidepressiva ou outra medicação psiquiátrica;
- Mulheres que apresentaram história obstétrica de parto prematuro;
- Crianças nascidas pré-termo;
- Crianças que fizeram uso de antibiótico.

6.5 Variáveis do estudo

6.5.1 Coleta de dados

A coleta de dados ocorreu entre Outubro de 2016 a Janeiro de 2020 por meio de entrevistas com coletadores treinados. A coleta de dados foi realizada a partir do *Research Electronic Data Capture* (REDCap), software que permite a geração e gerenciamento do banco de dados em sua plataforma online. Os questionários foram aplicados em um *tablet*, de forma *offline* e enviados diariamente para a plataforma online. O controle de qualidade na coleta de dados era feito diariamente por meio da revisão dos questionários aplicados.

6.5.2 Antropometria materna

O peso pré-gestacional, aferido até a 13^a semana gestacional ou auto-referido, foi coletado da caderneta de acompanhamento pré-natal. A estatura foi medida com o auxílio do Estadiômetro Altorexata[®] (Belo Horizonte, Brasil), com escala bilateral em milímetros e campo de uso de 0,35 até 2,13 m, durante a segunda onda de seguimento (um mês pós-parto). A aferição da estatura foi realizada por um pesquisador treinado e de acordo com o protocolo proposto por LOHMAN *et al.*, (1988).

O cálculo do IMC pré-gestacional foi realizado por meio da divisão do peso (em quilogramas) pela estatura ao quadrado (em metros) ($IMC = \text{peso} / \text{estatura}^2$). O estado nutricional pré-gestacional foi classificado usando as categorias de IMC pré-gestacional, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (OMS, 1995). Para as análises, optou-se por categorizar o IMC em adequado ($< 25,0 \text{ kg/m}^2$) e sobrepeso/obesidade ($\geq 25,0 \text{ kg/m}^2$), uma vez que na amostra apenas uma participante se enquadrava na categoria de baixo-peso pré-gestacional.

6.5.3 Ganho de peso gestacional

O GPG foi calculado por meio da subtração do peso na última consulta pré-natal (recuperado da caderneta de acompanhamento pré-natal) do peso pré-gestacional (auto-referido ou recuperado da caderneta de acompanhamento pré-natal). A classificação do GPG foi realizada de acordo com a recomendação do *Institute of Medicine* (IOM) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2009). A recomendação do IOM determina um intervalo de GPG de acordo com o IMC pré-gestacional, com descrito no **Quadro 2**. O GPG insuficiente foi definido como um valor abaixo do intervalo apropriado para cada categoria de IMC pré-gestacional. O GPG excessivo, foi definido como um valor acima do intervalo apropriado, e o GPG adequado como um valor dentro do intervalo apropriado. A adequação do GPG foi dicotomizada como adequada (GPG insuficiente e adequado combinado) e excessiva (GPG excessivo).

Quadro 2. Classificação do estado nutricional pré-gestacional materno e recomendação de ganho de peso gestacional.

IMC pré-gestacional (kg/m ²)	Classificação	Ganho de peso total (kg)
<18,5	Baixo peso	12,5 - 18,0
18,5 – 24,9	Eutrofia	11,5 - 16,0
25,0 – 29,9	Sobrepeso	7,0 - 11,5
≥ 30,0	Obesidade	5,0 - 9,0

Fonte: IOM, 2009.

6.5.4 Coleta de amostra de fezes

A coleta de fezes das crianças foi realizada em todas as ondas de seguimento do pós-parto. A puérpera recebeu um tubo coletor de fezes com pá coletadora (*Globe's screw cap container*), um saco com fecho hermético, uma caixa térmica e gelo reutilizável rígido (*gelox*[®]). A puérpera e/ou o cuidador eram orientados a observar atentamente a criança, e ao sinal de evacuação, realizar a coleta das fezes o mais rápido possível, conforme as orientações da equipe de pesquisadores. A mãe também era orientada para que as fezes fossem coletadas no dia da consulta ou no máximo 48 horas antes, e que fossem armazenadas no tubo com pá coletadora, dentro do saco hermético e acondicionadas no congelador. O transporte até a unidade de saúde era realizado na caixa térmica juntamente com o *gelox* (**Figura 4**).

Todas as amostras de fezes foram congeladas imediatamente após o recebimento a -20°C e, posteriormente, mantidas a -80°C em biorrepositório até o envio das amostras, para processamento e análise na Universidade de Columbia, em Nova Iorque, Estados Unidos, local em que as análises foram realizadas em parceria com o *Center for Infection and Immunity* e em colaboração com o professor Brent Willians (parceiro do programa de pós-graduação em Nutrição da UFRJ).



Figura 4. Fluxo de coleta e armazenamento das amostras de fezes infantil.

6.5.5 Análise de microbiota intestinal infantil

As amostras de fezes congeladas das crianças foram enviadas, periodicamente, em gelo seco, com controle e manutenção da temperatura em -80°C , para a Universidade de Columbia (Nova Iorque/Estados Unidos), local em que as análises foram realizadas. A determinação da MI no primeiro mês de vida foi feita de acordo com o protocolo *16S Illumina Amplicon*. O protocolo compreende a utilização do ácido ribonucleico ribossômico (RNAr) como material genético para o sequenciamento, por se tratar do em melhor nível de conservação em relação as modificações genéticas, comum entre as bactérias (CAPORASO *et al.*, 2012). A extração do RNAr da amostra, foi realizada utilizando *primers* (segmentos de ácidos nucleicos, necessários para o início da replicação do material genético) específicos para a área V4 do gene 16S do RNAr bacteriano.

Posteriormente foi feita amplificação em triplicata. A região V4 foi escolhida, por ser a região de melhor conservação, e fornecer precisão próxima a do sequenciamento de todo o gene 16S (YANG, B. *et al.*, 2016). A identificação da classificação taxonômica presente na MI foi realizada por sequenciamento na plataforma *MiSeq* e *HiSeq Illumina*, de acordo com o protocolo padrão do Projeto Microbioma Terra (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/>), conforme CAPORASO *et al.*, (2012). As análises do sequenciamento do RNAr 16S foram realizadas no *Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2* (QUIIME2) (CAPORASO *et al.*, 2010; KUCZYNSKI *et al.*, 2011).

6.5.6 Aleitamento materno

Os dados sobre o tipo de AM com um mês de vida foram obtidos a partir de questionário estruturado, em que a participante era questionada se ofereceu algum alimento, água, suco ou chá para a criança (**Anexo 1**). Posteriormente, o tipo de AM foi classificado de acordo com a recomendação da OMS (2007), adaptada pelo Ministério da Saúde (2009) (BRASIL, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). Considerando o pequeno tamanho da amostra, optou-se por categorizar o AM em AME quando a criança recebeu apenas leite materno e em predominante/complementar (APC), quando além do leite materno foram consumidos outros líquidos ou alimentos.

Quadro 3. Definição de tipo de aleitamento materno.

Tipo de AM	Definição
AM exclusivo	Não há a introdução de nenhum tipo de alimento além do leite materno.
AM predominante	A criança recebe o leite materno, água e/ou bebidas à base de água, como os chás.
AM misto	A criança recebe o leite materno complementado com outros tipos de leite como as fórmulas infantis.
AM complementado	A criança recebe além do leite materno, qualquer alimento sólido ou semissólido.
Ausência de AM	A criança não recebe leite materno.

Fonte: Ministério da Saúde (2009).

6.5.7 Variáveis combinadas segundo IMC, GPG e AM

Conjuntos de variáveis combinadas de IMC pré-gestacional e status de AM e adequação de GPG e status de AM com o objetivo de capturar uma possível modificação

de efeito da amamentação na relação de adequação de IMC ou GWG pré-gravidez na microbiota intestinal infantil. As categorias resultantes estão apresentadas no **Quadro 4**.

Quadro 4. Definição das variáveis combinadas de IMC pré-gestacional e GPG com o AM.

IMC pré-gestacional	Tipo de AM	Variável combinada
Adequado (<25 kg/m ²)	AME	IMC adequado e AME
Sobrepeso/obesidade (≥25 kg/m ²)	APC	IMC sobrepeso/obesidade e APC
GPG	Tipo de AM	Variável combinada
Adequado	AME	GPG adequado e AME
Excessivo	APC	GPG excessivo e APC

Nota: IMC: índice de massa corporal; AM: aleitamento materno; GPG: ganho de peso gestacional. O GPG foi definido de acordo com o IMC pré-gestacional e classificado em adequado quando abaixo ou dentro da faixa de GPG total recomendado, e em excessivo quando acima da faixa de recomendação. AME: Aleitamento materno exclusivo. APC: aleitamento materno predominante/ complementado.

6.5.8 Covariáveis

Um questionário padronizado foi utilizado para obtenção de dados sócio-demográficos, história reprodutiva e de estilo de vida (**Anexo 2 e 3**). Uma série de informações foram coletadas por meio de questionários padronizados e/ou validados, entre elas: idade, estado civil, tipo de parto, paridade, ocupação materna, nível de escolaridade, renda familiar per capita, doenças e uso de medicamentos durante e após a gestação.

6.6 Análise estatística

Para a avaliação da normalidade das variáveis foram utilizados histogramas, gráficos de dispersão e os testes de *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov*. A descrição dos dados foi feita por meio de medidas de tendência central e dispersão (mediana e intervalo interquartilico), para variáveis contínuas, e frequência absoluta e relativa, para variáveis categóricas. A comparação das variáveis categóricas foi realizada por meio do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, e das variáveis contínuas por meio do teste t de *Student* ou teste *Wilcoxon-Mann-Whitney*.

O cálculo de alfa-diversidade foi realizado por meio do índice de Shannon (SPELLERBERG; FEDOR, 2003), para a diversidade filogenética foi usada o índice de Faith (FAITH, 2007) e o de beta-diversidade foi calculado de acordo com a

dissimilaridade de Bray-Curtis, o *Unifrac weight and unweight* (BRAY; CURTIS, 1957). A abundância, diversidade filogenética e alfa-diversidade foram analisadas por meio de mediana e intervalo interquartil e gráficos de blox-plot. A comparação desses parâmetros de acordo com as categorias de interesse foi feita por meio do teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*. A beta-diversidade foi avaliada por meio de gráficos de rarefação de análise de coordenadas principais (PCoA, do inglês, *Principal Coordinates Analysis*), método que permite a exploração e visualização das diferenças e similaridades entre os dados. Também foi utilizada a Análise Multivariada Permutacional de Variância (PERMANOVA, do inglês, *Permutational Multivariate Analysis of Variance*) para avaliar a diferença de beta-diversidade entre os grupos estudados. Além disso, regressões lineares múltiplas ajustadas para fatores de confusão foram utilizadas para testar a associação entre o IMC pré-gestacional e o GPG com a diversidade de MI e a análise de tamanho do efeito da análise discriminante linear (do inglês, *Linear Discriminant Analysis Effect Size - LEfSe*) foi utilizada para avaliar a diferenciação da MI presente nos diferentes grupos segundo o IMC pré gestacional, o GPG e AM.

As análises estatísticas foram realizadas no *software* estatístico R, versão 3.5.2 e no *Stata* versão 15. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

6.7 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Maternidade-Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro (parecer nº49218115.0.0000.5275) e da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (parecer nº 49218115.0.3001.5279) e está em acordo com os princípios éticos de não maleficência, beneficência, justiça e autonomia, contidos na resolução 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). A participação na pesquisa se dava de forma voluntária, mediante assinatura de duas vias do TCLE.

6.8 Participação do autor

A discente e autora desta dissertação participou de todas as etapas do estudo em que esse trabalho está inserido. Desde a elaboração e planejamento da coleta de dados, ainda como aluna de iniciação científica, passando pela coleta de dados, inicialmente como entrevistadora e depois como coordenadora de campo, e finalmente, analisando os dados coletados para elaboração dos resultados aqui apresentados.

7. Resultados

COSTA, Nathalia Cristina de Freitas *et al.*, Relationship between maternal pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain with infant gut microbiome:

Results from a prospective birth cohort

(Relação entre o índice de massa corporal pré-gestacional e o ganho de peso gestacional com a microbiota intestinal infantil: Resultados de uma coorte prospectiva de nascimento)

Abstract

Background: Maternal obesity may change maternal microbiota during pregnancy and this altered microbiota can be transmitted to the infant. Moreover, infant feeding mode can also affect the infant gut microbiota. **Objective:** To evaluate the association of pre-pregnancy excessive body mass index (BMI) and gestational weight gain (GWG) adequacy on infant gut microbiota and the role of breastfeeding on this association. **Methods:** Prospective cohort conducted in Rio de Janeiro, Brazil. Maternal pre-pregnancy BMI (<25; ≥ 25 kg/m², normal/excessive) and GWG adequacy (adequate; excessive) were the exposures and breastfeeding practice status (exclusively breastfeeding EBF; predominant/complementary feeding PCF) was analyzed as an effect modifier. Infant stool samples were collected for 56 infants between 26-45 days. Samples were sequenced using 16S rRNA gene sequencing (MiSeq). Analysis included alpha diversity indices, beta diversity metrics and Wilcoxon-Mann-Whitney Test, linear regression, permutational multivariate analysis of variance and linear discriminant analysis effect size. **Results:** Microbiota composition presented higher abundance of *Bifidobacterium*, *Veillonella* and *Escherichia* and an increase of *Escherichia* and decrease of *Streptococcus* among pre-pregnancy excessive BMI and excessive GWG women. A higher median alpha diversity in infants born from mothers with excessive GWG was observed, and excessive GWG was positively associated with alpha diversity. The microbiota of infants born from mothers with excessive pre-pregnancy BMI were enriched with *Dialister* genus and *Lactobacillus ruminis*, *Haemophilus parainfluenzae* and *Veillonella parvula* species and those born from mothers with excessive GWG had higher abundance of *Staphylococcus* genus, *Staphylococcaceae* family, *Bacillales* order and *Bacilli* class. PCF status decreased the abundance of *Bifidobacterium* only among excessive BMI/GWG. Excessive GWG and PCF practice were associated with high infant gut microbiota alpha diversity. **Conclusion:** Maternal overweight modified infant gut microbiota abundance. The PCF seems to modify the effect of excessive GWG and pre-pregnancy BMI on infant gut microbiota.

Key-words: Pre-pregnancy body mass index; Gestational weight gain; Breastfeeding; gastrointestinal microbiome; Infant.

Introduction

The human gut microbiota is composed of millions of microorganisms (1). During early childhood, i.e. first six years of life, these microorganisms are responsible to perform essential functions for adequate development, including the homeostasis of the immune system, growth and differentiation of intestinal epithelial cells and maturation of the central nervous system (2-5).

Research on the microbiome has increased over the past 10 years and gut microbiome have been investigated in relation to a wide range of health disorders including cancer (6), cardiovascular disease (7), inflammatory bowel disease (8), and obesity (9). According to the World Health Organization (WHO), overweight prevalence has increased worldwide among children, adolescents and adults and it is considered nowadays one of the most important public health burden (10). Maternal overweight is well documented as a risk factor for obstetric complications and chronic disease development in the offspring on the long-term (11). One of the mechanisms suggested in the literature is the transfer of an obesogenic microbiota to the offspring (12).

Although the intestinal epithelial barrier prevents bacterial entry into the bloodstream, dendritic cells appear to be able to actively penetrate the intestinal epithelium, transporting bacteria in the lumen to the lymphatic circulation. Thus, these bacteria reach other organs such as the placenta, uterus and mammary glands (13). This mechanism seems to occur independently of pregnancy status. However, some authors suggest that the bacterial translocation happens more easily during pregnancy due to increased progesterone that increases intestinal permeability (14).

According to the above-referenced mechanism, maternal overweight can change maternal microbiota during pregnancy (15-18), and this altered microbiota can be passed to the infant. Some studies have already evaluated the effect of maternal overweight on infant gut microbiota (19-24). However, according to a recent systematic literature review the results are still inconclusive (25).

Infant feeding mode may also affect infant gut microbiota. Breastfeeding is very important in the first months of life, as for feeding and as for infant development and is capable of shaping infant gut microbiota. A meta-analysis including American, Canadian, Haitian, South-Africans and Bangladeshi studies showed differences in diversity and composition of infant gut microbiota in the first six months of life. Gut microbiota of non-exclusive breastfeeding infants has increased relative abundances of *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Veillonella*, and *Megasphaera* (26).

In contrast, studies evaluating maternal overweight combined with breastfeeding are lacking in the literature. Thus, the aim of this study is to evaluate the association of pre-pregnancy body mass index (BMI) and gestational weight gain (GWG) with infant gut microbiota in the first month of life and to evaluate the role of breastfeeding as an effect modifier in this association.

Methods

The study design comprised a prospective cohort conducted in a public health care center in Rio de Janeiro, Brazil. Pregnant women were invited to participate if were between 18-40 years old, with no chronic disease (except obesity) or infectious disease and with 28-35 gestational weeks at the study baseline. The recruitment period lasted from January 2017 to April 2019. Pairs of mothers-infants were followed up at seven days, one, three, six, and 12 months post-partum. Pregnant women and infants were excluded if had any complications during pregnancy, (preeclampsia or diabetes) or at childbirth (hypoxia), or if infants used antibiotics from birth until stool sample collection.

Self-reported pre-pregnancy weight or the weight retrieved from the prenatal care booklet was used. Maternal height was measured in duplicate with a stadiometer (Altura Exata, Minas Gerais, BR) at one month postpartum. Pre-pregnancy BMI was calculated using pre-pregnancy weight in kilograms divided by the square of maternal height. Pre-pregnancy BMI was categorized as normal ($<25.0 \text{ kg/m}^2$ – underweight and normal) and excessive ($\geq 25.0 \text{ kg/m}^2$ – overweight and obesity).

GWG was obtained subtracting weight at the last prenatal visit from pre-pregnancy weight (self-reported or retrieved from the prenatal care booklet). The classification of GWG adequacy was performed according the Institute of Medicine (IOM) recommendations (27). The IOM guideline recommends that women should gain weight according to their pre-pregnancy BMI. Pregnant woman that is underweight (BMI $< 18.5 \text{ kg/m}^2$), normal weight (BMI = $18.5\text{-}24.9 \text{ kg/m}^2$), overweight (BMI = $25.0\text{-}29.9 \text{ kg/m}^2$), or obese (BMI $\geq 30.0 \text{ kg/m}^2$) should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5 and 9 kg, respectively. Insufficient GWG was defined as a value below the appropriate interval for each pre-pregnancy BMI category. Excessive GWG was defined as a value above the appropriate interval, and adequate GWG as a value within the appropriate interval. GWG adequacy was dichotomized as adequate (insufficient plus adequate GWG) and excessive.

Data on breastfeeding practice status at one month was collected using a structured questionnaire where the mother was asked about the intake of breast milk and

other beverages and foods, such as water, juice, teas, soups, cow's milk and infant formula. Breastfeeding practice status was classified as exclusively breastfeeding (EBF) when the infant received only breast milk and in some cases medicines, or predominant/complementary feeding (PCF), when in addition to breast milk, other liquids or foods were consumed (28).

Two sets of combined variables of maternal pre-pregnancy BMI and breastfeeding practice status and GWG adequacy and breastfeeding practice status were created aiming to capture a possible effect modification of breastfeeding on the relationship of pre-pregnancy BMI or GWG adequacy on infant gut microbiota. The following categories resulted for pre-pregnancy BMI and breastfeeding practice status: normal BMI and EBF; normal BMI and PCF; excessive BMI and EBF and excessive BMI and PCF. Regarding GWG adequacy and breastfeeding, the resulting categories were as follow: adequate GWG and EBF; adequate GWG and PCF; excessive GWG and EBF and excessive GWG and PCF.

Stool samples were collected from 56 infants at approximately at one month postpartum (26-45 days). The infant caregiver was responsible for the stool collection no later than 48 hours prior to the interview. The collection was performed using the Globe's screw cap container (Globe Scientific, Mahwah, USA) and the stool was stored in an airtight bag at the household freezer after collection. The infant stool sample was transported from the household to the public health care unit by the participant using a thermal box with reusable ice. After receipt, the samples were stored at -80°C at the Rio de Janeiro Federal University laboratory facilities. The samples were then sent to Columbia University, where microbiota sequencing was performed at the Center of Immunity and Infection. Ribosomal RNA (rRNA) extraction was performed using kit *QIAmp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen Inc; Valencia CA, USA), followed by amplification using primers for the V4 region of 16S rRNA. The identification of the taxonomic classification present in the infant gut microbiota was performed by sequencing on the MiSeq Illumina platform (Illumina, California, USA), according to Caporaso et al. (2012) (29). 16S rRNA sequencing analyses were performed on QUIIME2 (Quantitative Insights into Microbial Ecology 2).

The variables were described using medians and interquartile range. Chi-square test or Fisher's exact test and Wilcoxon-Mann-Whitney tests or t test were used to evaluate the difference between participants with and without infant stool samples and between pre-pregnancy BMI and GWG groups. The Shannon index and Faith index were used to

calculate alpha and phylogenetic diversity (PD), respectively. The Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to compare the observed species, Shannon index and Faith index were used to test differences between the pre-pregnancy BMI and GWG groups. Linear regression was used to test the association between maternal pre-pregnancy BMI status and GWG adequacy and alpha diversity. The possible confounders and the adjustments of the models were based on the scientific and biological plausibility of the associations. The following co-variables used were: maternal age, number of children, type of delivery and birth weight. Beta diversity was calculated according the Bray-Curtis dissimilarity index, Unifrac and Weight Unifrac distances matrices. Principal coordinate analysis was used to visualize beta-diversity and Permutational analysis of variance (PERMANOVA) was used to assess the difference between pre-pregnancy BMI status and GWG adequacy. The linear discriminant analysis effect size (LEfSe) algorithm was used to identify significant differences in relative abundance of bacterial taxonomy. Statistical analyzes were performed using STATA statistical software version 15.0 and R software version 3.5.2 using the Phyloseq package (30).

The study was approved by the Research and Ethics Committee of the Maternity Hospital of Federal University of Rio de Janeiro (protocol no. 49218115.0.0000.5275) and the Municipal Secretariat of Health and Civil Defense of the State of Rio de Janeiro (protocol no. 49218115.0.3001.5279) located in Rio de Janeiro, Brazil.

Results

The distribution of co-variables for infants with and without stool samples revealed that those born vaginally were more likely to have stool collected. Maternal median age was 27.2 years and most participants presented excessive pre-pregnancy BMI (51.8%) and gained adequate gestational weight (64.3%). Most infants were born through vaginal delivery (73.2%) and were EBF at one month postpartum (55.4%) (**Table 1**).

Women with excessive pre-pregnancy BMI and PCF had highest median maternal age and infant had highest birth weight, in comparison with other pre-pregnancy BMI and breastfeeding status categories (**Table S1**). Pre-pregnancy weight and birth weight were higher for those with excessive GWG and PCF, in comparison with other GWG adequacy and breastfeeding status categories (**Table S2**).

Actinobacteria, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria* were represented in the infant stool, accounting for ~99% of the microbial content in each sample.

Bifidobacterium, *Veillonella* and *Escherichia* were the most abundant genus for all children. Infants born from overweight mothers (both pre-pregnancy BMI and GWG) presented a higher proportion of *Escherichia* abundance and small of *Streptococcus* abundance when compared to infants born from mothers with normal pre-pregnancy BMI and adequate GWG (**Figure 1**).

Infants born from mothers with excessive pre-pregnancy BMI and PCF practice status have presented higher proportions of *Veillonella*, *Bifidobacterium* and *Streptococcus*, in order of abundance, in comparison with other pre-pregnancy BMI and breastfeeding groups. Infants born from mothers with excessive GWG and PCF status presented more abundance of *Streptococcus*, *Veillonella* and *Bifidobacterium*, in order of abundance, in comparison with other three GWG and breastfeeding groups. *Bifidobacterium* was the bacterial genus found in higher proportion in other groups (**Figure S1**).

Infant stool alpha-diversity was different according to maternal GWG (p-value=0.005) (**Figure 3-A**). GWG adequacy was significantly associated with alpha diversity even after adjustment for confounders ($\beta=0.351$; SE=0.146; p-value=0.020) (results not shown). The alpha diversity was significantly different when adequate GWG and EBF and excessive GWG and PCF groups were compared (p-value= 0.036) (**Table S3** and **Figure S3-A**). A significant association between excessive GWG and PCF and alpha diversity was found (p-value=0.017) (**Table S4**).

Alpha diversity, phylogenetic diversity, number of observed species and beta diversity did not differ according to pre-pregnancy maternal BMI (**Figure 2** and **Figure 4**), according to the combined categories of pre-pregnancy BMI and breastfeeding (**Figure S2** and **Figure S4**), for GWG categories (**Figure 3-B e C** and **Figure 5**), nor for combined categories of GWG and breastfeeding (**Figure S3** and **Figure S5**).

Infants born from overweight mothers were enriched in bacterial genus *Dialister* and bacterial species *ruminis*, *parainfluenzae* and *parvula*. Infants born from mothers with excessive GWG had major abundance bacterial at class *Bacilli*, order *Lactobacillales* and *Bacillales*, family *Staphylococcaceae*, genus *Staphylococcus* and *Actinobacillus* and species *caccaae* (**Figure 6**). No differences were found in LEfSe for the combined categories of pre-pregnancy BMI and breastfeeding status and GWG and breastfeeding (**results not shown**).

Discussion

The excessive BMI and GWG were associated with distinct infant microbial community structure. Excessive GWG was positively associated with alpha diversity after adjustment for confounders such as maternal age, number of children, type of delivery and birth weight. Breastfeeding practice status has modified infant gut microbiota composition. PCF status decreased the abundance of *Bifidobacterium* among women with excessive pre-pregnancy BMI or excessive GWG. Excessive GWG and PCF practice were associated with high infant gut microbiota alpha diversity at one month postpartum. No differences were found for none of the diversity measures according pre-pregnancy BMI or the combined pre-pregnancy BMI and breastfeeding groups.

Only three studies have evaluated healthy infant gut microbiota in Brazil (22, 31, 32). A unique feature of the current investigation is that for the first time the role of breastfeeding as an effect modifier on infant gut microbiota was assessed for categories of pre-pregnancy BMI and GWG. Another differential is the sophisticated statistical techniques used to assess the infant gut microbiota. Our sample contains ~99% of the main phyla of bacteria found in the human gut microbiota, a result that agrees with Mueller et al. (2016) on a sample of 74 infants at 2 days (22). Our findings also agrees with Taliro et al. (2017) that observed more abundance of *Bifidobacterium* on a sample of 12 infants at one month postpartum (31) and with more abundance of *Escherichia* for 10 infants studied by Brandt et al. (2012) at on one month (32).

Distinct patterns of infant gut microbiota composition were observed according to pre-pregnancy BMI and GWG adequacy. The gut microbiota of infants born from overweight mothers was increased with *Escherichia* and decreased with *Streptococcus*. A previous study with 50 Spanish mothers has shown that maternal pre-pregnancy overweight ($<25 \text{ kg/m}^2$) was related to increased *Escherichia coli* maternal gut microbiota at the third gestational trimester (17). This is an important finding, since maternal microbiota is a factor that can modify the infant microbiota (33). Our findings agree with two American studies (34, 35). The first has also shown increment of *Escherichia* in gut microbiota at first six months for infants born from mothers with excessive GWG according the IOM (35). Our results also agrees with the finding of less abundance of *Streptococcus* at one week for infants born from mothers with excessive pre-pregnancy BMI (15).

In our sample the alpha, beta and phylogenetic diversity, and number of observed species revealed no difference between infants born from pre-pregnancy normal or

excessive BMI mothers. One study from the USA showed an increment of alpha diversity in microbiota at two years on infants born from overweight mothers (20). On the other hand, several studies did not find statistically significant differences for alpha diversity when normal and overweight mothers were compared at different timings (one day, one week and two years) (15, 22, 23). Pre-pregnancy overweight does not seem to have an impact on infant gut microbiota diversity, but only on microbiota composition. This behavior seems to be also observed on maternal gut microbiota (17, 18, 36). Excessive GWG was directly associated with infant gut microbiota alpha diversity on our results. Few studies have evaluated this relationship (35, 37, 38) and only one has evaluated the diversity of infant gut microbiota (35). Robinson et al. (2017) observed that North-American infants born from mothers with insufficient GWG presented high Shannon index (35). GWG inadequacy (excessive or insufficient) has a negative impact on child health (39, 40), and it appears that one of the effects is on the increased infant gut microbiota diversity that has been linked to adverse childhood outcomes (37, 38).

Our study has shown that excessive pre-pregnancy BMI was positively associated with the bacterial genus *Dialister* and species *Haemophilus parainfluenzae* and *Veillonella parvula*. Those bacterial genus and species have been observed in inflammation states, e.g. in obesity (34), spondylarthritis (41), orthodontic infections (42-45) and urinary tract infections (46). During pregnancy, the inflammation state is physiological and important for adequate fetal development. However, this process may be exacerbated for women with obesity and this can affect maternal and infant gut microbiota. *Dialister* was found on obesity subjects. In pre-pregnancy overweight maternal gut microbiota at the third trimester in a study with 50 Spanish (34). A similar result was found for gut microbiota of infants born from overweight pre-pregnancy mother at two years in a study with 79 North-Americans, in comparison with pre-pregnancy normal BMI (20). In addition, *Haemophilus parainfluenzae* has been related to urinary tract infections and this type of colonization favors vertical transmission to the infant during the intrapartum period (46). Finally, *Veillonella parvula* is a commensal bacterial found in the mouth (47-49) and has been associated with periodontitis (50), which is more prevalent in high pre-pregnancy BMI (51). Thus, the inflammatory state seems to modulate the maternal gut microbiota, which in turn affects the infant gut microbiota. This demonstrates that the altered maternal gut microbiota probably can be transferred to the infants.

Excessive pre-pregnancy BMI also showed association with *Lactobacillus ruminis*, that it is often observed in adult gut microbiota. Nagpal et al. (2016) has shown an increment of this species between three days and six months, only in infants born from vaginal delivery on a sample of 151 Japanese infants (52). A study in Malawi rural area, also found this species in infant gut microbiota at six months (53). Our study is the first to highlight this species in the gut microbiota of Brazilians infants. There is little evidence regarding the presence of this species of bacteria in the infant intestinal microbiota. It is important to be reported, as microbiota is affected for geographic (54).

Some studies observed the presence of *Staphylococcus aureus* in infant and maternal microbiota of mothers with pre-pregnancy overweight (17-19). Excessive GWG was positively associated with *Staphylococcus* genus, *Staphylococcaceae* family, *Bacillales* order and *Bacilli* class. However, due to the reduced number of studies conducted within this topic, this finding has not been documented in the gut microbiota of infants born from mothers with excessive GWG.

Our results revealed that PCF status decreased the abundance of *Bifidobacterium* on gut microbiota of infants born from mothers with excessive BMI/GWG. Only one North-American study with 43 infants has evaluated a combined effect of maternal pre-pregnancy BMI and breastfeeding on the infant gut microbiota at one week. This study observed higher abundance of *Megasphaera*, *Akkermansia* and *Klebsiella* and lower *Verrucomicrobia* genus in infants born from mother with pre-pregnancy obesity (15). A Finnish study with 42 pairs mothers-infants observed a decreased abundance of bacterial genus *Bifidobacterium* in maternal overweight children (19), a result that agrees with our findings when we considered the combined effect of excessive pre-pregnancy BMI and PCF group, but not for the EBF group. A recent meta-analysis has shown that infants that were PCF significantly increased abundance of *Veillonellaceae* family and decreased *Bifidobacteriaceae* family (26), a result that agrees with our findings. Excessive GWG and PCF group was associated with alpha diversity, and the same meta-analysis also observed a positive association between non-exclusive breastfeeding and alpha diversity (26). Breastfeeding may modulate the association between maternal overweight and the infant gut microbiota. To the best of our knowledge, this is the first study that has shown the effect of breastfeeding on the association between maternal overweight and the infant gut microbiota. Breast milk is a route for maternal bacteria transmission for infants (55). The presence of human milk oligosaccharides helps modulating the infant microbiota, serving as substrate for some intestinal bacteria (56). Thus, it demonstrates the protective

effect of exclusive breastfeeding on the association of overweight maternal and the composition of the infant gut microbiota.

There are some limitations pertaining to this study. Maternal pre-pregnancy weight was self-reported at the third trimester, thus there is a possibility of recall bias, although the use of self-reported weight has been reported to be valid (57). In our study, we excluded infants that used antibiotics from birth until stool sample collection. However, some studies have discussed the effect of maternal antibiotic use during pregnancy in mother and infant microbiota (58). We did not exclude mothers that have taken antibiotic during pregnancy because there is evidence that most species return to normal abundance a month after antibiotic use (59). The strengths of this study include the assessment of infant gut microbiota using sequencing method and the fact this is the first time a study has documented the effect modification of breastfeeding on the association between maternal overweight and the infant gut microbiota.

In conclusion, excessive BMI and GWG were positively associated with infant gut microbial abundance. Alpha diversity was higher for infants born from mother with excessive GWG compared with adequate GWG. PCF practices seem to modify the effect of excessive GWG and BMI on infant gut microbiota decreasing the abundance of *Bifidobacterium*. Furthermore, large prospective cohort studies are needed to examine this association at long term, including other infant feeding modes, as breastfeeding indicators suggested by WHO.

References

1. Yang I, Corwin EJ, Brennan PA, Jordan S, Murphy JR, Dunlop A. The Infant Microbiome: Implications for Infant Health and Neurocognitive Development. *Nursing research*. 2016;65(1):76-88.
2. Chu DM, Ma J, Prince AL, Antony KM, Seferovic MD, Aagaard KM. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature medicine*. 2017;23(3):314-26.
3. Arrieta MC, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist-Doutsch S, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Science translational medicine*. 2015;7(307):1-15.
4. Martin R, Makino H, Cetinyurek Yavuz A, Ben-Amor K, Roelofs M, Ishikawa E, et al. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PloS one*. 2016;11(6):1-30.
5. Martin CR, Mayer EA. Gut-Brain Axis and Behavior. *Nestle Nutrition Institute workshop series*. 2017;88:45-53.
6. Goodman B, Gardner H. The microbiome and cancer. *J Pathol*. 2018;244(5):667-76.
7. Ahmadmehrabi S, Tang WHW. Gut microbiome and its role in cardiovascular diseases. *Curr Opin Cardiol*. 2017;32(6):761-6.
8. Lane ER, Zisman TL, Suskind DL. The microbiota in inflammatory bowel disease: current and therapeutic insights. *J Inflamm Res*. 2017;10:63-73.
9. Mosca A, Leclerc M, Hugot JP. Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem? *Front Microbiol*. 2016;7(455):1-12.
10. World Health Organization WHO. Noncommunicable disease: a major health challenge of the 21st century. In: *statistics*. Wh, editor. Geneva2012.
11. Baugh N, Harris DE, Aboueissa A-M, Sarton C, Lichter E. The Impact of Maternal Obesity and Excessive Gestational Weight Gain on Maternal and Infant Outcomes in Maine: Analysis of Pregnancy Risk Assessment Monitoring System Results from 2000 to 2010. *J Pregnancy*. 2016;2016(5871313):1-10.
12. Wallace JG, Gohir W, Sloboda DM. The impact of early life gut colonization on metabolic and obesogenic outcomes: what have animal models shown us? *J Dev Orig Health Dis*. 2016;7(1):15-24.

13. Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Critical reviews in microbiology*. 2017;43(3):352-69.
14. Salvo-Romero E, Alonso-Cotoner C, Pardo-Camacho C, Casado-Bedmar M, Vicario M. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Rev Esp Enferm Dig*. 2015;107(11):686-96.
15. Sugino KY, Paneth N, Comstock SS. Michigan cohorts to determine associations of maternal pre-pregnancy body mass index with pregnancy and infant gastrointestinal microbial communities: Late pregnancy and early infancy. *PloS one*. 2019;14(3):1-19.
16. Gomez-Arango LF, Barrett HL, McIntyre HD, Callaway LK, Morrison M, Dekker Nitert M, et al. Connections Between the Gut Microbiome and Metabolic Hormones in Early Pregnancy in Overweight and Obese Women. *Diabetes*. 2016;65(8):2214-23.
17. Santacruz A, Collado MC, García-Valdés L, Segura MT, Martín-Lagos JA, Anjos T, et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *British Journal of Nutrition*. 2010;104(1):83-92.
18. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(4):894-9.
19. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;92(5):1023-30.
20. Galley JD, Bailey M, Kamp Dush C, Schoppe-Sullivan S, Christian LM. Maternal obesity is associated with alterations in the gut microbiome in toddlers. *PloS one*. 2014;9(11):1-13.
21. Lemas DJ, Young BE, Baker PR, 2nd, Tomczik AC, Soderborg TK, Hernandez TL, et al. Alterations in human milk leptin and insulin are associated with early changes in the infant intestinal microbiome. *The American journal of clinical nutrition*. 2016;103(5):1291-300.
22. Mueller NT, Shin H, Pizoni A, Werlang IC, Matte U, Goldani MZ, et al. Birth mode-dependent association between pre-pregnancy maternal weight status and the neonatal intestinal microbiome. *Scientific reports*. 2016;6(23133):1-9.
23. Stanislawski MA, Dabelea D, Wagner BD, Sontag MK, Lozupone CA, Eggesbo M. Pre-pregnancy weight, gestational weight gain, and the gut microbiota of mothers and their infants. *Microbiome*. 2017;5(1):1-12.

24. Cerdo T, Ruiz A, Jauregui R, Azaryah H, Torres-Espinola FJ, Garcia-Valdes L, et al. Maternal obesity is associated with gut microbial metabolic potential in offspring during infancy. *Journal of physiology and biochemistry*. 2018;74(1):159-69.
25. Dreisbach C, Prescott S, Alhusen J. Influence of Maternal Prepregnancy Obesity and Excessive Gestational Weight Gain on Maternal and Child Gastrointestinal Microbiome Composition: A Systematic Review. *Biological research for nursing*. 2020;22(1):114-25.
26. Ho NT, Li F, Lee-Sarwar KA, Tun HM, Brown BP, Pannaraj PS, et al. Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. *Nature communications*. 2018;9(1):1-13.
27. Medicine Io. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In: Rasmussen KM, Yaktine AL, editors. *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines*. Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences.; 2009.
28. (WHO) WHO. Indicators for assessing infant and young child feeding practices. Conclusions of consensus meeting held 6-8 November 2007. . Washington D.C., USA 2007.
29. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*. 2012;6(8):1621-4.
30. McMurdie PJ, Holmes S. Shiny-phyloseq: Web application for interactive microbiome analysis with provenance tracking. *Bioinformatics*. 2014;31(2):282-3.
31. Talarico ST, Santos FE, Brandt KG, Martinez MB, Taddei CR. Anaerobic bacteria in the intestinal microbiota of Brazilian children. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2017;72(3):154-60.
32. Brandt K, Taddei CR, Takagi EH, Oliveira FF, Duarte RTD, Irino I, et al. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2012;67(2):113-23.
33. Mulligan CM, Friedman JE. Maternal modifiers of the infant gut microbiota: metabolic consequences. *The Journal of endocrinology*. 2017;235(1):R1-R12.
34. Sugino KY, Paneth N, Comstock SS. Michigan cohorts to determine associations of maternal pre-pregnancy body mass index with pregnancy and infant gastrointestinal microbial communities: Late pregnancy and early infancy. *PLOS ONE*. 2019;14(3):e0213733.
35. Robinson A, Fiechtner L, Roche B, Ajami NJ, Petrosino JF, Camargo CA, Jr., et al. Association of Maternal Gestational Weight Gain With the Infant Fecal Microbiota. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2017;65(5):509-15.

36. Houttu N, Morkkala K, Laitinen K. Overweight and obesity status in pregnant women are related to intestinal microbiota and serum metabolic and inflammatory profiles. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2018;37(6 Pt A):1955-66.
37. Kostic AD, Gevers D, Siljander H, Vatanen T, Hyotylainen T, Hamalainen AM, et al. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell host & microbe*. 2015;17(2):260-73.
38. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2014;44(6):842-50.
39. Goldstein RF, Abell SK, Ranasinha S, Misso M, Boyle JA, Black MH, et al. Association of Gestational Weight Gain With Maternal and Infant Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Jama*. 2017;317(21):2207-25.
40. Goldstein RF, Abell SK, Ranasinha S, Misso ML, Boyle JA, Harrison CL, et al. Gestational weight gain across continents and ethnicity: systematic review and meta-analysis of maternal and infant outcomes in more than one million women. *BMC medicine*. 2018;16(1):1-14.
41. Tito RY, Cypers H, Joossens M, Varkas G, Van Praet L, Glorieus E, et al. Brief Report: Dialister as a Microbial Marker of Disease Activity in Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(1):114-21.
42. Morio F, Jean-Pierre H, Dubreuil L, Jumas-Bilak E, Calvet L, Mercier G, et al. Antimicrobial Susceptibilities and Clinical Sources of Dialister Species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(12):4498-501.
43. Adriaens LM, Alessandri R, Spörri S, Lang NP, Persson GR. Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota? *J Periodontol*. 2009;80(1):72-81.
44. Djais AA, Theodorea CF, Mashima I, Otomo M, Saitoh M, Nakazawa F. Identification and phylogenetic analysis of oral Veillonella species isolated from the saliva of Japanese children. *F1000Res*. 2019;8(616):1-19.
45. Ortiz S, Herrman E, Lyashenko C, Purcell A, Raslan K, Khor B, et al. Sex-specific differences in the salivary microbiome of caries-active children. *J Oral Microbiol*. 2019;11(1):1-12.
46. Alsuhaibani MA. Premature Infant with Haemophilus parainfluenzae Sepsis: Case Report and Literature Review. *J Trop Pediatr*. 2019;65(6):638-41.

47. Do T, Sheehy EC, Mulli T, Hughes F, Beighton D. Transcriptomic analysis of three *Veillonella* spp. present in carious dentine and in the saliva of caries-free individuals. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2015;5(25):1-8.
48. Rosen R, Amirault J, Liu H, Mitchell P, Hu L, Khatwa U, et al. Changes in gastric and lung microflora with acid suppression: acid suppression and bacterial growth. *JAMA pediatrics*. 2014;168(10):932-7.
49. Africa CWJ, Nel J, Stemmet M. Anaerobes and bacterial vaginosis in pregnancy: virulence factors contributing to vaginal colonisation. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(7):6979-7000.
50. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza's clinical periodontology*: Elsevier health sciences; 2011.
51. Lee H-J, Jun J-K, Lee S-M, Ha J-E, Paik D-I, Bae K-H. Association between obesity and periodontitis in pregnant females. *J Periodontol*. 2014;85(7):e224-e31.
52. Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Kawashima K, Nagata S, Nomoto K, et al. Sensitive Quantitative Analysis of the Meconium Bacterial Microbiota in Healthy Term Infants Born Vaginally or by Cesarean Section. *Front Microbiol*. 2016;7:1-9.
53. Aakko J, Endo A, Mangani C, Maleta K, Ashorn P, Isolauri E, et al. Distinctive Intestinal *Lactobacillus* Communities in 6-Month-Old Infants From Rural Malawi and Southwestern Finland. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2015;61(6):641-8.
54. Senghor B, Sokhna C, Ruimy R, Lagier J-C. Gut microbiota diversity according to dietary habits and geographical provenance. *Human Microbiome Journal*. 2018;7-8:1-9.
55. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2017;81(4):1-67.
56. James K, Bottacini F, Contreras JIS, Vigoureux M, Egan M, Motherway MOC, et al. Metabolism of the predominant human milk oligosaccharide fucosyllactose by an infant gut commensal. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-20.
57. Headen I, Cohen AK, Mujahid M, Abrams B. The accuracy of self-reported pregnancy-related weight: a systematic review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2017;18(3):350-69.
58. Azad MB, Konya T, Persaud RR, Guttman DS, Chari RS, Field CJ, et al. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during

the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2016;123(6):983-93.

59. Palleja A, Mikkelsen KH, Forslund SK, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nature microbiology*. 2018;3(11):1255-65.

Table 1. Characteristics of mother-child pairs followed in Rio de Janeiro, Brazil, 2016–2019.

Continuous variables	All participants (N= 101)		With infant stool sample (N= 56)		Without infant stool sample (N= 45)		p-value
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	
Maternal age (years)	26.5	22.5-31.6	27.2	22.9-31.9	26.5	22.4-31.1	0.567 ¹
Years of study (years)	12	9-12	12	9-12	12	9-12	0.895 ¹
Pre-pregnancy weight (kg)	61.5	55.0-71.0	63.7	56.0-71.0	61.5	55.0-71.0	0.564 ¹
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	24.3	21.1-28.4	25.2	21.9-28.3	24.3	21.6-29.2	0.553 ¹
Gestational weight gain (kg)	12.3	9.0-15.7	11.8	9.5-16.0	12.3	8.5-15.7	0.824 ²
Birth weight (g)	3,260	3,005-3,600	3,275	3,020-3,530	3,260	2,990-3,670	0.980 ¹

Categorical variable	All participants (N= 101)		With infant stool sample (N= 56)		Without infant stool sample (N= 45)		p-value
	Frequency (%)		Frequency (%)		Frequency (%)		
Pre-pregnancy BMI (kg/ m ²)							
Normal (< 25.0)	56 (55.4)		27 (48.2)		29 (64.4)		0.124 ³

Excessive (≥ 25.0)	45 (44.6)	29 (51.8)	16 (35.6)	
Gestational weight gain adequacy				
Adequate	68 (67.3)	36 (64.3)	32 (71.1)	0.467 ³
Excessive	33 (32.7)	20 (35.7)	13 (28.9)	
Child sex				
Male	52 (51.5)	28 (50.0)	24 (53.3)	0.739 ³
Female	49 (48.5)	28 (50.0)	21 (46.7)	
Mode of delivery				
Vaginal	64 (63.4)	41 (73.2)	23 (51.1)	0.022³
Cesarean section	37 (36.6)	15 (26.8)	22 (48.9)	
Number of children				
0	57 (56.4)	30 (53.6)	27 (60.0)	0.517 ³
≥ 1	44 (43.6)	26 (46.4)	18 (40.0)	
Gestational age at birth (weeks)				
<37	6 (5.9)	2 (3.6)	4 (8.9)	0.522 ⁴
37-41	93 (92.1)	53 (94.6)	40 (88.9)	

≥42	2 (2.0)	1 (1.8)	1 (2.2)	
Type of breastfeeding at 28–45days				
Exclusive	55 (54.5)	31 (55.4)	24 (53.3)	0.964 ³
Predominant/complementary	46 (45.5)	25 (44.6)	21 (46.7)	

Notes: IQR: Interquartile range; BMI: body mass index; GWG: gestational weight gain. ¹ Wilcoxon Mann-Whitney test; ² t-test; ³ Chi square test; ⁴ Fisher's exact test. GWG categories according to pre-pregnancy BMI categories (IOM guidelines - 2009): Underweight, normal-weight, overweight and obese women should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5.0 and 9.0 kg, respectively. We categorized values above these intervals as excessive, and below and within these values as normal GWG.

Infant gut microbiota at 1 month

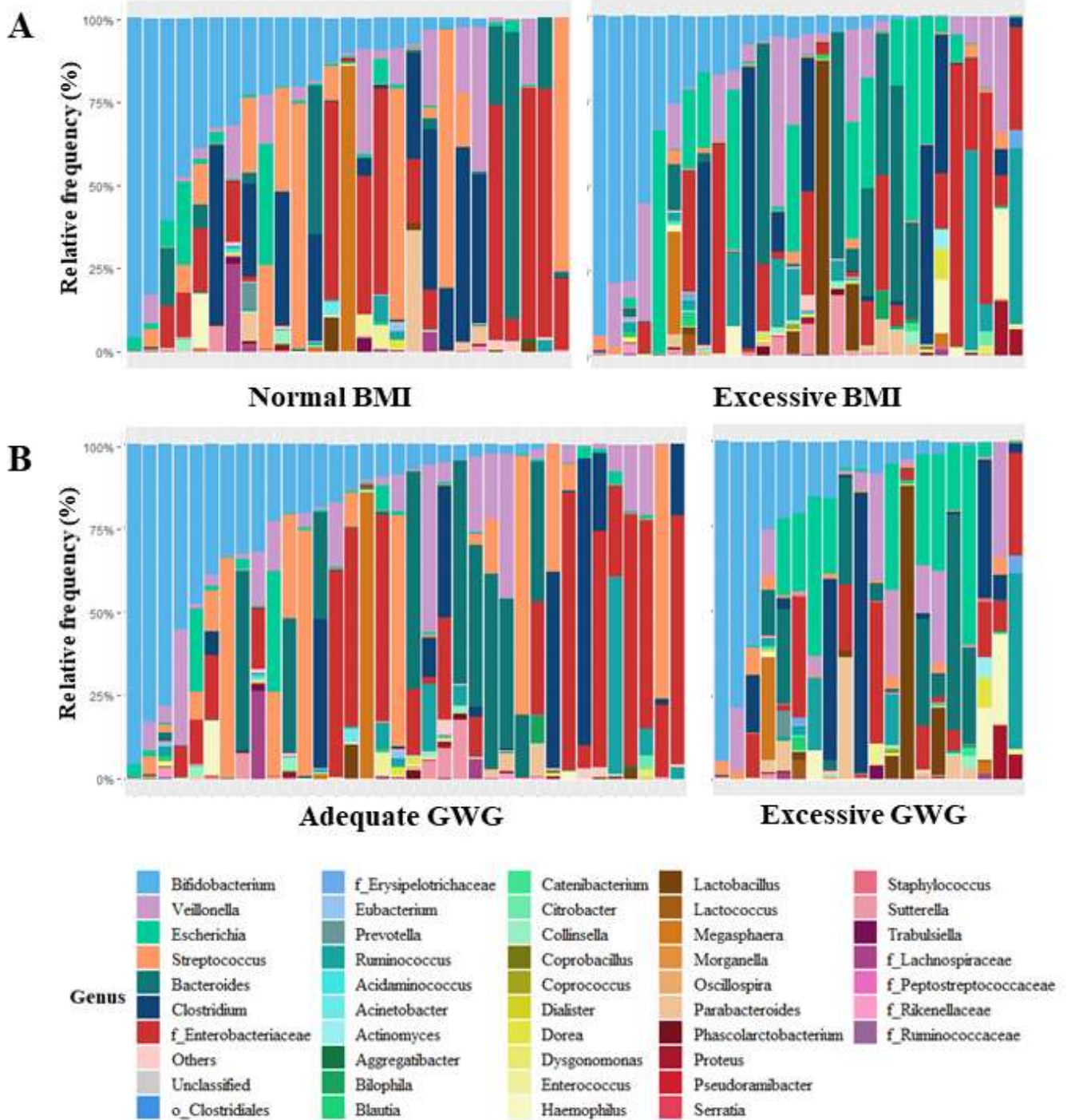


Figure 1. Infant gut microbiota composition at genus level at one month.

Each bar represents relative abundance of each genus of gut microbiota. (A) Relative abundance by maternal pre-pregnancy BMI categories and (B) by maternal GWG categories. Notes: BMI: body mass index; GWG: Gestational weight gain. Maternal pre-pregnancy BMI categories: Normal BMI ($<25.0 \text{ kg/m}^2$) and Excessive BMI ($\geq 25.0 \text{ kg/m}^2$). GWG categories according to pre-pregnancy BMI categories (IOM guidelines - 2009): Underweight, normal-weight, overweight and obese women should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5.0 and 9.0 kg, respectively. We categorized values above these intervals as excessive, and below and within these values as normal GWG.

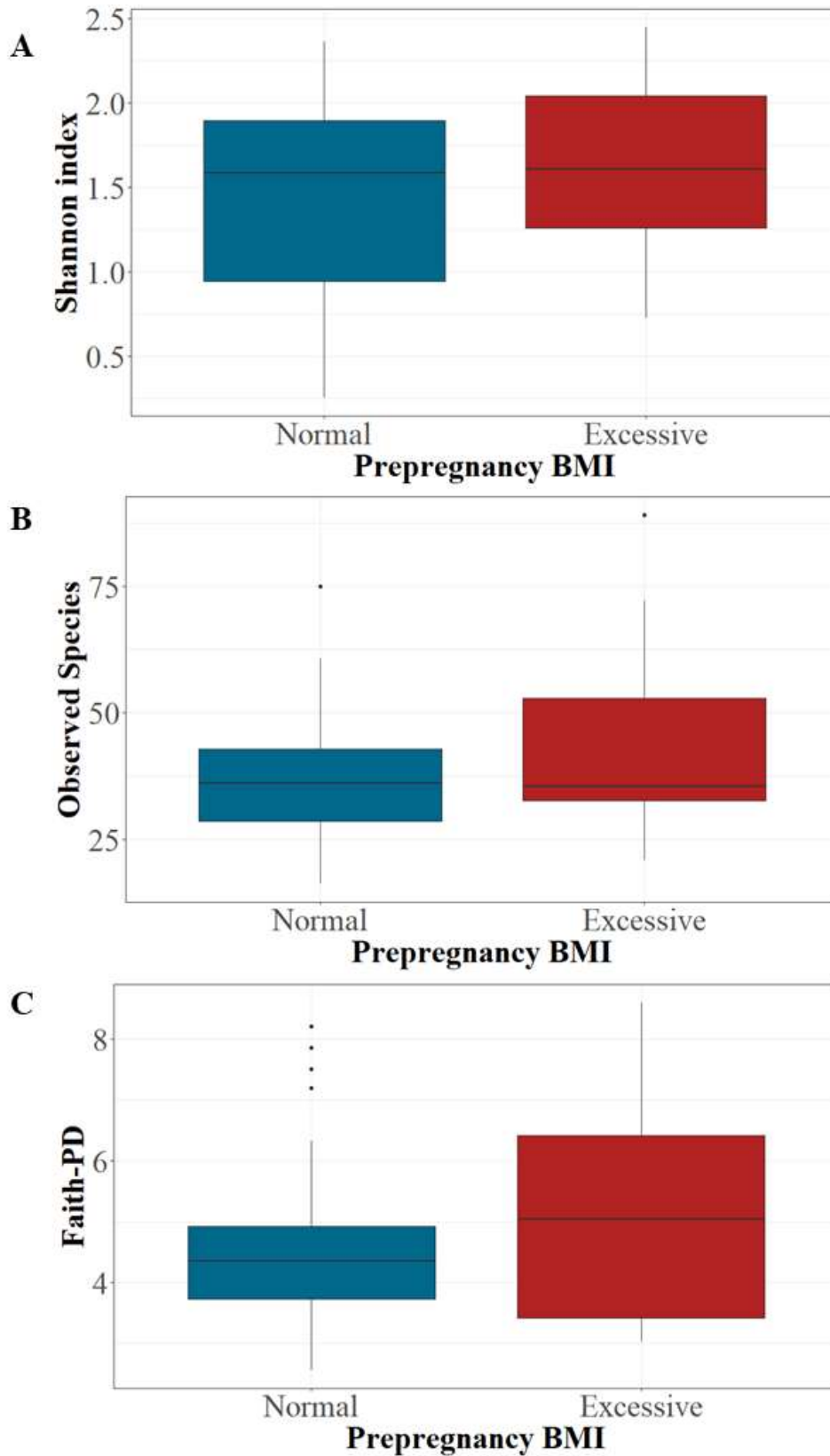


Figure 2. Infant gut microbiome (A) alpha-diversity (Shannon index), (B) observed species and (C) Faith index - phylogenetic diversity (PD) according to pre-pregnancy BMI.

(Wilcoxon Mann-Whitney test - p-value: Shannon index = 0.464, observed OTUs = 0.241, Faith-PD = 0.370). Notes: BMI – Body mass index; Maternal pre-pregnancy BMI categories: Normal BMI (<25.0 kg/m²) and Excessive BMI (≥ 25.0 kg/m²).

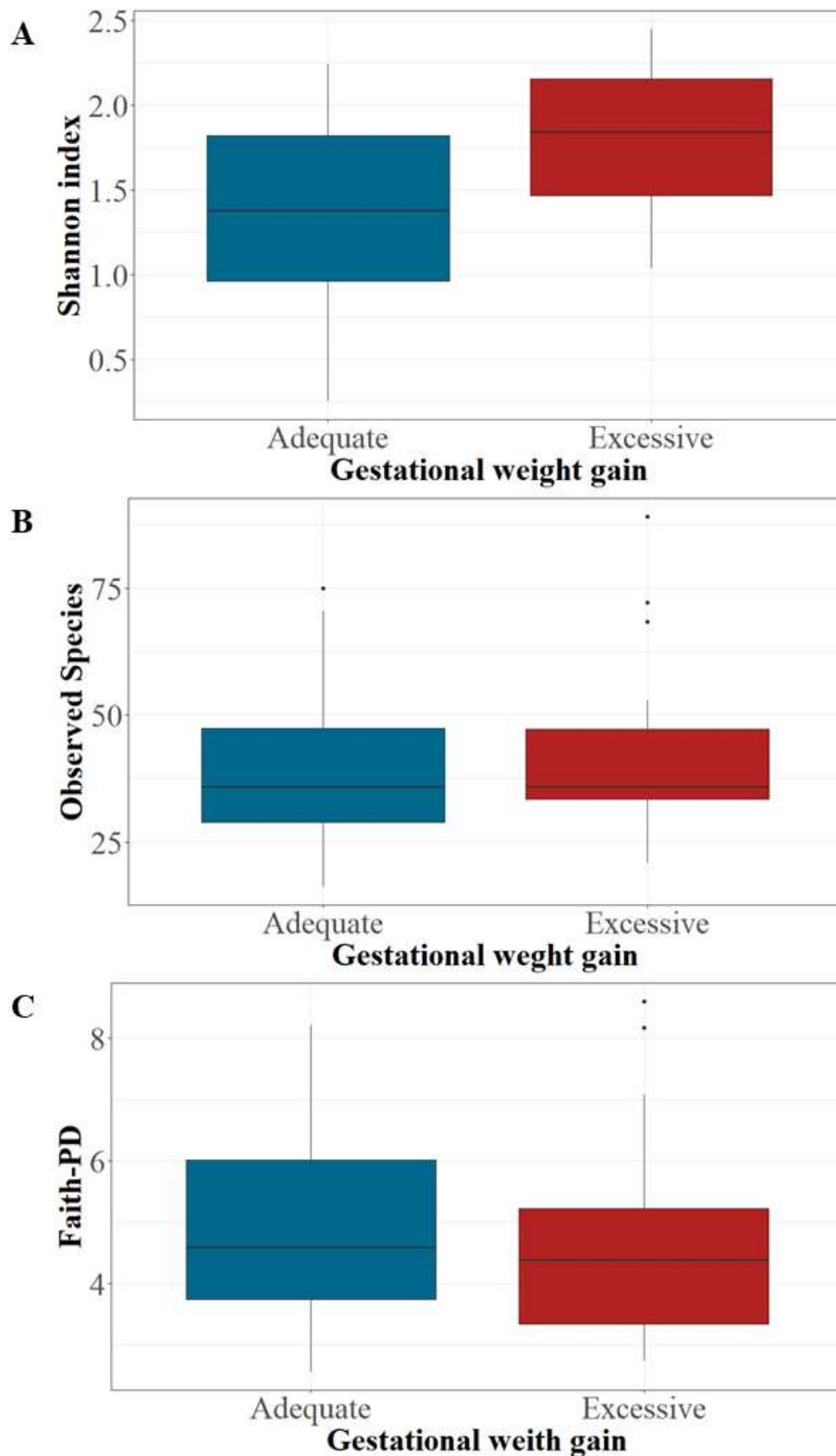


Figure 3. Infant gut microbiome (A) alfa-diversity (Shannon index), (B) observed species and (C) Faith index - phylogenetic diversity (PD) according to gestational weight gain.

(Wilcoxon Mann-Whitney test - p-value: Shannon index = **0.005**, observed OTUs = 0.644, Faith-PD = 0.439). Notes: Gestational weight gain (GWG) categories according to pre-pregnancy BMI categories (IOM guidelines - 2009): Underweight, normal-weight, overweight and obese women should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5.0 and 9.0 kg, respectively. We categorized values above these intervals as excessive, and below and within these values as normal GWG.

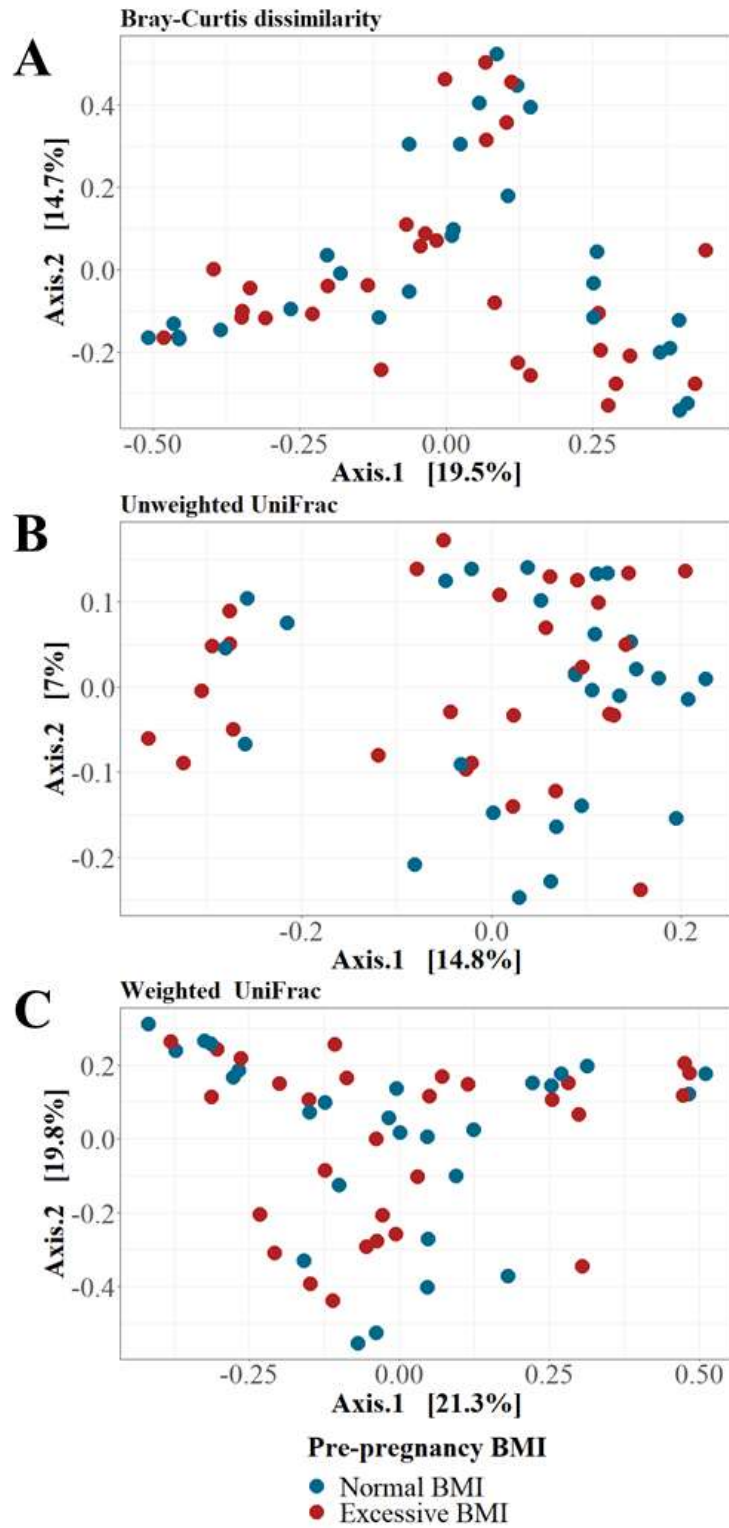


Figure 4. Principal coordinate analysis according to pre-pregnancy BMI for (A) Bray-Curtis dissimilarity, (B) Unweight UniFrac and (C) Weight UniFrac.

Notes: BMI: body mass index; Maternal pre-pregnancy BMI categories: Normal BMI (<25.0 kg/m²) and Excessive BMI (≥ 25.0 kg/m²). PERMANOVA was used to test dissimilarity between groups. We found no statistical differences.

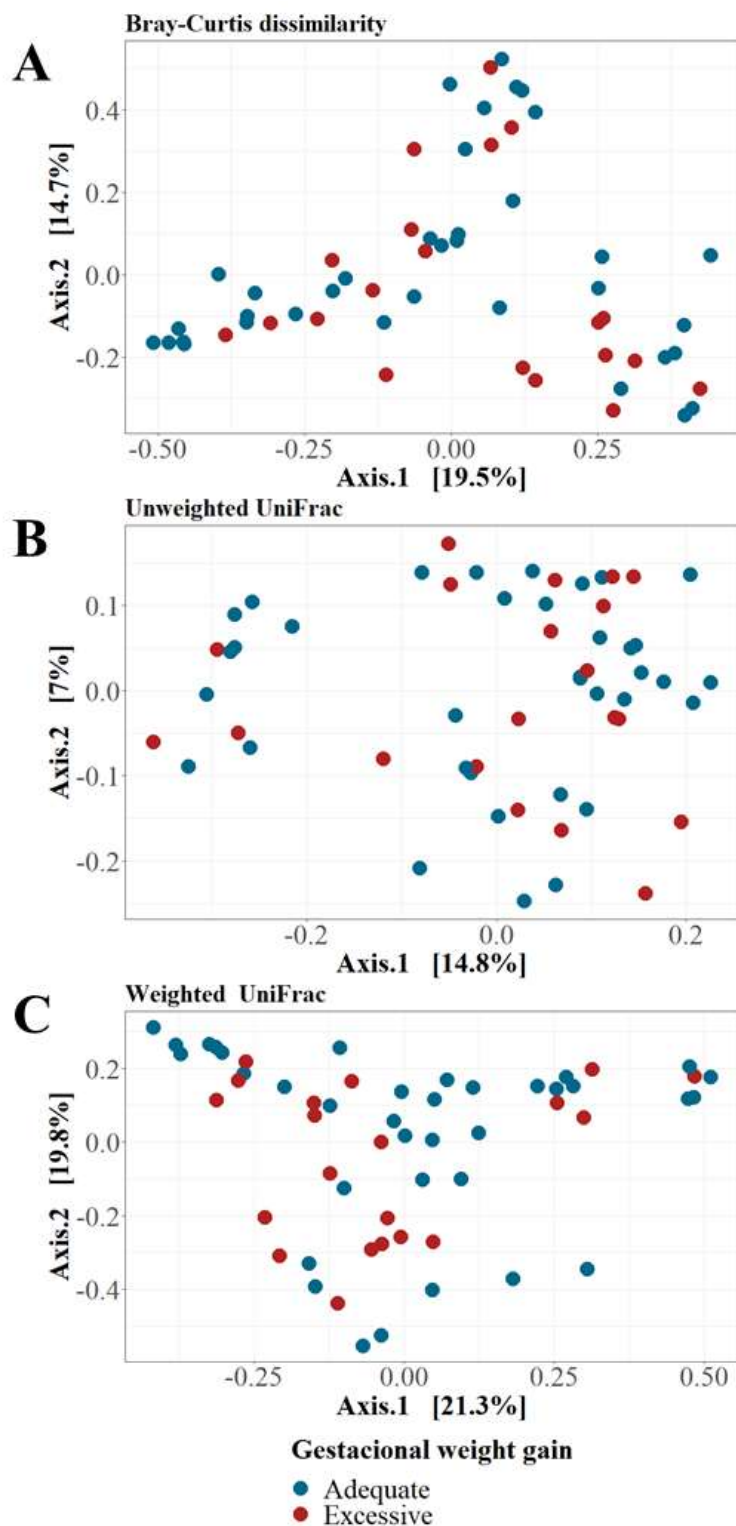


Figure 5. Principal coordinate analysis according to gestational weight gain adequacy for (A) Bray-Curtis dissimilarity, (B) Unweight UniFrac and (C) Weight UniFrac.

Notes: GWG: gestational weight gain. GWG categories according to pre-pregnancy BMI categories (IOM guidelines - 2009): Underweight, normal-weight, overweight and obese women should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5.0 and 9.0 kg, respectively. We categorized values above these intervals as excessive, and below and within these values as normal GWG. PERMANOVA was used to test dissimilarity between groups. We found no statistical differences.

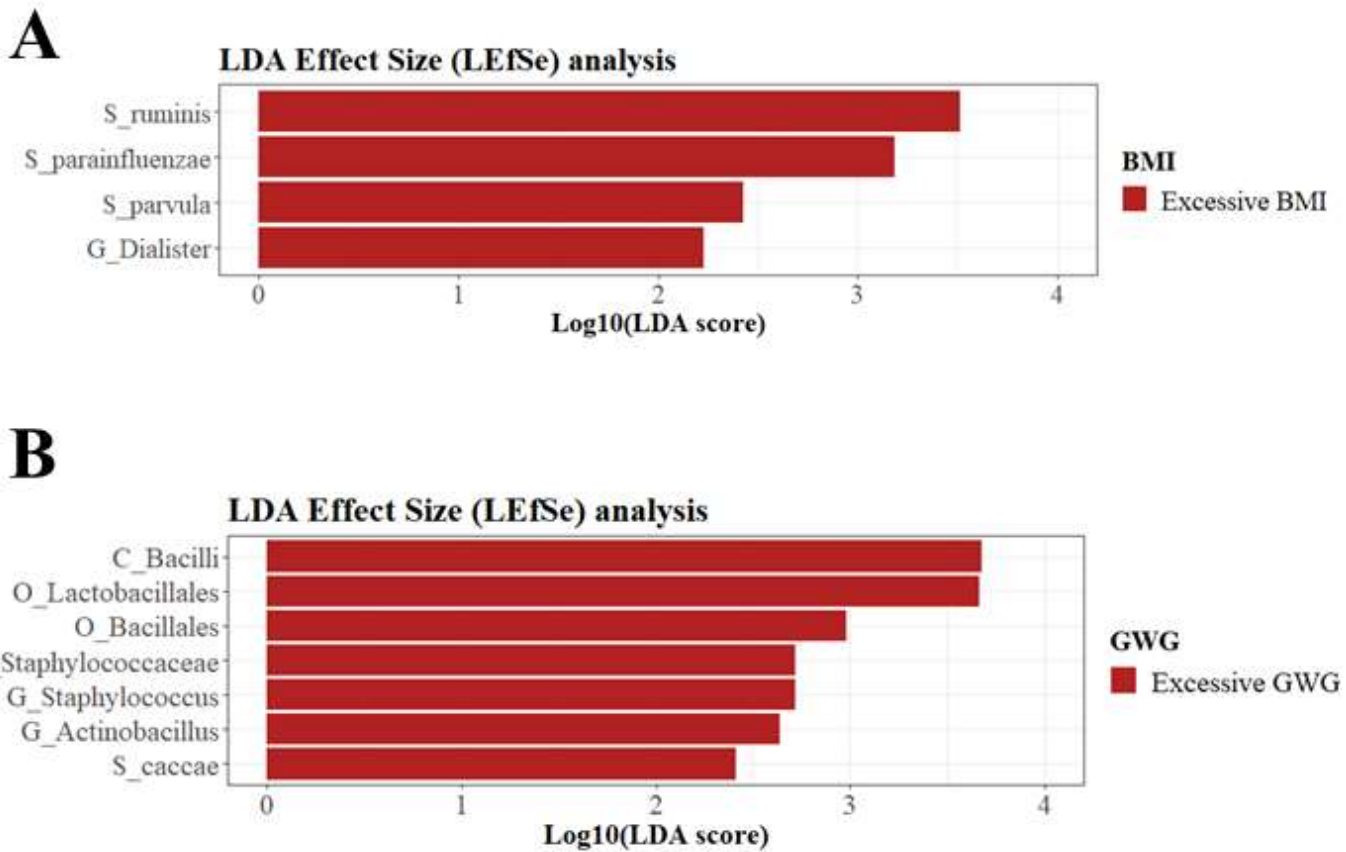


Figure 6. Linear discriminant analysis effect size according to (A) pre-pregnancy BMI and (B) GWG. No differences were found for normal BMI and excessive GWG categories. Notes: BMI: body mass index; GWG: Gestational weight gain. Maternal pre-pregnancy BMI categories: Normal BMI (<25.0 kg/m²) and Excessive BMI (≥ 25.0 kg/m²). GWG categories according to pre-pregnancy BMI categories (IOM guidelines - 2009): Underweight, normal-weight, overweight and obese women should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5.0 and 9.0 kg, respectively. We categorized values above these intervals as excessive, and below and within these values as normal GWG.

Supplementary data

Table S1. Characteristics of mother-child pairs according to combined categories of pre-pregnancy body mass index and breastfeeding.

Continuous variable	Pre-pregnancy body mass index and breastfeeding								p-value
	Normal BMI and EBF (N=16)		Normal BMI and PCF (N=11)		Excessive BMI and EBF (N=15)		Excessive BMI and PCF (N=14)		
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	
Maternal age (years)	23.9 ^a	21.2-28.7	23.6 ^b	21.2-28.5	27.7	22.9-31.6	32.5 ^{ab}	28.3-35.8	0.003 ¹
Years of study (years)	12	10-12	11	9-12	12	11-12	11	6-12	0.337 ¹
Gestational weight gain (kg)	14.4	11.4-16.5	10.4	8.7-12.3	11.8	8.6-14.4	11.8	8.5-19	0.507 ²
Birth weight (g)	3,245 ^{ac}	3,055-3,405	2,937 ^{abd}	2,530-3,250	3,150 ^{be}	2,955-3,530	3,792.5 ^{cde}	3,405-3,930	0.001 ¹
Categorical variable	Frequency (%)								p-value
Child sex									
Male	6 (37.5)		4 (36.4)		8 (53.3)		10 (71.4)		0.392 ⁴
Female	10 (62.5)		7 (63.6)		7 (46.7)		4 (28.6)		
Mode of delivery									
Vaginal	14 (87.5)		10 (90.9)		10 (66.7)		7 (50.0)		0.064 ⁴

Cesarean section	2 (12.5)	1 (9.1)	5 (33.3)	7 (50.0)	
Number of children					
0	8 (50.0)	10 (90.9)	9 (60.0)	4 (28.6)	0.005⁴
≥ 1	8 (50.0)	1 (9.1)	6 (40.0)	11 (71.4)	
Gestational age at birth (weeks)					
<37	0 (0.0)	1 (9.1)	1 (6.7)	0 (0.0)	0.436 ⁴
37-41	16 (100.0)	10 (90.9)	14 (93.3)	13 (92.9)	
≥42	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (7.1)	

Notes: IQR: Interquartile range; BMI: body mass index. EBF: exclusive breastfeeding. PCF: predominant/complementary feeding. ¹ Wilcoxon Mann-Whitney test; ² t test; ³ Chi square test; ⁴ Fisher's exact test. Maternal pre-pregnancy BMI categories: Normal BMI (<25.0 kg/m²) and Excessive BMI (≥ 25.0 kg/m²). Breastfeeding categories: Exclusive breastfeeding (the infant received only breast milk and medicines) and predominant or complementary feeding (the infant received in addition to breast milk, other beverages or foods).

Table S2. Characteristics of mother-child pairs according to combined categories of gestational weight gain adequacy and breastfeeding.

Gestational weight gain adequacy and breastfeeding									
Continuous variable	Adequate GWG and EBF		Adequate GWG and PCF		Excessive GWG and EBF		Excessive GWG and PCF		p-value
	(N=20)		(N=16)		(N=11)		(N=9)		
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	
Maternal age (years)	26.5	21.4-29.9	25.7	23.3-30.9	24.0	22.2-31.6	32.1	28.5-33.1	0.154 ¹
Years of study (years)	12	10-12	10	7.5-12	12	11-12	12	11-12	0.327 ¹
Pre-pregnancy weight (kg)	59 ^{ab}	53.5-65.7	61 ^c	55.5-65	71 ^a	55-74	73 ^{bc}	66-75	0.037 ¹
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	23.7	21.3-26.9	24.7	20.1-25.8	26.6	22.2-29.2	27.9	25.3-31.9	0.137 ¹
Birth weight (g)	3,205 ^a	3,047-3,405	3,160 ^b	2,560-3,460	3,220 ^c	2,930-3,530	3,775 ^{abc}	3,510-3,850	0.014 ¹
Categorical variable	Frequency (%)								p-value
Child sex									
Male	9 (45.0)		7 (43.8)		5 (45.5)		7 (77.8)		0.425 ⁴
Female	11 (55.0)		9 (56.3)		6 (54.5)		2 (22.2)		
Mode of delivery									
Vaginal	16 (80.0)		12 (75.0)		8 (72.7)		5 (55.6)		0.595 ⁴

Cesarean section	4 (20.0)	4 (25.0)	3 (27.3)	4 (44.4)	
Number of children					
0	10 (50.0)	9 (56.3)	7 (63.6)	4 (44.4)	0.858 ⁴
≥ 1	10 (50.0)	7 (43.8)	4 (36.4)	5 (55.6)	
Gestational age at birth (weeks)					
<37	1 (5.0)	1 (6.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	
37-41	19 (95.0)	15 (93.8)	11 (100.0)	8 (88.9)	0.573 ⁴
≥42	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (11.1)	

Notes: IQR: Interquartile range; GWG: Gestational weight gain. EBF: exclusive breastfeeding. PCF: predominant/complementary feeding. ¹ Wilcoxon Mann-Whitney test; ² t test; ³ Chi square test; ⁴ Fisher's exact test. GWG categories according to pre-pregnancy BMI categories (IOM guidelines - 2009): Underweight, normal-weight, overweight and obese women should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5.0 and 9.0 kg, respectively. We categorized values above these intervals as excessive, and below and within these values as normal GWG. Breastfeeding categories: Exclusive breastfeeding (the infant received only breast milk and medicines) and Predominant/ complementary feeding (the infant received in addition to breast milk, other beverages or foods).

Table S3. Differences between infant gut microbiota alfa-diversity (Shannon Index) according to gestational weight gain adequacy and breastfeeding.

Mann-Whitney test – Gestational weight gain and breastfeeding

Compared groups	P-value
Adequate GWG and EBF – Adequate GWG and PCF	0.514
Adequate GWG and EBF – Excessive GWG and EBF	0.299
Adequate GWG and EBF – Excessive GWG and PCF	0.036
Adequate GWG and PCF – Excessive GWG and EBF	0.723
Adequate GWG and PCF – Excessive GWG and PCF	0.155
Excessive GWG and EBF – Excessive GWG and PCF	0.666

Notes: GWG: Gestational weight gain. EBF: exclusive breastfeeding. PCF: predominant/complementary feeding. GWG categories according to pre-pregnancy BMI categories (IOM guidelines - 2009): Underweight, normal-weight, overweight and obese women should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5.0 and 9.0 kg, respectively. We categorized values above these intervals as excessive, and below and within these values as normal GWG. Breastfeeding categories: Exclusive breastfeeding (the infant received only breast milk and medicines) and Predominant/ complementary feeding (the infant received in addition to breast milk, other beverages or foods).

Table S4. Regression of alpha-diversity with combined variable including gestational weight gain and breastfeeding status.

	Infant gut microbiota alpha-diversity					
	Unadjusted			Adjusted		
	β	SE	p-value	β	SE	p-value
Adequate GWG and PCF	0.147	0.161	0.367	0.179	0.171	0.302
Excessive GWG and EBF	0.363	0.183	0.051	0.361	0.192	0.066
Excessive GWG and PCF	0.560	0.196	0.006	0.529	0.214	0.017

Notes: β : Coefficients of linear regression; SE: Standard Error. GWG: gestational weight gain. EBF: exclusive breastfeeding. PCF: predominant/complementary feeding. GWG categories according to pre-pregnancy BMI categories (IOM guidelines - 2009): Underweight, normal-weight, overweight and obese women should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5.0 and 9.0 kg, respectively. We categorized values above these intervals as excessive, and below and within these values as normal GWG. Breastfeeding categories: Exclusive breastfeeding (the infant received only breast milk and medicines) and Predominant/ complementary feeding (the infant received in addition to breast milk, other beverages or foods).

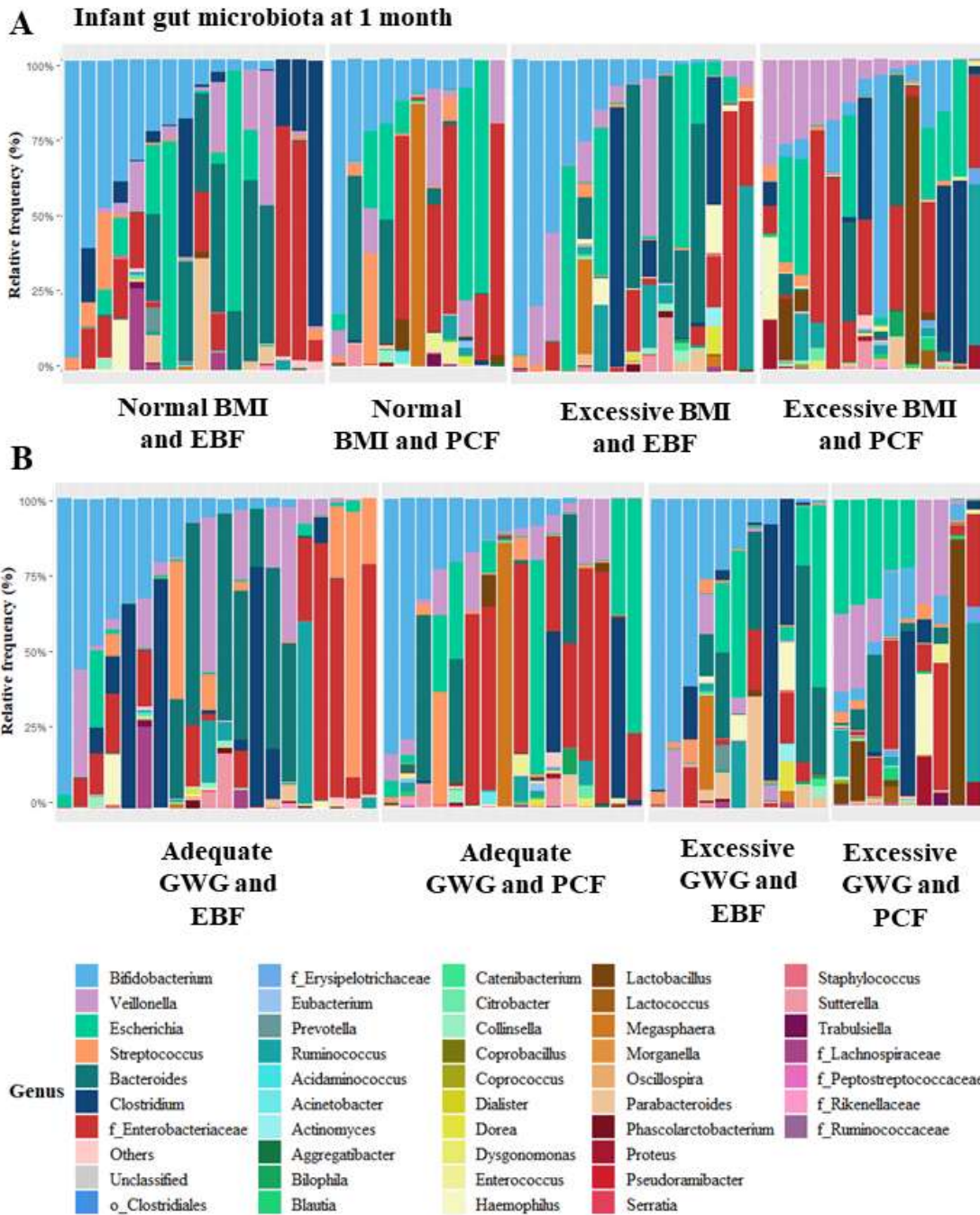


Figure S1. Infant gut microbiota composition at 1 month by (A) maternal pre-pregnancy BMI and breastfeeding status and by (B) GWG and breastfeeding status.

Notes: BMI: body mass index; GWG: Gestational weight gain. EBF: Exclusive breastfeeding. PCF: Predominant/complementary feeding. Maternal pre-pregnancy BMI categories: Normal BMI (<25.0 kg/m²) and Excessive BMI (≥ 25.0 kg/m²). GWG categories according to pre-pregnancy BMI categories (IOM guidelines - 2009): Underweight, normal-weight, overweight and obese women should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5.0 and 9.0 kg, respectively. We categorized values above these intervals as excessive, and below and within these values as normal GWG. Breastfeeding categories: Exclusive breastfeeding (the infant received only breast milk and medicines) and Predominant/ complementary feeding (the infant received in addition to breast milk, other beverages or foods).

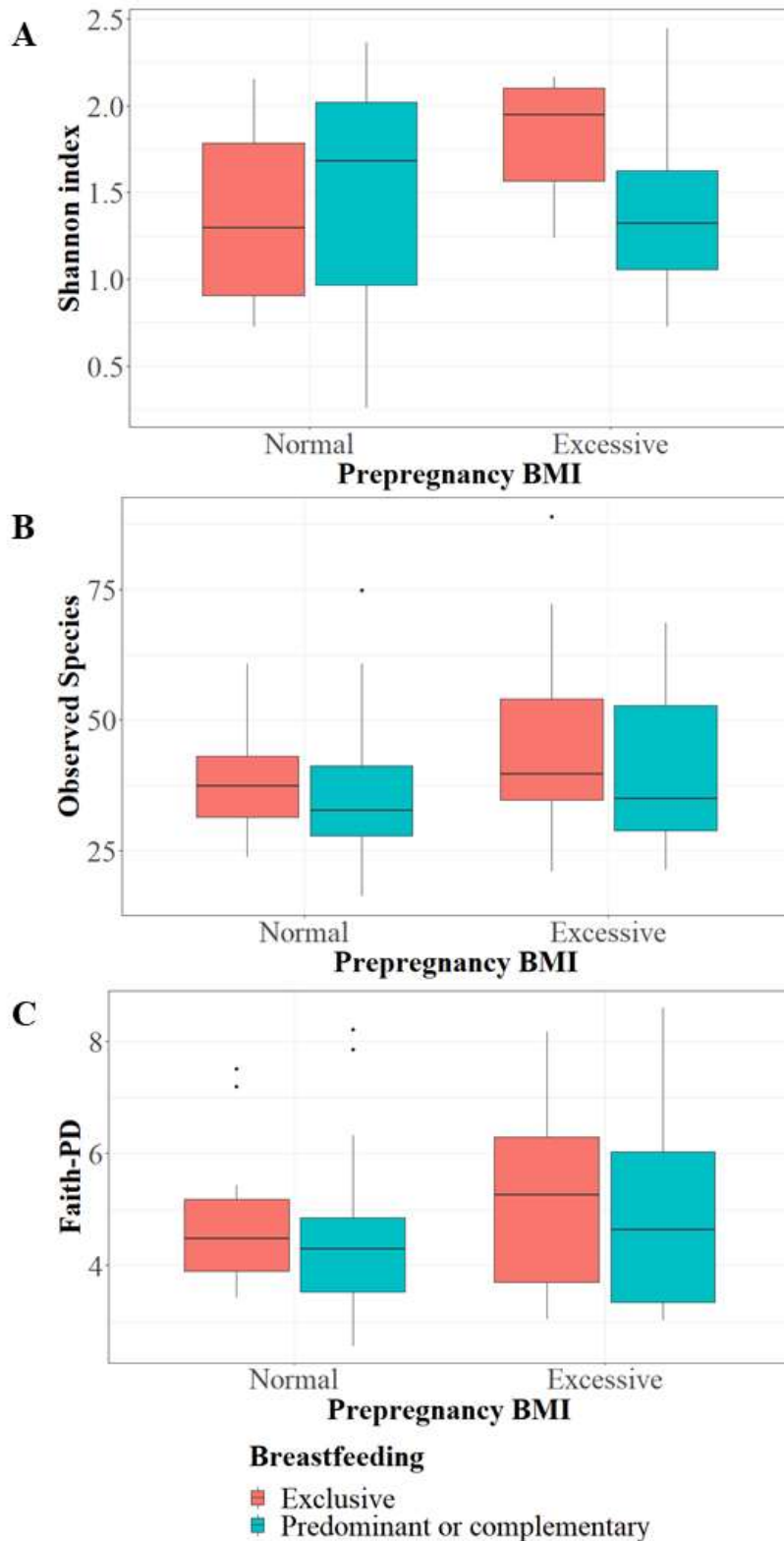


Figure S2. Infant gut microbiome (A) alfa-diversity (Shannon index), (B) observed species and (C) Faith index - phylogenetic diversity (PD) according to pre-pregnancy BMI and breastfeeding status.

Notes: BMI – Body mass index; Maternal pre-pregnancy BMI categories: Normal BMI (<25.0 kg/m²) and Excessive BMI (≥ 25.0 kg/m²). Breastfeeding categories: Exclusive breastfeeding (the infant received only breast milk and medicines) and Predominant/ complementary feeding (the infant received in addition to breast milk, other beverages or foods). Wilcoxon Mann-Whitney test was used to test differences of median between groups, we did not find statistical differences.

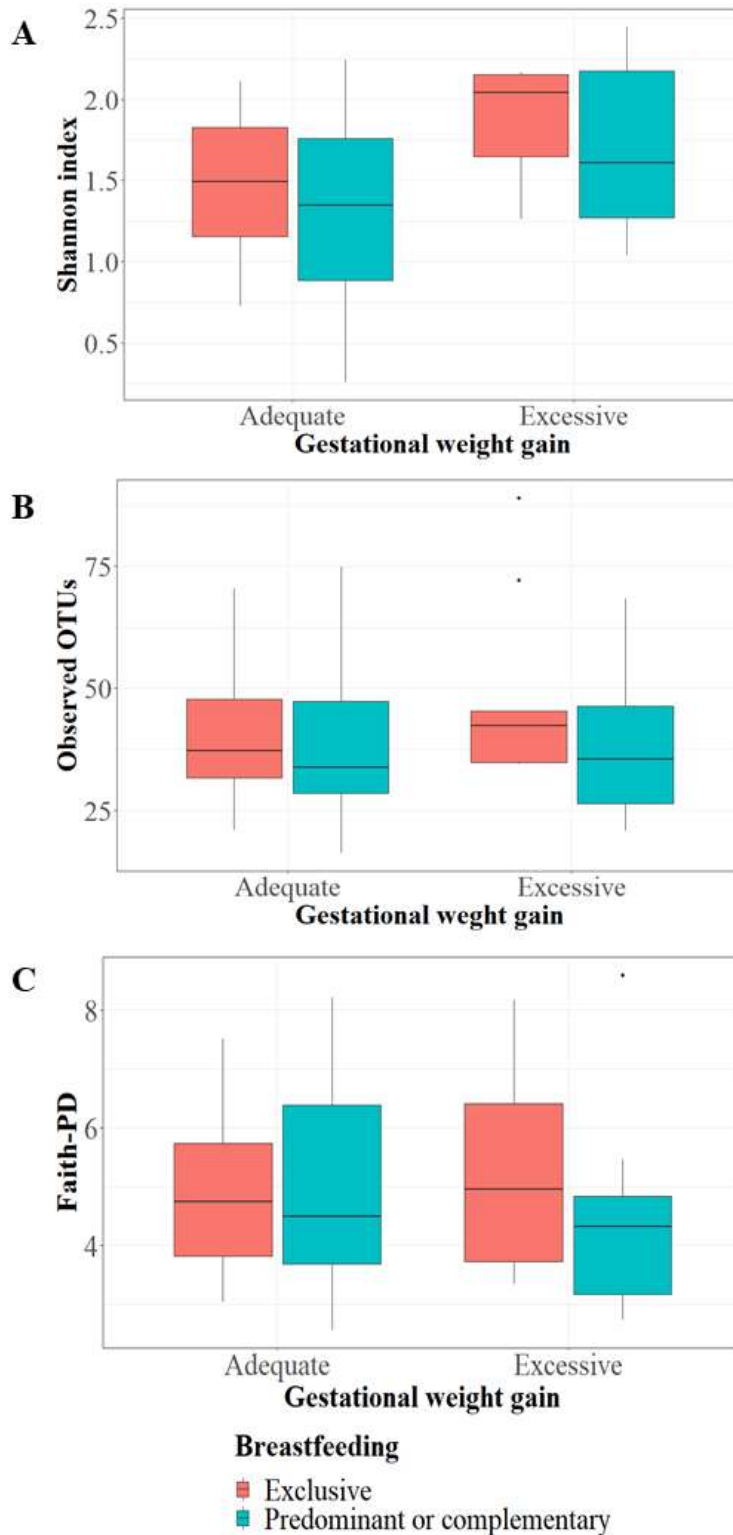


Figure S3. . Infant gut microbiome (A) alfa-diversity (Shannon index), (B) observed species and (C) Faith index - phylogenetic diversity (PD) according to GWG and breastfeeding status.

Notes: GWG categories according to pre-pregnancy BMI categories (IOM guidelines - 2009): Underweight, normal-weight, overweight and obese women should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5.0 and 9.0 kg, respectively. We categorized values above these intervals as excessive, and below and within these values as normal GWG. Breastfeeding categories: Exclusive breastfeeding (the infant received only breast milk and medicines) and Predominant/ complementary feeding (the infant received in addition to breast milk, other beverages or foods). Wilcoxon Mann-Whitney test was used to test differences of median between groups, we did not find statistical differences.

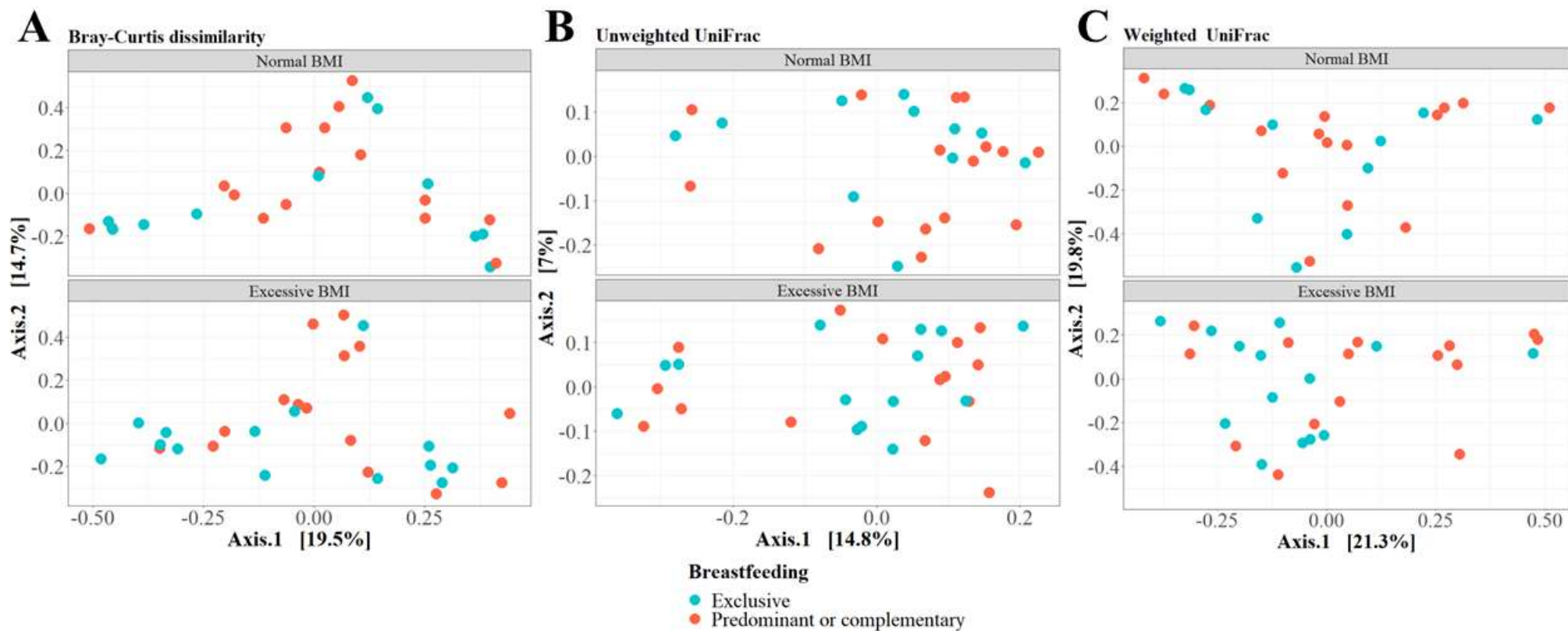


Figure S4. Principal coordinate analysis according to pre-pregnancy BMI and breastfeeding for (A) Bray-Curtis dissimilarity, (B) Unweight UniFrac and (C) Weight UniFrac.

Notes: BMI – Body mass index; Maternal pre-pregnancy BMI categories: Normal BMI ($<25.0 \text{ kg/m}^2$) and Excessive BMI ($\geq 25.0 \text{ kg/m}^2$). Breastfeeding categories: Exclusive breastfeeding (the infant received only breast milk and medicines) and Predominant/ complementary feeding (the infant received in addition to breast milk, other beverages or foods). PERMANOVA was used to test dissimilarity between groups, we did not find statistical differences.

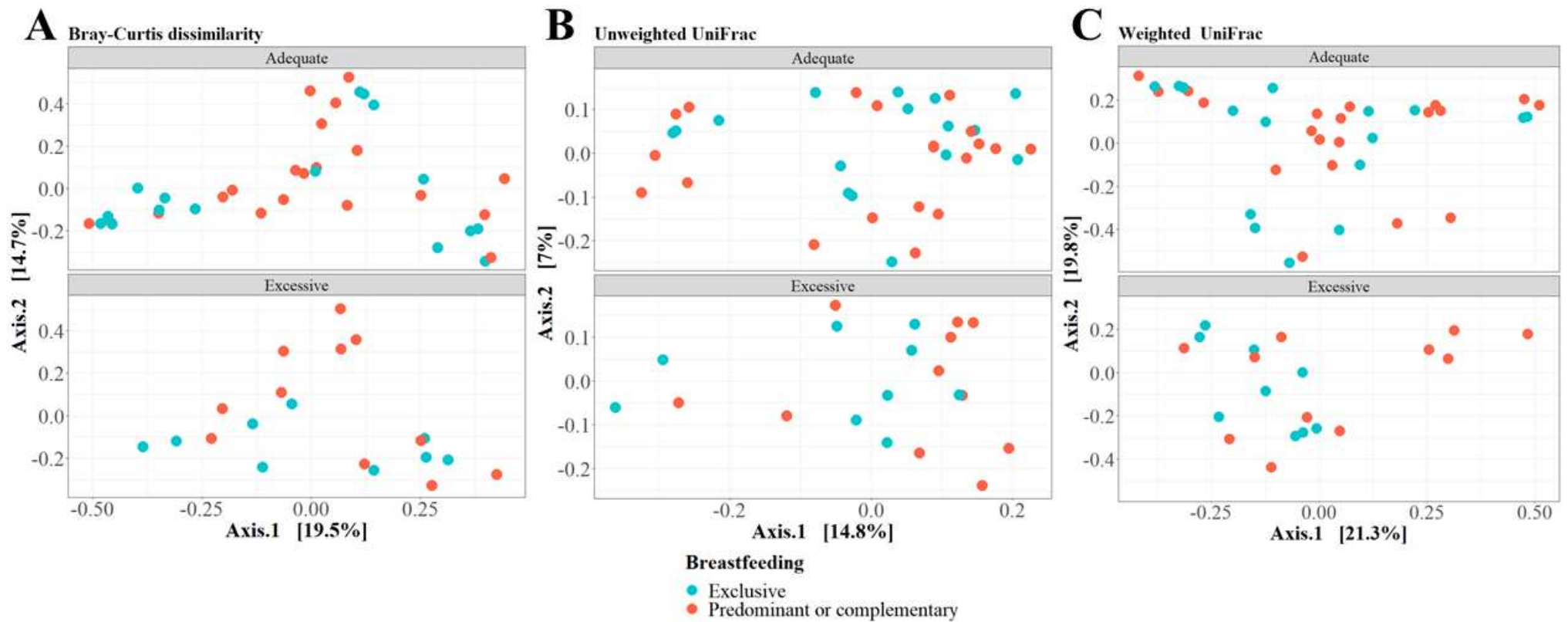


Figure S5. Principal coordinate analysis according to GWG and breastfeeding for (A) Bray-Curtis dissimilarity, (B) Unweight UniFrac and (C) Weight UniFrac.

Notes: GWG categories according to pre-pregnancy BMI categories (IOM guidelines - 2009): Underweight, normal-weight, overweight and obese women should gain between 12.5 and 18.0, between 11.5 and 16.0, between 7.0 and 11.5, and between 5.0 and 9.0 kg, respectively. We categorized values above these intervals as excessive, and below and within these values as normal GWG. Breastfeeding categories: Exclusive breastfeeding (the infant received only breast milk and medicines) and Predominant/ complementary feeding (the infant received in addition to breast milk, other beverages or foods). PERMANOVA was used to test dissimilarity between groups, we did not find statistical differences.

8. Considerações finais

A presente dissertação analisou a associação entre o excesso de peso materno pré-gestacional e a adequação do GPG com a MI infantil no primeiro mês de vida.

O IMC pré-gestacional e o GPG materno foram relacionados com a abundância e diversidade da MI infantil. Filhos de mães com IMC pré-gestacional de sobrepeso/obesidade e/ou GPG excessivo apresentaram composição de MI diferente. O GPG excessivo foi diretamente associado a alfa diversidade da MI infantil. Esses resultados demonstram, que o excesso de peso materno é capaz de modular a MI infantil, especialmente a abundância. A MI de filhos de mães com IMC pré-gestacional de sobrepeso/obesidade e/ou GPG excessivo foi constituída por bactérias relacionadas principalmente com a inflamação. O estado de inflamação é fisiológico, durante a gestação. Entretanto esse processo pode ser exacerbado pelo excesso de peso, e com isso, afetar a MI materna e infantil.

Observou-se que o tipo de AM modificou a composição da MI infantil nos filhos de mães com IMC pré-gestacional de sobrepeso/obesidade e/ou GPG excessivo. O excesso de peso materno associado ao APC levou a diminuição do gênero das *Bifidobacterium*. Esse resultado era esperado, uma vez que esse gênero de bactéria tem como substrato os OLH presentes no leite materno. Entretanto, esse mesmo efeito não foi observado entre os lactentes em APC e filhos de mães com IMC pré-gestacional e GPG adequado.

Dessa forma, a hipótese inicial de que a abundância e a diversidade da MI infantil é diferente para filhos de mães com IMC pré-gestacional de sobrepeso/obesidade e GPG excessivo foi confirmada. Demonstrou-se também que o tipo de AM pode modificar essa relação.

Adicionalmente, os resultados desse trabalho foram importantes para gerar evidência sobre a MI infantil de crianças brasileiras, tópico ainda pouco estudado na literatura Brasileira. Assim, mais estudos prospectivos e com maior tamanho amostral são necessários para descrever melhor a MI de crianças brasileiras.

Referências

AAGAARD, K.; MA, J.; ANTONY, K. M.; GANU, R. *et al.* The placenta harbors a unique microbiome. **Sci Transl Med**, 6, n. 237, p. 1-22, May 21 2014.

ADLERBERTH, I.; LINDBERG, E.; ABERG, N.; HESSELMAR, B. *et al.* Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? **Pediatr Res**, 59, n. 1, p. 96-101, Jan 2006.

ANTONY, K. M.; MA, J.; MITCHELL, K. B.; RACUSIN, D. A. *et al.* The preterm placental microbiome varies in association with excess maternal gestational weight gain. **Am J Obstet Gynecol**, 212, n. 5, p. 653 e651-616, May 2015.

ARRIETA, M. C.; STIEMSMA, L. T.; AMENYOGBE, N.; BROWN, E. M. *et al.* The intestinal microbiome in early life: health and disease. **Front Immunol**, 5, n. 427, p. 1-18, 2014.

ARRIETA, M. C.; STIEMSMA, L. T.; DIMITRIU, P. A.; THORSON, L. *et al.* Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. **Sci Transl Med**, 7, n. 307, p. 1-14, Sep 30 2015.

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, 473, n. 7346, p. 174-180, 2011/05/01 2011.

AVERSHINA, E.; STORRO, O.; OIEN, T.; JOHNSEN, R. *et al.* Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. **FEMS Microbiol Ecol**, 87, n. 1, p. 280-290, Jan 2014.

BACKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A. *et al.* Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, 307, n. 5717, p. 1915-1920, Mar 25 2005.

BACKHED, F.; ROSWALL, J.; PENG, Y.; FENG, Q. *et al.* Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. **Cell Host Microbe**, 17, n. 5, p. 690-703, May 13 2015.

BARROS, F. C.; VICTORA, C. G. Maternal-child health in Pelotas, Rio Grande do Sul State, Brazil: major conclusions from comparisons of the 1982, 1993, and 2004 birth cohorts. **Cadernos de Saúde Pública**, 24, p. s461-s467, 2008.

BJORKSTEN, B.; NAABER, P.; SEPP, E.; MIKELSAAR, M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. **Clin Exp Allergy**, 29, n. 3, p. 342-346, Mar 1999.

BODE, L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, 22, n. 9, p. 1147-1162, Sep 2012.

BRANDT, K.; TADDEI, C. R.; TAKAGI, E. H.; OLIVEIRA, F. F. *et al.* Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, 67, n. 2, p. 113-123, 2012.

- BRANISTE, V.; AL-ASMAKH, M.; KOWAL, C.; ANUAR, F. *et al.* The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. **Science translational medicine**, 6, n. 263, p. 1-24, 2014.
- BRASIL. Saúde da criança: nutrição infantil: aleitamento materno e alimentação complementar / Ministério da Saúde,. BÁSICA., M. d. S. S. d. A. à. S. D. d. A. Brasília : Editora do Ministério da Saúde. 112 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Atenção Básica **Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica.**, 2012.
- BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, 27, n. 4, p. 325-349, 1957/02/01 1957.
- CABRERA-RUBIO, R.; COLLADO, M. C.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S. *et al.* The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **Am J Clin Nutr**, 96, n. 3, p. 544-551, Sep 2012.
- CAO, X.; LIN, P.; JIANG, P.; LI, C. Characteristics of the gastrointestinal microbiome in children with autism spectrum disorder: a systematic review. **Shanghai Arch Psychiatry**, 25, n. 6, p. 342-353, Dec 2013.
- CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, 7, n. 5, p. 335-336, 2010.
- CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **Isme j**, 6, n. 8, p. 1621-1624, Aug 2012.
- CERDO, T.; RUIZ, A.; JAUREGUI, R.; AZARYAH, H. *et al.* Maternal obesity is associated with gut microbial metabolic potential in offspring during infancy. **J Physiol Biochem**, 74, n. 1, p. 159-169, Feb 2018.
- CHAMBERS, E. S.; PRESTON, T.; FROST, G.; MORRISON, D. J. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. **Current nutrition reports**, 7, n. 4, p. 198-206, 2018.
- CHEN, C.; XU, X.; YAN, Y. Estimated global overweight and obesity burden in pregnant women based on panel data model. **PloS one**, 13, n. 8, p. e0202183-e0202183, 2018.
- CHU, D. M.; ANTONY, K. M.; MA, J.; PRINCE, A. L. *et al.* The early infant gut microbiome varies in association with a maternal high-fat diet. **Genome Med**, 8, n. 1, p. 1-12, Aug 9 2016.

CHU, D. M.; MA, J.; PRINCE, A. L.; ANTONY, K. M. *et al.* Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. **Nat Med**, 23, n. 3, p. 314-326, Mar 2017.

CHU, S. Y.; KIM, S. Y.; BISH, C. L. Prepregnancy obesity prevalence in the United States, 2004-2005. **Matern Child Health J**, 13, n. 5, p. 614-620, Sep 2009.

CHUNG, S. Y.; RAVEL, J.; REGAN, M. Clinical Relevance of Gastrointestinal Microbiota During Pregnancy: A Primer for Nurses. **Biol Res Nurs**, 20, n. 1, p. 84-102, Jan 2018.

COLLADO, M. C.; ISOLAURI, E.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. **Am J Clin Nutr**, 88, n. 4, p. 894-899, Oct 2008.

COLLADO, M. C.; ISOLAURI, E.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. **Am J Clin Nutr**, 92, n. 5, p. 1023-1030, Nov 2010.

COLLADO, M. C.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk. **Pediatr Res**, 72, n. 1, p. 77-85, Jul 2012.

COLLADO, M. C.; RAUTAVA, S.; AAKKO, J.; ISOLAURI, E. *et al.* Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. **Scientific Reports**, 6, n. 23129, p. 1-13, 03/22/online 2016. Article.

DOUGLAS-ESCOBAR, M.; ELLIOTT, E.; NEU, J. Effect of intestinal microbial ecology on the developing brain. **JAMA Pediatr**, 167, n. 4, p. 374-379, Apr 2013.

DOYLE, R. M.; ALBER, D. G.; JONES, H. E.; HARRIS, K. *et al.* Term and preterm labour are associated with distinct microbial community structures in placental membranes which are independent of mode of delivery. **Placenta**, 35, n. 12, p. 1099-1101, Dec 2014.

DRAKE, A. J.; REYNOLDS, R. M. Impact of maternal obesity on offspring obesity and cardiometabolic disease risk. **Reproduction**, 140, n. 3, p. 387-398, Sep 2010.

DREISBACH, C.; PRESCOTT, S.; ALHUSEN, J. Influence of Maternal Prepregnancy Obesity and Excessive Gestational Weight Gain on Maternal and Child Gastrointestinal Microbiome Composition: A Systematic Review. **Biological research for nursing**, 22, n. 1, p. 114-125, 2020.

DURANTI, S.; GAIANI, F.; MANCABELLI, L.; MILANI, C. *et al.* Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: bifidobacteria as novel microbial biomarkers. **FEMS Microbiol Ecol**, 92, n. 12, p. 1-12, Dec 2016.

FAITH, D. P. The role of the phylogenetic diversity measure, PD, in bio-informatics: getting the definition right. **Evolutionary bioinformatics online**, 2, p. 277-283, 2007.

- FULDE, M.; HORNEF, M. W. Maturation of the enteric mucosal innate immune system during the postnatal period. **Immunol Rev**, 260, n. 1, p. 21-34, Jul 2014.
- GALLEY, J. D.; BAILEY, M.; KAMP DUSH, C.; SCHOPPE-SULLIVAN, S. *et al.* Maternal obesity is associated with alterations in the gut microbiome in toddlers. **PLoS One**, 9, n. 11, p. 1-13, 2014.
- GERARD, P. Gut Microbiome and Obesity. How to Prove Causality? **Ann Am Thorac Soc**, 14, n. Supplement_5, p. S354-s356, Nov 2017.
- GOMEZ-ARANGO, L. F.; BARRETT, H. L.; MCINTYRE, H. D.; CALLAWAY, L. K. *et al.* Connections Between the Gut Microbiome and Metabolic Hormones in Early Pregnancy in Overweight and Obese Women. **Diabetes**, 65, n. 8, p. 2214-2223, 2016.
- GOSALBES, M. J.; LLOP, S.; VALLES, Y.; MOYA, A. *et al.* Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. **Clin Exp Allergy**, 43, n. 2, p. 198-211, Feb 2013.
- GULDEN, E.; WONG, F. S.; WEN, L. The gut microbiota and Type 1 Diabetes. **Clin Immunol**, 159, n. 2, p. 143-153, Aug 2015.
- HASEGAWA, K.; LINNEMANN, R. W.; MANSBACH, J. M.; AJAMI, N. J. *et al.* The Fecal Microbiota Profile and Bronchiolitis in Infants. **Pediatrics**, 138, n. 1, p. 1-11, Jul 2016.
- HEIKKILA, M. P.; SARIS, P. E. Inhibition of Staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human milk. **J Appl Microbiol**, 95, n. 3, p. 471-478, 2003.
- HESLEHURST, N.; ELLS, L. J.; SIMPSON, H.; BATTERHAM, A. *et al.* Trends in maternal obesity incidence rates, demographic predictors, and health inequalities in 36,821 women over a 15-year period. **BJOG**, 114, n. 2, p. 187-194, Feb 2007.
- HO, N. T.; LI, F.; LEE-SARWAR, K. A.; TUN, H. M. *et al.* Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. **Nature Communications**, 9, n. 1, p. 1-13, 2018/10/09 2018.
- HOUTTU, N.; MOKKALA, K.; LAITINEN, K. Overweight and obesity status in pregnant women are related to intestinal microbiota and serum metabolic and inflammatory profiles. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, 37, n. 6 Pt A, p. 1955-1966, 2018.
- HU, J.; NOMURA, Y.; BASHIR, A.; FERNANDEZ-HERNANDEZ, H. *et al.* Diversified Microbiota of Meconium Is Affected by Maternal Diabetes Status. **PLOS ONE**, 8, n. 11, p. 1-10, 2013.
- INSTITUTE OF MEDICINE. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. *In*: RASMUSSEN, K. M. e YAKTINE, A. L. (Ed.).

Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines. Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences., 2009.

ITANI, T.; AYOUB MOUBARECK, C.; MELKI, I.; ROUSSEAU, C. *et al.* Preterm infants with necrotising enterocolitis demonstrate an unbalanced gut microbiota. **Acta Paediatr**, 107, n. 1, p. 40-47, Jan 2018.

ITANI, T.; AYOUB MOUBARECK, C.; MELKI, I.; ROUSSEAU, C. *et al.* Establishment and development of the intestinal microbiota of preterm infants in a Lebanese tertiary hospital. **Anaerobe**, 43, p. 4-14, Feb 2017.

JAMES, K.; BOTTACINI, F.; CONTRERAS, J. I. S.; VIGOUREUX, M. *et al.* Metabolism of the predominant human milk oligosaccharide fucosyllactose by an infant gut commensal. **Scientific reports**, 9, n. 1, p. 1-20, 2019.

JIMENEZ, E.; FERNANDEZ, L.; MARIN, M. L.; MARTIN, R. *et al.* Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Curr Microbiol**, 51, n. 4, p. 270-274, Oct 2005.

JIMENEZ, E.; MARIN, M. L.; MARTIN, R.; ODRIOZOLA, J. M. *et al.* Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Res Microbiol**, 159, n. 3, p. 187-193, Apr 2008.

JOHNSON, C. C.; OWNBY, D. R. Allergies and Asthma: Do Atopic Disorders Result from Inadequate Immune Homeostasis arising from Infant Gut Dysbiosis? **Expert Rev Clin Immunol**, 12, n. 4, p. 379-388, 2016.

KERR, C. A.; GRICE, D. M.; TRAN, C. D.; BAUER, D. C. *et al.* Early life events influence whole-of-life metabolic health via gut microflora and gut permeability. **Crit Rev Microbiol**, 41, n. 3, p. 326-340, 2015.

KHODAYAR-PARDO, P.; MIRA-PASCUAL, L.; COLLADO, M. C.; MARTINEZ-COSTA, C. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **J Perinatol**, 34, n. 8, p. 599-605, Aug 2014.

KOLENDA, R.; BURDUKIEWICZ, M.; SCHIERACK, P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. **Front Cell Infect Microbiol**, 5, n. 23, p. 1-12, 2015.

KOREN, O.; GOODRICH, J. K.; CULLENDER, T. C.; SPOR, A. *et al.* Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. **Cell**, 150, n. 3, p. 470-480, Aug 3 2012.

KOSTIC, A. D.; XAVIER, R. J.; GEVERS, D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. **Gastroenterology**, 146, n. 6, p. 1489-1499, May 2014.

KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; WALTERS, W. A.; GONZÁLEZ, A. *et al.* Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. **Current protocols in bioinformatics**, Chapter 10, p. Unit10.17-10.17., 2011.

KUMAR, P.; MAGON, N. Hormones in pregnancy. **Nigerian medical journal : journal of the Nigeria Medical Association**, 53, n. 4, p. 179-183, 2012.

LEBOUDER, E.; REY-NORES, J. E.; RABY, A. C.; AFFOLTER, M. *et al.* Modulation of neonatal microbial recognition: TLR-mediated innate immune responses are specifically and differentially modulated by human milk. **J Immunol**, 176, n. 6, p. 3742-3752, Mar 15 2006.

LEE, Y. K.; MAZMANIAN, S. K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? **Science (New York, N.Y.)**, 330, n. 6012, p. 1768-1773, 2010.

LEMAS, D. J.; YOUNG, B. E.; BAKER, P. R., 2nd; TOMCZIK, A. C. *et al.* Alterations in human milk leptin and insulin are associated with early changes in the infant intestinal microbiome. **Am J Clin Nutr**, 103, n. 5, p. 1291-1300, May 2016.

LEVIN, A. M.; SITARIK, A. R.; HAVSTAD, S. L.; FUJIMURA, K. E. *et al.* Joint effects of pregnancy, sociocultural, and environmental factors on early life gut microbiome structure and diversity. **Sci Rep**, 6, n. 31775, p. 1-16, Aug 25 2016.

LIU, F.; LI, J.; WU, F.; ZHENG, H. *et al.* Altered composition and function of intestinal microbiota in autism spectrum disorders: a systematic review. **Translational Psychiatry**, 9, n. 1, p. 1-13, 2019/01/29 2019.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F.; MATYORELL, R. **Anthropometric Standardization Reference Manual**. Human Kinetics Books, 1988.

LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K. *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, 489, n. 7415, p. 220-230, 2012.

LU, J.; WANG, Z.; CAO, J.; CHEN, Y. *et al.* A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 16, 12/01 2018.

MACPHERSON, A. J.; DE AGUERO, M. G.; GANAL-VONARBURG, S. C. How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. **Nat Rev Immunol**, 17, n. 8, p. 508-517, Aug 2017.

MANTHEY, C. F.; AUTRAN, C. A.; ECKMANN, L.; BODE, L. Human milk oligosaccharides protect against enteropathogenic *Escherichia coli* attachment in vitro and EPEC colonization in suckling mice. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 58, n. 2, p. 165-168, Feb 2014.

- MARCOBAL, A.; BARBOZA, M.; SONNENBURG, E. D.; PUDLO, N. *et al.* Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. **Cell Host Microbe**, 10, n. 5, p. 507-514, Nov 17 2011.
- MARTIN, R.; HEILIG, H. G.; ZOETENDAL, E. G.; JIMENEZ, E. *et al.* Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. **Res Microbiol**, 158, n. 1, p. 31-37, Jan-Feb 2007.
- MARTÍN, R.; JIMÉNEZ, E.; HEILIG, H.; FERNÁNDEZ, L. *et al.* Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, 75, n. 4, p. 965-969, 2009.
- MARTIN, R.; MAKINO, H.; CETINYUREK YAVUZ, A.; BEN-AMOR, K. *et al.* Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. **PLOS ONE**, 11, n. 6, p. 1-30, 2016.
- MAYER, E. A.; SAVIDGE, T.; SHULMAN, R. J. Brain-gut microbiome interactions and functional bowel disorders. **Gastroenterology**, 146, n. 6, p. 1500-1512, May 2014.
- MAZMANIAN, S. K.; LIU, C. H.; TZIANABOS, A. O.; KASPER, D. L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. **Cell**, 122, n. 1, p. 107-118, Jul 15 2005.
- MILANI, C.; DURANTI, S.; BOTTACINI, F.; CASEY, E. *et al.* The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Microbiol Mol Biol Rev**, 81, n. 4, p. 1-67, Dec 2017.
- MINIELLO, V. L.; COLASANTO, A.; CRISTOFORI, F.; DIAFERIO, L. *et al.* Gut microbiota biomodulators, when the stork comes by the scalpel. **Clin Chim Acta**, 451, n. Pt A, p. 88-96, Dec 7 2015.
- MUELLER, N. T.; SHIN, H.; PIZONI, A.; WERLANG, I. C. *et al.* Birth mode-dependent association between pre-pregnancy maternal weight status and the neonatal intestinal microbiome. **Sci Rep**, 6, n. 23133, p. 1-9, Apr 1 2016.
- MUELLER, N. T.; SHIN, H.; PIZONI, A.; WERLANG, I. C. *et al.* Delivery Mode and the Transition of Pioneering Gut-Microbiota Structure, Composition and Predicted Metabolic Function. **Genes**, 8, n. 12, p. 364, 2017.
- MUELLER, N. T.; WHYATT, R.; HOEPNER, L.; OBERFIELD, S. *et al.* Prenatal exposure to antibiotics, cesarean section and risk of childhood obesity. **Int J Obes (Lond)**, 39, n. 4, p. 665-670, Apr 2015.
- MUNYAKA, P. M.; KHAFIPOUR, E.; GHIA, J. E. External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. **Front Pediatr**, 2, n. 109, p. 1-9, 2014.

MURRIN, C. M.; KELLY, G. E.; TREMBLAY, R. E.; KELLEHER, C. C. Body mass index and height over three generations: evidence from the Lifeways cross-generational cohort study. **BMC Public Health**, 12, n. 1, p. 1-11, 2012/01/25 2012.

MUSILOVA, S.; RADA, V.; VLKOVA, E.; BUNESOVA, V. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. **Benef Microbes**, 5, n. 3, p. 273-283, Sep 2014.

NAGPAL, R.; TSUJI, H.; TAKAHASHI, T.; KAWASHIMA, K. *et al.* Sensitive Quantitative Analysis of the Meconium Bacterial Microbiota in Healthy Term Infants Born Vaginally or by Cesarean Section. **Frontiers in microbiology**, 7, n. 1997, p. 1-9, 2016.

NIKKARI, S.; MCLAUGHLIN, I. J.; BI, W.; DODGE, D. E. *et al.* Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? **J Clin Microbiol**, 39, n. 5, p. 1956-1959, May 2001.

NURIEL-OHAYON, M.; NEUMAN, H.; KOREN, O. Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. **Frontiers in microbiology**, 7, n. 1031, p. 1-13, 2016.

OMS, O. M. d. S. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. . **Geneva: WHO, 1995.** , 1995.

PALMER, C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D. A. *et al.* Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biol**, 5, n. 7, p. 1556-1573, Jul 2007.

PENDERS, J.; THUIS, C.; VINK, C.; STELMA, F. F. *et al.* Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, 118, n. 2, p. 511-521, Aug 2006.

PEREZ-MUNOZ, M. E.; ARRIETA, M. C.; RAMER-TAIT, A. E.; WALTER, J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. **Microbiome**, 5, n. 1, p. 1-19, Apr 28 2017.

PEREZ, P. F.; DORE, J.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F. *et al.* Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? **Pediatrics**, 119, n. 3, p. e724-732, Mar 2007.

RAHMAN, M. M.; ABE, S. K.; KANDA, M.; NARITA, S. *et al.* Maternal body mass index and risk of birth and maternal health outcomes in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **Obes Rev**, 16, n. 9, p. 758-770, Sep 2015.

RANGEL, S. M.; PALLER, A. S. Bacterial colonization, overgrowth, and superinfection in atopic dermatitis. **Clin Dermatol**, 36, n. 5, p. 641-647, Sep - Oct 2018.

RAUTAVA, S.; COLLADO, M. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Neonatology**, 102, n. 3, p. 178-184, 2012.

RIVA, A.; BORGO, F.; LASSANDRO, C.; VERDUCI, E. *et al.* Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. **Environ Microbiol**, 19, n. 1, p. 95-105, 2017/00 2017.

ROBERTSON, R. C.; MANGES, A. R.; FINLAY, B. B.; PRENDERGAST, A. J. The Human Microbiome and Child Growth - First 1000 Days and Beyond. **Trends in microbiology**, 27, n. 2, p. 131-147, 2019.

ROBINSON, A.; FIECHTNER, L.; ROCHE, B.; AJAMI, N. J. *et al.* Association of Maternal Gestational Weight Gain With the Infant Fecal Microbiota. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 65, n. 5, p. 509-515, Nov 2017.

ROTIMI, V. O.; DUERDEN, B. I. The development of the bacterial flora in normal neonates. **J Med Microbiol**, 14, n. 1, p. 51-62, Feb 1981.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat Rev Immunol**, 9, n. 5, p. 313-323, May 2009.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 27, p. 12204-12209, Jul 6 2010.

SALYERS, A. A.; WEST, S. E.; VERCELLOTTI, J. R.; WILKINS, T. D. Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. **Applied and environmental microbiology**, 34, n. 5, p. 529-533, 1977.

SANTACRUZ, A.; COLLADO, M. C.; GARCÍA-VALDÉS, L.; SEGURA, M. T. *et al.* Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. **British Journal of Nutrition**, 104, n. 1, p. 83-92, 2010.

SELA, D. A.; LI, Y.; LERNO, L.; WU, S. *et al.* An infant-associated bacterial commensal utilizes breast milk sialyloligosaccharides. **J Biol Chem**, 286, n. 14, p. 11909-11918, Apr 8 2011.

SELMA-ROYO, M.; TARRAZÓ, M.; GARCÍA-MANTRANA, I.; GÓMEZ-GALLEGO, C. *et al.* Shaping Microbiota During the First 1000 Days of Life. **Advances in experimental medicine and biology**, 1125, p. 3-24, 2019.

SHI, Y.-C.; GUO, H.; CHEN, J.; SUN, G. *et al.* Initial meconium microbiome in Chinese neonates delivered naturally or by cesarean section. **Scientific Reports**, 8, n. 1, p. 1-12, 2018/02/19 2018.

SINGH, S.; KARAGAS, M. R.; MUELLER, N. T. Charting the Maternal and Infant Microbiome: What Is the Role of Diabetes and Obesity in Pregnancy? **Curr Diab Rep**, 17, n. 2, p. 1-17, Feb 2017.

- SPELLERBERG, I. F.; FEDOR, P. J. A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon–Wiener’ Index. **Global ecology and biogeography** 12, n. 3, p. 177-179, 2003.
- STANISLAWSKI, M. A.; DABELEA, D.; WAGNER, B. D.; SONTAG, M. K. *et al.* Pre-pregnancy weight, gestational weight gain, and the gut microbiota of mothers and their infants. **Microbiome**, 5, n. 1, p. 1-12, Sep 4 2017.
- STEEL, J. H.; MALATOS, S.; KENNEA, N.; EDWARDS, A. D. *et al.* Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. **Pediatr Res**, 57, n. 3, p. 404-411, Mar 2005.
- STINSON, L. F.; PAYNE, M. S.; KEELAN, J. A. Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. **Crit Rev Microbiol**, 43, n. 3, p. 352-369, May 2017.
- STOUT, M. J.; CONLON, B.; LANDEAU, M.; LEE, I. *et al.* Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. **Am J Obstet Gynecol**, 208, n. 3, p. 226 e221-227, Mar 2013.
- SUGINO, K. Y.; PANETH, N.; COMSTOCK, S. S. Michigan cohorts to determine associations of maternal pre-pregnancy body mass index with pregnancy and infant gastrointestinal microbial communities: Late pregnancy and early infancy. **PLOS ONE**, 14, n. 3, p. 1-19, 2019.
- TALARICO, S. T.; SANTOS, F. E.; BRANDT, K. G.; MARTINEZ, M. B. *et al.* Anaerobic bacteria in the intestinal microbiota of Brazilian children. **Clinics (Sao Paulo)**, 72, n. 3, p. 154-160, Mar 2017.
- TAMBURINI, S.; SHEN, N.; WU, H. C.; CLEMENTE, J. C. The microbiome in early life: implications for health outcomes. **Nat Med**, 22, n. 7, p. 713-722, Jul 7 2016.
- TREMAROLI, V.; BACKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, 489, n. 7415, p. 242-249, Sep 13 2012.
- TURRONI, F.; TAVERNITI, V.; RUAS-MADIEDO, P.; DURANTI, S. *et al.* Bifidobacterium bifidum PRL2010 modulates the host innate immune response. **Appl Environ Microbiol**, 80, n. 2, p. 730-740, Jan 2014.
- VAEL, C.; VERHULST, S. L.; NELEN, V.; GOOSSENS, H. *et al.* Intestinal microflora and body mass index during the first three years of life: an observational study. **Gut Pathogens**, 3, n. 1, p. 1-7, 2011/05/23 2011.
- VAN ELBURG, R. M.; FETTER, W. P.; BUNKERS, C. M.; HEYMANS, H. S. Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, 88, n. 1, p. F52-55, Jan 2003.

VOGT, N. M.; KERBY, R. L.; DILL-MCFARLAND, K. A.; HARDING, S. J. *et al.* Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

WALLACE, J. G.; GOHIR, W.; SLOBODA, D. M. The impact of early life gut colonization on metabolic and obesogenic outcomes: what have animal models shown us? **J Dev Orig Health Dis**, 7, n. 1, p. 15-24, Feb 2016.

WHITAKER, K. L.; JARVIS, M. J.; BEEKEN, R. J.; BONIFACE, D. *et al.* Comparing maternal and paternal intergenerational transmission of obesity risk in a large population-based sample. **Am J Clin Nutr**, 91, n. 6, p. 1560-1567, Jun 2010.

WHITTAKER, R. H. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. **Ecological Monographs**, 30, n. 3, p. 279-338, 1960/02/01 1960.

WHITTAKER, R. H. Evolution and Measurement of Species Diversity. **Taxon**, 21, n. 2/3, p. 213-251, 1972.

WIDEN, E. M.; WHYATT, R. M.; HOEPNER, L. A.; MUELLER, N. T. *et al.* Gestational weight gain and obesity, adiposity and body size in African-American and Dominican children in the Bronx and Northern Manhattan. **Matern Child Nutr**, 12, n. 4, p. 918-928, Oct 2016.

WOPEREIS, H.; OOZEER, R.; KNIPPING, K.; BELZER, C. *et al.* The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. **Pediatr Allergy Immunol**, 25, n. 5, p. 428-438, Aug 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Indicators for assessing infant and young child feeding practices. Conclusions of consensus meeting held 6-8 November 2007. . Washington D.C., USA 2007.

YAN, J.; HERZOG, J. W.; TSANG, K.; BRENNAN, C. A. *et al.* Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 113, n. 47, p. E7554-E7563, 2016.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P.-Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, 17, n. 1, p. 1-8, March 22 2016. journal article.

YANG, I.; CORWIN, E. J.; BRENNAN, P. A.; JORDAN, S. *et al.* The Infant Microbiome: Implications for Infant Health and Neurocognitive Development. **Nurs Res**, 65, n. 1, p. 76-88, Jan-Feb 2016.

YASSOUR, M.; VATANEN, T.; SILJANDER, H.; HAMALAINEN, A. M. *et al.* Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. **Sci Transl Med**, 8, n. 343, p. 1-22, Jun 15 2016.

ZHOU, Z.; BIAN, C.; LUO, Z.; GUILLE, C. *et al.* Progesterone decreases gut permeability through upregulating occludin expression in primary human gut tissues and Caco-2 cells. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 8367, 2019/06/10 2019.

ZHOU, Z.; POWELL, A. M.; RAMAKRISHNAN, V.; ECKARD, A. *et al.* Elevated systemic microbial translocation in pregnant HIV-infected women compared to HIV-uninfected women, and its inverse correlations with plasma progesterone levels. **Journal of reproductive immunology**, 127, p. 16-18, 2018.

ZIVKOVIC, A. M.; GERMAN, J. B.; LEBRILLA, C. B.; MILLS, D. A. Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108 Suppl 1, p. 4653-4658, Mar 15 2011.

Anexos

Anexo 1 – Questionário de aleitamento e alimentação infantil

Confidential

Compostos Bioativos do Leite ONDA 1 Dia 1 - ESTUDO.1 teste
Page 1 of 4

Amamentacao Complementar

Record ID

1. Você está amamentando atualmente?

- Sim
 Não

2. Por quê você não está amamentando?

ENTREVISTADOR: Pode marcar mais de uma opção.

- eu não quis
 bebê não quis
 seio sem bico
 não tenho leite
 bebê doente/internado
 bebê prematuro
 dor, rachadura, infecção no seio
 recomendação médica
 outro

3. Se outro motivo, qual?

4. Você chegou a dar de mamar?

- Sim
 Não

5. Com quantos dias o (a) parou de mamar leite do peito?

6. Você está tendo/teve alguma dificuldade para dar de mamar?

- Sim
 Não

7. Qual dificuldade?

- Dor
 Pouco leite
 Fissuras/rachaduras
 Outros

8. Se outra dificuldade de amamentar, qual?

9. Você dá de mamar sempre que o (a) pede ou com hora certa?

- hora certa
 quando pede/chora

10. De quanto em quanto tempo?

- 1/1h
 2/2h
 3/3h
 > 3/3h

11. Qual é a duração média de cada mamada?

ENTREVISTADOR: Colocar duração em minutos.

11.1 Em média, quantas vezes ao dia o(a) costuma mamar?

12. Quando o (a) dorme no peito, você o (a) acorda para continuar amamentando?

- sim
 não
 às vezes
 não se aplica

13. Não maioria das vezes, em cada mamada, o (a) mama nos dois seios ou em um só?

- em um só
 nos dois

14. O (A) esvazia um seio antes de pegar no outro?

- Sim
 Não

15. Na próxima mamada você o(a) coloca para mamar no mesmo seio que mamou da última vez?

- Sim
 Não

16.1 Você toma algum tipo de cuidado com as suas mamas?

- Sim
- Não

16. Quais cuidados você tem com a sua mama após a mamada?

- Lava sempre a mama
- Aplica pomada ou creme
- Espreme algumas gotinhas de leite, espalha no mamilo e à sua volta e deixa secar
- Exposição ao sol
- Outro
- Nenhum

17. Se outro cuidado, qual?

ENTREVISTADOR NÃO LER, APENAS MARCAR A ALTERNATIVA

18. Atualmente a mãe esta dando somente o leite do peito, sem água ou chá?

- Sim
- Não

19. Por quê você não está dando somente o peito ao (a) ?

- O leite é fraco/bebê sente fome
- Tenho pouco leite
- Bebê sente sede
- Bebê sente cólica
- outro

20. Se outro motivo para você não está dando somente o leite do peito, qual?

21. Há algum alimento que o (a) tenha ingerido alguma vez mas que não seja habitual?

- Sim
- Não

22. Qual (is) alimento(s)?

23. Quantas vezes o (a) consumiu cada alimento?

24. Agora eu gostaria que você me falasse sobre os alimentos que que você oferece habitualmente pra criança

	Sim	Não
Água	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Suco	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Leite de vaca, saco ou em pó	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fórmula infantil (nan, Aptamil)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sopa/Caldo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Café	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Outro Alimento	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

24.1 Se outro alimento, qual?

Com qual idade o (a) consumiu água pela primeira vez?

Qual o volume/quantidade?

(ENTREVISTADOR: Colocar o volume em ml (mililitro))

Com que frequência?

- 1 vez/ dia
- 2 vezes/ dia
- 3 vezes/ dia
- 4 vezes ou mais/dia

Com qual idade o (a) consumiu chá pela primeira vez?

Qual o volume/quantidade?

(ENTREVISTADOR: Colocar o volume em ml (mililitro))

Com que frequência?

- 1 vez/ dia
- 2 vezes/ dia
- 3 vezes/ dia
- 4 vezes ou mais/dia

Com qual idade o (a) consumiu suco pela primeira vez?

Qual o volume/quantidade?

(ENTREVISTADOR: Colocar o volume em ml (mililitro))

Com que frequência?

- 1 vez/ dia
- 2 vezes/ dia
- 3 vezes/ dia
- 4 vezes ou mais/dia

Com qual idade o (a) consumiu leite de vaca (em saco/caixa/pó) pela primeira vez?

Qual o volume/quantidade?

(ENTREVISTADOR: Colocar o volume em ml (mililitro))

Com que frequência?

- 1 vez/ dia
- 2 vezes/ dia
- 3 vezes/ dia
- 4 vezes ou mais/dia

Com qual idade o (a) consumiu fórmula infantil pela primeira vez?

Qual o volume/quantidade?

(ENTREVISTADOR: Colocar o volume em ml (mililitro))

Com que frequência?

- 1 vez/ dia
- 2 vezes/ dia
- 3 vezes/ dia
- 4 vezes ou mais/dia

Com qual idade o (a) consumiu sopa ou caldo pela primeira vez?

Qual o volume/quantidade?

(ENTREVISTADOR: Colocar o volume em ml (mililitro))

Com que frequência?

- 1 vez/ dia
- 2 vezes/ dia
- 3 vezes/ dia
- 4 vezes ou mais/dia

Com qual idade o (a) consumiu café pela primeira vez?

Qual o volume/quantidade?

(ENTREVISTADOR: Colocar o volume em ml (mililitro))

Com que frequência?

- 1 vez/ dia
- 2 vezes/ dia
- 3 vezes/ dia
- 4 vezes ou mais/dia

Com qual idade o (a) consumiu outro alimento pela primeira vez?

Qual o volume/quantidade?

(ENTREVISTADOR: Colocar o volume em ml (mililitro))

Com que frequência?

- 1 vez/ dia
- 2 vezes/ dia
- 3 vezes/ dia
- 4 vezes ou mais/dia

25.1 O (a) utiliza mamadeira ou copinho?

- Sim
- Não

25.2 Você costuma colocar na mamadeira/copinho do(a) alguns desse itens?

- Engrossante (farinha/maizena/arrozina/trigo)
- Açúcar
- Mel
- nenhum

ENTREVISTADOR: LER AS OPÇÕES

Tipo de amamentação

Record ID

ENTREVISTADOR: Essa questão deve ser marcada, não deve ser lida para a gestante.

26. Tipo de Aleitamento materno:

-
- Aleitamento materno misto ou parcial (leite materno e outros tipos de leite)
 - Aleitamento materno predominante (leite materno, água ou bebidas à base de água (água adoçada, chás, infusões, sucos de frutas)
 - Aleitamento materno exclusivo (somente leite materno, direto ou ordenhado, ou leite humano de outra fonte, com exceção de gotas ou xaropes contendo vitaminas, sais de reidratação oral, suplementos minerais ou medicamentos)
 - Aleitamento materno complementado (leite materno, qualquer alimento sólido ou semissólido com a finalidade de complementá-lo)
 - Não está amamentando

Anexo 2 – Questionários de história obstétrica, saúde maternal e estilo de vida

Confidential

Compostos Bioativos do Leite ONDA I Dia 1 - ESTUDO.1 teste
Page 1 of 3

Historia Obstetrica

Record ID _____

"Vamos agora conversar um pouco sobre alguns aspectos relacionados a gestação, partos e filhos..."

Data da consulta _____

1 Antes de engravidar a Sra. estava utilizando algum método para evitar esta gravidez?

- Sim
 Não

2 Qual método a Sra. estava usando?

ENTREVISTADOR: Não ler as opções. Somente marcar a que a entrevistada referir. Se relatado pela gestante, marcar mais de uma opção.

- 1 camisinha
 2 pílula
 3 tabela
 4 coito interrompido
 5 hormônio injetável
 6 DIU
 7 Outro

3 Se outro método contraceptivo, qual? _____

4 Quando ficou grávida, a Sra.:

ENTREVISTADOR: Ler todas as opções

- 1 Queria engravidar
 2 Queria esperar mais um tempo
 3 Não queria engravidar

5 E o pai da criança, quando soube que a Sra. estava grávida:

ENTREVISTADOR: Ler todas as opções

- 1 Ele queria que você estivesse grávida
 2 Ele queria esperar mais um tempo
 3 Ele não queria que você estivesse grávida

6 Qual a data da sua última menstruação? _____

ENTREVISTADOR: Quando a gestante não souber informar a data ver no cartão.

Não perguntar a gestante.

(ENTREVISTADOR: anotar em semanas gestacionais)

7 Calcular a IG atual (DUM) _____

ENTREVISTADOR: Usar o gestograma para calcular a IG atual pela DUM.

8 Com quantas semanas de gravidez a Sra. começou o pré-natal?

ENTREVISTADOR: Não ler as opções. Confirmar essa informação no cartão da gestante.

- 1 mês/ 1 a 4 semanas
 2 meses/ 5 a 8 semanas
 3 meses/ 9 a 12 semanas
 4 meses/ 13 a 16 semanas
 Mais de 4 meses ou 16 semanas

9 Por que não começou o pré-natal mais cedo?

ENTREVISTADOR: Não ler as opções

- Dificuldade de acesso (tentou, mas não conseguiu consulta antes)
- Dificuldades familiares (não tinha com quem deixar os filhos, não tinha quem a acompanhasse)
- Dificuldade financeira (não tinha dinheiro para o transporte)
- Questões pessoais (não tinha certeza se queria manter esta gravidez/ não achava importante)
- Dificuldades relacionadas ao trabalho/escola (falta de tempo para ir às consultas)
- Não sabia que estava grávida
- Outro

10 Qual outro motivo influenciou o início tardio?

11 A Sra. fez alguma ultrassonografia?

- Sim
- Não

ENTREVISTADOR: Atenção para as informações da próxima questão! Caso na primeira ultrassom não esteja relatada a presença e as dimensões do embrião, solicitar a segunda ultrassom.

12 Qual foi a data da realização da 1ª ultrassonografia?

ENTREVISTADOR: solicitar que a gestante mostre a primeira ultrassonografia.

Não perguntar a gestante.

(ENTREVISTADOR: anotar em semanas gestacionais)

13 Verificar com que IG a gestante estava quando fez a primeira ultrassonografia e anotar

ENTREVISTADOR: Somente para conferir e anotar.

14.1 Diferença de datas

14.2 Idade gestacional atual calculada

Não perguntar a gestante.

(ENTREVISTADOR: anotar em semanas gestacionais)

14 Calcular a Idade Gestacional ATUAL de acordo com a primeira ultrassonografia

ENTREVISTADOR: Usar o gestograma para calcular a IG atual pela USG.

15 Antes desta gravidez, quantas vezes a Sra. ficou grávida contando com algum aborto ou perda que você tenha tido?

(ENTREVISTADOR: colocar 00 se nenhuma)

16 Com que idade a Sra. engravidou pela 1ª vez?

(ENTREVISTADOR: anotar a idade em anos)

17 A Sra. já teve algum aborto ou perda com menos de 5 meses de gravidez?

- Sim
- Não

18 Quantos desses abortos/perdas foram espontâneos?

(ENTREVISTADOR: colocar 00 se nenhum)

19 Quantos partos a Sra. já teve?

(ENTREVISTADOR: colocar 00 se nenhum)

20 Qual foi a data do seu último parto?

(ENTREVISTADOR: atenção para o formato - DD/MM/AAAA)

21 Quantos filhos nasceram vivos?

22 A Sra. teve algum filho prematuro ?

Sim
 Não
(ENTREVISTADOR: Se necessário, definir prematuro - que nasceu antes de 37 semanas de gestação)

23 Quantos?

24 A Sra. teve algum filho que nasceu com menos de de 2,5 kg?

Sim
 Não

25 Quantos?

26 A Sra. teve algum filho que nasceu com mais de 4,0 kg?

Sim
 Não

27 Quantos?

28 A Sra. tentou interromper esta gravidez usando alguma medicação ou algum outro método?

Sim
 Não

Saúde Materna e Intercorrelações Antes e Durante a Gestação

Record ID _____

Vamos conversar agora sobre a sua saúde ANTES da Sra. engravidar. Queremos saber se a Sra. teve alguma dessas doenças diagnosticada pelo médico?

	Sim	Não
Pressão alta (fora da gestação, tendo sido prescrito remédio para uso continuado)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Anemia grave (fora da gestação, ou outra doença no sangue)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Asma/bronquite	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lupus ou outra doença autoimune	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Doenças na Tireóide	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Diabetes (açúcar alto no sangue fora da gestação, confirmado por médico especialista)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Doença renal (nos rins e confirmada por médico especialista que precisa de tratamento)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Epilepsia/convulsão (antes da gestação)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
AVC/derrame	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Doença do fígado (confirmada por médico especialista que precisa de tratamento)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
HIV	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Doença sexualmente transmissível (sífilis, gonorreia...)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Depressão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Transtorno psiquiátrico	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Outra doença	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

"Agora gostaria de saber como foi a sua gestação até o momento. Queremos saber se a Sra. teve alguns desses problemas ou doenças DURANTE a gestação..."

- 1 Infecção urinária? Sim
 Não
- 2 Em que trimestre da gestação a Sra. estava?
ENTREVISTADOR: É possível marcar mais de uma opção. Primeiro Trimestre
 Segundo Trimestre
 Terceiro Trimestre
- 3.1 Quantas vezes no primeiro trimestre?
(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))
- 3.2 Quantas vezes no segundo trimestre?
(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))
- 3.3 Quantas vezes no terceiro trimestre?
(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))
- 4 Gripe ou resfriado? Sim
 Não
- 5 Em que trimestre da gestação a Sra. estava?
ENTREVISTADOR: É possível marcar mais de uma opção. Primeiro Trimestre
 Segundo Trimestre
 Terceiro Trimestre
- 6.1 Quantas vezes no primeiro trimestre?
(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))
- 6.2 Quantas vezes no segundo trimestre?
(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))
- 6.3 Quantas vezes no terceiro trimestre?
(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))
- 7 Inflamação na garganta? Sim
 Não
- 8 Em que trimestre da gestação a Sra. estava?
ENTREVISTADOR: É possível marcar mais de uma opção. Primeiro Trimestre
 Segundo Trimestre
 Terceiro Trimestre
- 9.1 Quantas vezes no Primeiro Trimestre?
(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))
- 9.2 Quantas vezes no Segundo Trimestre?
(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))
- 9.3 Quantas vezes no Terceiro Trimestre?
(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))
- 10 Outra inflamação ou infecção? Sim
 Não
- 10.1 Se outra inflamação ou infecção, qual?

11 Em que trimestre da gestação a Sra. estava?

ENTREVISTADOR: É possível marcar mais de uma opção.

- Primeiro Trimestre
- Segundo Trimestre
- Terceiro Trimestre

12.1 Quantas vezes no Primeiro Trimestre?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

12.2 Quantas vezes no Segundo Trimestre?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

12.3 Quantas vezes no Terceiro Trimestre?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

13 Virose ou intoxicação alimentar?

- Sim
- Não

14 Em que trimestre da gestação a Sra. estava?

ENTREVISTADOR: É possível marcar mais de uma opção.

- Primeiro Trimestre
- Segundo Trimestre
- Terceiro Trimestre

15.1 Quantas vezes no Primeiro Trimestre?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

15.2 Quantas vezes no Segundo Trimestre?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

15.3 Quantas vezes no Terceiro Trimestre?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

16 A Sra. precisou ser hospitalizada ou procurou a emergência desde o início da gestação até o momento?

- Sim
- Não

17 Em que trimestre da gestação a Sra. foi hospitalizada?

ENTREVISTADOR: É possível marcar mais de uma opção.

- Primeiro Trimestre
- Segundo Trimestre
- Terceiro Trimestre

18 Quantas vezes no Primeiro Trimestre?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

19 Por qual (quais) motivo (s) a Sra. foi internada no primeiro trimestre?

20 Quantas vezes no Segundo Trimestre?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

21 Por qual (quais) motivo (s) a Sra. foi internada no segundo trimestre?

22 Quantas vezes no Terceiro Trimestre?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

23 Por qual (quais) motivo (s) a Sra. foi internada no terceiro trimestre?

24 Apresentou aumento da pressão?

- Sim
- Não

24.1 Em que trimestre da gestação a Sra. teve aumento da pressão?

- Primeiro trimestre
 Segundo trimestre
 Terceiro trimestre

24.1.1 Quantas vezes no primeiro trimestre?

24.1.2 Quantas vezes no segundo trimestre?

24.1.3 Quantas vezes no terceiro trimestre?

25 Teve diabetes ou açúcar no sangue elevado?

- Sim
 Não

26 Teve diarreia (fezes líquidas de forma frequente - várias vezes)?

- Sim
 Não

26.1 Quantas vezes?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

26.2 Há quantos dias começou o último episódio de diarreia?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

26.3 Quantos dias durou?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

Agora vamos falar sobre vitaminas e suplementos! Preciso que a senhora me fale das vitaminas e suplementos que a Sra usou desde o início da gestação, como ferro, ácido fólico, etc, incluindo os que foram uma única vez e aqueles continua usando até agora.

27 A Sra. usou ou está usando alguma vitamina, ácido fólico ou outro suplemento desde que ficou grávida?

- Sim
 Não

28 Dos suplementos que falarei agora gostaria que a Sra. me dissesse se está tomando atualmente, se já tomou alguma vez, ou se nunca tomou.

	Está tomando	Tomou alguma vez	Nunca tomou
Ferro (sulfato ferroso)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ácido fólico	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Multivitamínico	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Vitamina C	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Outros	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

28.1 Você sabe a dosagem desse ferro que a Sra. tomava ou toma ou a Sra. trouxe a caixa do suplemento?

- A Sra. lembra a dosagem
 O ferro que a Sra. toma/tomava é/era fornecido pela Unidade
 A Sra. não lembra/não sabe informar
 (ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.)

28.1.1 Qual a dosagem do comprimido?

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do suplemento, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

28.1.1 a) Quantos comprimidos por dia a Sra. toma/tomava?

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

28.1.2 Desde quando a Sra. está tomando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

28.1.3 Em que período da gestação a Sra. estava quando tomou?

28.1.4 Por quanto tempo a Sra. tomou?

28.2 Você sabe a dosagem desse ácido fólico que a Sra. tomava ou toma ou a Sra. trouxe a caixa do suplemento?

28.2.1 Qual a dosagem do comprimido?

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do suplemento, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

28.2.1 a) Quantos comprimidos por dia a Sra. toma/tomava?

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

28.2.2 Desde quando a Sra. está tomando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

28.2.3 Em que período da gestação a Sra. estava quando tomou?

(ENTREVISTADOR: anotar em mg (miligrama))

(ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos ingeridos por dia.)

(DD-MM-AAAA)

- Primeiro Trimestre
- Segundo Trimestre
- Terceiro Trimestre

(ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias)

- A Sra. lembra a dosagem
- O ácido fólico que a Sra. toma/tomava é/era fornecido pela Unidade
- A Sra. não lembra/não sabe informar
(ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.)

(ENTREVISTADOR: anotar em mcg (micrograma))

(ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos ingeridos por dia.)

(DD-MM-AAAA)

- Primeiro Trimestre
- Segundo Trimestre
- Terceiro Trimestre

28.2.4 Por quanto tempo a Sra. tomou?

(ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias)

28.3 Você sabe a dosagem desse multivitamínico que a Sra. tomava ou toma ou a Sra. trouxe a caixa do suplemento?

- A Sra. lembra a dosagem
 - O multivitamínico que a Sra. toma/tomava é/era fornecido pela Unidade
 - A Sra. não lembra/não sabe informar
- (ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.)

28.3.1 Qual o nome e a dosagem do multivitamínico que a senhora está tomando?

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do suplemento, verificar e confirmar o nome na embalagem.

28.3.1 a) Quantos comprimidos por dia a Sra. toma/tomava?

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

(ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos ingeridos por dia.)

28.3.2 Desde quando a Sra. está tomando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

(DD-MM-AAAA)

28.3.3 Em que período da gestação a Sra. estava quando tomou?

- Primeiro Trimestre
- Segundo Trimestre
- Terceiro Trimestre

28.3.4 Por quanto tempo a Sra. tomou?

(ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias)

28.4 Você sabe a dosagem dessa Vitamina C que a Sra. tomava ou toma ou a Sra. trouxe a caixa do suplemento?

- A Sra. lembra a dosagem
 - O Vitamina C que a Sra. toma/tomava é/era fornecido pela Unidade
 - A Sra. não lembra/não sabe informar
- (ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.)

28.4.1 Qual a dosagem do comprimido?

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do suplemento, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

(ENTREVISTADOR: anotar em g (grama))

28.4.1 a) Quantos comprimidos por dia a Sra. toma/tomava?

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

(ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos ingeridos por dia.)

28.4.2 Desde quando a Sra. está tomando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

28.4.3 Em que período da gestação a Sra. estava quando tomou?

(DD-MM-AAAA)

- Primeiro Trimestre
- Segundo Trimestre
- Terceiro Trimestre

28.4.4 Por quanto tempo a Sra. tomou?

(ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias)

28.5.0 Qual o outro suplemento?

28.5 Você sabe a dosagem desse outro suplemento que a Sra. tomava ou toma ou a Sra. trouxe a caixa do suplemento?

- A Sra. lembra a dosagem
 - O outro suplemento que a Sra. toma/tomava é/era fornecido pela Unidade
 - A Sra. não lembra/não sabe informar
- (ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.)

28.5.1 Qual a dosagem do comprimido?

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do suplemento, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

(ENTREVISTADOR: Exemplo 200mg / 100g / 1000mcg)

28.5.1 a) Quantos comprimidos por dia a Sra. toma/tomava?

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

(ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos ingeridos por dia.)

28.5.2 Desde quando a Sra. está tomando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

(DD-MM-AAAA)

28.5.3 Em que período da gestação a Sra. estava quando tomou?

- Primeiro Trimestre
- Segundo Trimestre
- Terceiro Trimestre

28.5.4 Por quanto tempo a Sra. tomou?

(ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias)

Agora vamos falar sobre medicamentos! Preciso que a senhora me fale de todos os remédios usados desde o início da gestação até hoje. Conte com aqueles que foram usados uma única vez e os continuam sendo usados. Não se esqueça de pílulas, pomada, creme, xarope ou daqueles remédios usados para enjoo, azia, dor, tratamento de infecção urinária, ou outra infecção, pressão alta ou diabetes.

29 A Sra. usou ou está usando atualmente algum remédio?

- Sim
 Não

30 Quantos remédios?

- 1 Remédio
 2 Remédios
 3 Remédios
 4 Remédios ou mais
 (ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

31 Qual o nome do Remédio 01? A Sra. trouxe a caixa do Remédio 1?

32.1 A senhora tomou/usou ou está tomando/usando o remédio 1?

- Tomou
 Está tomando

32.2 Você sabe a dosagem do Remédio 1?

- A Sra. lembra a dosagem
 É/foi fornecido pela Unidade
 A Sra. não lembra/não sabe informar

ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.

32.3 Qual a dosagem do Remédio 1?

 (EXEMPLO: 1 g; 200 mg; 100 ml)

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do remédio, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

32.4 Quantos comprimidos/dose por dia a Sra. toma/tomava ou usa/usava?

 (ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos/doses por dia.)

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

32.5 Desde quando a Sra. está tomando/usando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

32.6 Em que período da gestação a Sra. estava quando tomou/usou?

- Primeiro Trimestre
 Segundo Trimestre
 Terceiro Trimestre

32.7 Por quanto tempo a Sra. tomou/usou?

ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias

33.1 Qual o nome do Remédio 2? A Sra. trouxe a caixa do Remédio 2?

33.1 a) A senhora tomou/usou ou está tomando/usando o remédio 2?

- Tomou
- Está tomando

33.2 Você sabe a dosagem do Remédio 2?

- A Sra. lembra a dosagem
- É/foi fornecido pela Unidade
- A Sra. não lembra/não sabe informar

ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.

33.3 Qual a dosagem do Remédio 2?

(EXEMPLO: 1 g; 200 mg; 100 ml)

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do remédio, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

33.4 Quantos comprimidos/dose por dia a Sra. toma/tomava ou usa/usava?

(ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos/doses por dia.)

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

33.5 Desde quando a Sra. está tomando/usando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

33.6 Em que período da gestação a Sra. estava quando tomou/usou?

- Primeiro Trimestre
- Segundo Trimestre
- Terceiro Trimestre

33.7 Por quanto tempo a Sra. tomou/usou?

ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias

34.1 Qual o nome do Remédio 3? A Sra. trouxe a caixa do Remédio 3?

34.1 a) A senhora tomou/usou ou está tomando/usando o remédio 3?

- Tomou
- Está tomando

34.2 Você sabe a dosagem do Remédio 3?

- A Sra. lembra a dosagem
- É/foi fornecido pela Unidade
- A Sra. não lembra/não sabe informar

ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.

34.3 Qual a dosagem do Remédio 3?

(EXEMPLO: 1 g; 200 mg; 100 ml)

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do remédio, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

34.4 Quantos comprimidos por dia a Sra. toma/tomava?

(ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos/doses por dia.)

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

34.5 Desde quando a Sra. está tomando/usando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

34.6 Em que período da gestação a Sra. estava quando tomou/usou?

- Primeiro Trimestre
- Segundo Trimestre
- Terceiro Trimestre

34.7 Por quanto tempo a Sra. tomou/usou?

ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias

35.1 Qual o nome do Remédio 4? A Sra. trouxe a caixa do Remédio 4?

35.1 a) A senhora tomou/usou ou está tomando/usando o remédio 4?

- Tomou
- Está tomando

35.2 Você sabe a dosagem do Remédio 4?

- A Sra. lembra a dosagem
- É/foi fornecido pela Unidade
- A Sra. não lembra/não sabe informar

ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.

35.3 Qual a dosagem do Remédio 4?

(EXEMPLO: 1 g; 200 mg; 100 ml)

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do remédio, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

35.4 Quantos comprimidos/doses por dia a Sra. toma/tomava ou usa/usava?

(ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos/doses por dia.)

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

35.5 Desde quando a Sra. está tomando/usando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

35.6 Em que período da gestação a Sra. estava quando tomou/usou?

- Primeiro Trimestre
- Segundo Trimestre
- Terceiro Trimestre

35.7 Por quanto tempo a Sra. tomou/usou?

ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias

Estilo De Vida Atividade Física PRE

Record ID _____

Nós estamos interessados em saber que tipo de atividade física a Sra. fazia como parte do seu dia a dia antes de estar grávida, ou seja, o que a Sra. HABITUALMENTE fazia. As perguntas incluem as atividades que a Sra. fazia por lazer, por esporte ou por exercício. Suas respostas são MUITO importantes.

ATENÇÃO: Considerar somente as atividades que a Sra. NORMALMENTE realizava.

1 A Sra. praticava alguma atividade física regularmente antes da gestação?

- Sim
 Não

2 Antes da gestação a Sra. fazia caminhada no seu tempo livre, por recreação, esporte, exercício ou lazer por pelo menos 10 minutos contínuos ?

- Sim
 Não
 Não sabe/ não informou

ENTREVISTADOR: Caso a gestante não compreenda perguntar: A Sra. realizava caminhadas que duravam dez minutos ou mais?

3 Antes da gestação, em quantos dias da semana a Sra. habitualmente caminhava por pelo menos 10 minutos contínuos no seu tempo livre por recreação, esporte, exercício ou lazer?

ENTREVISTADOR: Esclarecer se necessário: Quantos dias na semana a senhora fazia caminhadas que duravam 10 minutos ou mais, como exercício ou lazer?

4 Nos dias em que a Sra. caminhava no seu tempo livre, quanto tempo a Sra. normalmente gastava por dia?

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo em minutos e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

ENTREVISTADOR: Esclarecer se necessário: Nesses dias que a senhora falou que caminhava, essas caminhadas duravam quanto tempo mais ou menos?

Para responder as próximas questões considere que:

Atividade física VIGOROSA é aquela que precisa de um grande esforço físico e que faz a Sra. respirar MUITO mais forte que o normal.

Atividade física MODERADA é aquela que precisa de algum esforço físico e que faz a Sra. respirar UM POUCO mais forte que o normal.

5 Antes da gestação a Sra. fazia atividades físicas moderadas no seu tempo livre por pelo menos 10 minutos contínuos, como pedalar ou nadar a velocidade regular, jogar bola, musculação, ginástica, vôlei ou basquete?

- Sim
 Não
 Não sabe/ não informou

6 Se sim, quantas foram estas atividades?

- 1 atividade
- 2 atividades
- 3 atividades

7 Qual era a atividade 1?

7.1 Em quantos dias da semana normalmente a Sra. fazia a Atividade 1 no seu tempo livre antes de estar grávida?

7.2 Nos dias em que a Sra. fazia a Atividade 1, quanto tempo no total a Sra. gastava por dia?

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo em minutos e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

8 Qual era a atividade 2?

8.1 Em quantos dias da semana normalmente a Sra. fazia a Atividade 2 no seu tempo livre antes de estar grávida?

8.2 Nos dias em que a Sra. fazia a Atividade 2, quanto tempo no total a Sra. gastava por dia?

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo em minutos e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

9 Qual era a atividade 3?

9.1 Em quantos dias da semana, normalmente a Sra. fazia a Atividade 3 no seu tempo livre antes de estar grávida?

9.2 Nos dias em que a Sra. fazia a Atividade 3, quanto tempo no total a Sra. gastava por dia?

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo em minutos e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

10 Antes da gestação a Sra. fazia atividades físicas vigorosas no seu tempo livre por pelo menos 10 minutos contínuos como correr, nadar rápido, pedalar rápido?

- Sim
- Não
- Não sabe/ não informou

11 Se sim, quantas foram estas atividades?

- 1 atividade
- 2 atividades
- 3 atividades

12 Qual era a atividade 1?

12.1 Em quantos dias da semana, normalmente a Sra. fazia a Atividade 1 no seu tempo livre antes de estar grávida?

12.2 Nos dias em que a Sra. fazia a Atividade 1, quanto tempo no total a Sra. gastava por dia?

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo em minutos e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

13 Qual era a atividade 2?

13.1 Em quantos dias da semana normalmente a Sra. fazia a Atividade 2 no seu tempo livre antes de estar grávida?

13.2 Nos dias em que a Sra. fazia a Atividade 2, quanto tempo no total a Sra. gastava por dia?

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo em minutos e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

14 Qual era a atividade 3?

14.1 Em quantos dias da semana normalmente a Sra. fazia a Atividade 3 no seu tempo livre antes de estar grávida?

14.2 Nos dias em que a Sra. fazia a Atividade 3, quanto tempo no total a Sra. gastava por dia?

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo em minutos e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

Questionario De Atividade Fisica Para Gestantes

Record ID _____

Data da coleta _____

QUESTIONARIO DE ATIVIDADE FISICA PARA GESTANTES - QAFG

"E muito importante que voce responda honestamente. Nao ha nenhuma resposta certa ou errada. Nos estamos querendo saber o que voce fez durante este trimestre."

1. Qual foi o dia de sua ultima menstruação? _____

2. Quando seu bebe vai nascer? _____

Durante este trimestre, quando voce NAO esta no trabalho, quanto tempo, voce geralmente passa:

3. Preparando as refeições (cozinhando, colocando a mesa e lavando os pratos). nenhum
 menos que 30 minutos por dia
 de 30 minutos a 1 hora por dia
 de 1 hora a 2 horas por dia
 de 2 horas a 3 horas por dia
 de 3 horas ou mais por dia

4. Cuidando de criança (vestindo, banhando, alimentando enquanto voce fica SENTADA). nenhum
 menos que 30 minutos por dia
 de 30 minutos a 1 hora por dia
 de 1 hora a 2 horas por dia
 de 2 horas a 3 horas por dia
 de 3 horas ou mais por dia

5. Cuidando de criança (vestindo, banhando, alimentando enquanto voce fica EM PE). nenhum
 menos que 30 minutos por dia
 de 30 minutos a 1 hora por dia
 de 1 hora a 2 horas por dia
 de 2 horas a 3 horas por dia
 de 3 horas ou mais por dia

6. Brincando com criança enquanto voce esta SENTADA ou EM PE. nenhum
 menos que 30 minutos por dia
 de 30 minutos a 1 hora por dia
 de 1 hora a 2 horas por dia
 de 2 horas a 3 horas por dia
 de 3 horas ou mais por dia

7. Brincando com a criança enquanto voce esta caminhando ou correndo. nenhum
 menos que 30 minutos por dia
 de 30 minutos a 1 hora por dia
 de 1 hora a 2 horas por dia
 de 2 horas a 3 horas por dia
 de 3 horas ou mais por dia

8. Carregando criança nos braços.
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia
9. Cuidando de idoso/adulto incapacitado.
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia
10. Sentada: usando o computador, lendo, escrevendo ou falando ao telefone (Nao estar trabalhando).
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia

Durante este trimestre, quanto tempo, voce geralmente passa:

11. Assistindo TV ou video
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia
12. Brincando com animais de estimacao.
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia
13. Fazendo limpeza leve (arrumar as camas, passar roupas, levar o lixo para fora).
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia
14. Fazendo compras (roupas, comidas ou outros objetos).
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia
15. Fazendo limpeza mais pesada (aspirar, varrer, esfregar o chao, lavar roupas ou lavar janelas)
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia

16. Empurrando cortador de grama, apanhando folhas ou fazendo trabalho no jardim.

- nenhum
- menos que 30 minutos por dia
- de 30 minutos a 1 hora por dia
- de 1 hora a 2 horas por dia
- de 2 horas a 3 horas por dia
- de 3 horas ou mais por dia

Indo a lugares...(DESLOCAMENTO)

Durante este trimestre, quanto tempo, voce geralmente passa:

17. Caminhando lentamente para (pegar o onibus, ir para o trabalho ou fazer visitas).

- nenhum
- menos que 30 minutos por dia
- de 30 minutos a 1 hora por dia
- de 1 hora a 2 horas por dia
- de 2 horas a 3 horas por dia
- de 3 horas ou mais por dia

18. Caminhando rapidamente para (pegar o onibus, ir para o trabalho ou escola)

- nenhum
- menos que 30 minutos por dia
- de 30 minutos a 1 hora por dia
- de 1 hora a 2 horas por dia
- de 2 horas a 3 horas por dia
- de 3 horas ou mais por dia

19. Dirigindo, ou andando de carro ou de onibus.

- nenhum
- menos que 30 minutos por dia
- de 30 minutos a 1 hora por dia
- de 1 hora a 2 horas por dia
- de 2 horas a 3 horas por dia
- de 3 horas ou mais por dia

Para diversão e exercício...(TEMPO LIVRE)

Durante este trimestre, quanto tempo, voce geralmente passa:

20. Caminhando lentamente por divertimento ou exercício.

- nenhum
- menos que 30 minutos por dia
- de 30 minutos a 1 hora por dia
- de 1 hora a 2 horas por dia
- de 2 horas a 3 horas por dia
- de 3 horas ou mais por dia

21. Caminhando mais rapido por divertimento ou exercício.

- nenhum
- menos que 30 minutos por dia
- de 30 minutos a 1 hora por dia
- de 1 hora a 2 horas por dia
- de 2 horas a 3 horas por dia
- de 3 horas ou mais por dia

22. Caminhando mais rapido, ladeira a cima, por divertimento ou exercício.

- nenhum
- menos que 30 minutos por dia
- de 30 minutos a 1 hora por dia
- de 1 hora a 2 horas por dia
- de 2 horas a 3 horas por dia
- de 3 horas ou mais por dia

23. Fazendo "Cooper" (trote ou corrida moderada).
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia
24. Na aula de exercicio pre-natal.
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia
25. Nadando.
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia
26. Dançando
- nenhum
 - menos que 30 minutos por dia
 - de 30 minutos a 1 hora por dia
 - de 1 hora a 2 horas por dia
 - de 2 horas a 3 horas por dia
 - de 3 horas ou mais por dia

Durante este trimestre, quanto tempo, voce geralmente passa:

Fazendo outras coisas por divertimento ou exercicio? (TEMPO LIVRE). Por favor, relacionar as atividades:

27. Outra?
- Sim
 - Não

27.1 Qual?

27.2 Durante esse trimestre quanto tempo voce geralmente passa realizando essa atividade?
(ATIVIDADE RELATADA NA QUESTAO 27.1)

- nenhum
- menos que 30 minutos por dia
- de 30 minutos a 1 hora por dia
- de 1 hora a 2 horas por dia
- de 2 horas a 3 horas por dia
- de 3 horas ou mais por dia

28. Outra?

- Sim
- Não

28.1 Qual?

28.2 Durante esse trimestre quanto tempo voce geralmente passa realizando essa atividade?
(ATIVIDADE RELATADA NA QUESTAO 28.1)

- nenhum
- menos que 30 minutos por dia
- de 30 minutos a 1 hora por dia
- de 1 hora a 2 horas por dia
- de 2 horas a 3 horas por dia
- de 3 horas ou mais por dia

TRABALHO OU ESTUDO

Você trabalha com remuneração fixa (assalariada), é autônoma, trabalha como voluntária ou é estudante?

- Sim
 Não
(Se a resposta for NAO - Encerrar o questionario)

So preencha a proxima etapa se a gestante trabalha por salario, como voluntaria ou se for estudante. Se for dona de casa, desempregada, ou incapacitada de trabalhar, voce nao precisa preencher essa etapa. (NAO LER PARA A GESTANTE)

No Trabalho...

Durante este trimestre, quanto tempo, voce geralmente passa:

29. Sentada, trabalhando em sala de aula ou escritorio.

- nenhum
 menos que 30 minutos por dia
 de 30 minutos a 1 hora por dia
 de 1 hora a 2 horas por dia
 de 2 horas a 3 horas por dia
 de 3 horas ou mais por dia

30. Em pe ou caminhando lentamente no trabalho, carregando objetos (mais pesado que uma garrafa de refrigerante de 2 litros).

- nenhum
 menos que 30 minutos por dia
 de 30 minutos a 1 hora por dia
 de 1 hora a 2 horas por dia
 de 2 horas a 3 horas por dia
 de 3 horas ou mais por dia

31. Em pe ou caminhando lentamente no trabalho, nao carregando nada.

- nenhum
 menos que 30 minutos por dia
 de 30 minutos a 1 hora por dia
 de 1 hora a 2 horas por dia
 de 2 horas a 3 horas por dia
 de 3 horas ou mais por dia

32. Caminhando rapidamente no trabalho, carregando objetos (mais pesado que uma garrafa de refrigerante de 2 litros).

- nenhum
 menos que 30 minutos por dia
 de 30 minutos a 1 hora por dia
 de 1 hora a 2 horas por dia
 de 2 horas a 3 horas por dia
 de 3 horas ou mais por dia

33. Caminhando rapidamente no trabalho, nao carregando nada.

- nenhum
 menos que 30 minutos por dia
 de 30 minutos a 1 hora por dia
 de 1 hora a 2 horas por dia
 de 2 horas a 3 horas por dia
 de 3 horas ou mais por dia

Comportamento Sedentrio

Record ID _____

COMPORTAMENTO SEDENTÁRIO

"Agora eu gostaria que a Sra. pensasse só nas atividades que a Sra. faz nos dias de semana, sem contar sábado e domingo..."

ENTREVISTADOR: Se a gestante referir que realiza duas ou mais atividade ao mesmo tempo, considere somente uma das atividades.

Ex.: Assisto tv e fico no computador duas horas por dia. Considerar somente duas horas de uma das duas atividades.

1 A Sra. assiste televisão todos ou quase todos os dias?

- Sim
 Não

2 Em um dia de semana normal, quanto tempo por dia a Sra. assiste televisão?

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo EM MINUTOS e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

3 A Sra. usa computador na sua casa?

- Sim
 Não

4 Em um dia de semana normal, quanto tempo por dia a Sra. usa computador na sua casa?

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo EM MINUTOS e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

5 A Sra. trabalha fora de casa?

- Sim
 Não

6 Em um dia de semana normal, quanto tempo por dia a Sra. fica sentada no seu trabalho?

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo EM MINUTOS e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

7 A Sra. estuda (colégio, curso técnico, faculdade ou outro curso)?

- Sim
 Não

8 Em um dia de semana normal, quanto tempo por dia a Sra. fica sentada estudando? (no seu colégio, curso técnico, faculdade ou outro curso)

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo EM MINUTOS e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

9 A Sra. anda de carro, ônibus ou moto todos ou quase todos os dias?

- Sim
 Não

10 Em um dia de semana normal, quanto tempo por dia a Sra. fica sentada no carro, ônibus ou moto?

(ENTREVISTADOR: preencher o tempo EM MINUTOS e 99 se a gestante não souber informar - 1 hora = 60 minutos)

Estilo De Vida Consumo De Alcool Gestante

Record ID _____

"E agora, vou fazer algumas perguntas sobre consumo de bebidas alcoólicas..."

1 A Sra. tomou alguma bebida alcoólica desde que engravidou até hoje, mesmo quando você ainda não sabia que estava grávida?

- Sim
 Não

2 Em qual ou quais trimestres da gestação a Sra. estava quando ingeriu bebida alcoólica?

- Primeiro Trimestre
 Segundo Trimestre
 Terceiro Trimestre
(ENTREVISTADOR: Se a gestante referir, marcar mais de uma opção.)

3 Qual é (era) o tipo de bebida alcoólica?

- Cerveja/Chopp
 Vinho
 Cachaça/Vodka/Uísque
 Outra
(ENTREVISTADOR: Se a gestante referir, marcar mais de uma opção.)

4 Se outro tipo de bebida, qual?

Estilo De Vida Tabagismo Gestante

Record ID _____

"Agora, eu vou fazer algumas perguntas sobre o hábito de fumar..."

1 A Sra. fuma atualmente?

- Sim
 Não

2 A Sra. já fumou?

- Sim
 Não

3 Quantos cigarros a Sra. fuma por dia?

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

4 Há quanto tempo a Sra. parou de fumar?
(Quantos meses)

(Entrevistador: Preencher o tempo em MESES)

5 Alguém costuma fumar no mesmo ambiente em que a Sra. está?

- Sim
 Não

Anexo 3 – Questionário sociodemográfico

Confidential

Compostos Bioativos do Leite ONDA 1 Dia 1 - ESTUDO.I teste
Page 1 of 4

Bloco Sociodemografico

Record ID _____

"Vamos agora conversar sobre alguns dados gerais seus e de sua família..."

1 Em relação a sua moradia, a casa em que a Sra. mora é:

- Própria
 - Alugada
 - Posse
 - Emprestada
 - Outra
- (ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.)

2 Se outro, tipo de moradia, qual?

(ENTREVISTADOR: Sempre preencher o campo "outro" em caixa baixa (minúsculo))

3 Quantas pessoas moram em sua casa incluindo a Sra.?

(número de pessoas)

4 Quantos cômodos há em sua casa incluindo o banheiro?

5 Sobre a sua situação conjugal a Sra.:

- Mora sem companheiro
- Mora com companheiro

6 Como a Sra. classificaria a cor da pele?

- branca
 - parda/mulata/morena
 - preta
 - amarela/oriental
 - indígena
- (ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.)

7 A Sra. frequentou a escola?

- Sim
- Não

8 Até que grau a Sra. estudou?

- Ens. Fundamental (1º grau)
- Ens. Médio (2º grau)
- Ens. Superior
- Pós-graduação (esp., mest. ou dout.)

9 Até que série/ano a Sra. estudou e concluiu?

- 1º ano/alfabetização (1)
- 2º ano/1ª série (2)
- 3º ano/2ª série (3)
- 4º ano/3ª série (4)
- 5º ano/4ª série (5)
- 6º ano/5ª série (6)
- 7º ano/6ª série (7)
- 8º ano/7ª série (8)
- 9º ano/8ª série (9)

10 Até que série/ano a Sra. estudou e concluiu?

- 1º ano (10)
- 2º ano (11)
- 3º ano (12)

- 11 Até que série/ano a Sra. estudou e concluiu?
- 1º ano ES (Primeiro/segundo período) (13)
 2º ano ES (Terceiro/quarto período) (14)
 3º ano ES (Quinto/sexto período) (15)
 4º ano ES (Sétimo/oitavo período) (16)
 5º ano ES (Nono/décimo período) (17)
 6º ano ES ou + (Décimo ou Décimo primeiro período) (18)
- 12 Até que série/ano a Sra. estudou e concluiu?
- Especialização – 1 ano (1)
 Mestrado - 2 anos (2)
 Doutorado - 4 anos (4)
- 13 Anos de estudo (ENTREVISTADOR: NÃO PERGUNTAR)
- _____
- *Fundamental / Médio / Ensino Superior: Valor apresentado entre parênteses.
- *Pós-graduação: Valor entre parênteses da graduação + valor entre parênteses da pós-graduação.
- 14 A Sra. sabe ler e escrever?
- Sim
 Não
- 15 A Sra. tem alguma ocupação remunerada?
- Sim
 Não
 (ENTREVISTADOR: Se necessário explicar que está se referindo a trabalho remunerado)
- 16 Que tipo de trabalho a Sra. realiza?
- _____
- 17 Qual a sua renda mensal?
- _____
- (Valor em R\$: Ex.: 2000.00)
- 18 A Sra. possui alguma outra fonte de renda?
- Sim
 Não
 (ENTREVISTADOR: Por exemplo, bolsa família, pensão etc.)
- 19 Qual é a outra fonte de renda?
- Bolsa Família
 Pensão
 Aluguel de Imóvel
 Outro
 (ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.)
- 19.1 Se outra fonte de renda, qual?
- _____
- 19.2 Qual o valor dessa outra renda?
- _____
- (Valor em R\$: Ex.: 2000.00)
- 20 Em relação a sua situação de trabalho a Sra. possui:
- Trabalho remunerado com carteira assinada
 Trabalho remunerado sem carteira assinada
 Servidora pública (municipal, estadual, federal , militar)
 Empregadora /Possui firma ou empresa
 Autônoma
 Cooperativada
 Outro
- 21 Se outra situação de trabalho, qual?
- _____

22 Quantas pessoas que moram na sua casa possuem alguma fonte de renda mensal, sem contar a Sra.?

- Nenhuma
 1 pessoa
 2 pessoas
 3 pessoas
 4 pessoas
 5 pessoas ou mais
 (ENTREVISTADOR: Não incluir a renda da gestante)

23 Qual o grau de parentesco da(s) pessoa(s) que contribui(em) com a renda familiar?

- Mãe
 Pai
 Companheiro
 Pai da Criança
 Outro
 (ENTREVISTADOR: É possível marcar mais de uma opção)

23.1 Se outro parente, qual?

24 Qual a renda desse familiar ou morador (Contribuinte 1)?

(Valor em R\$: Ex.: 2000.00)

25 Qual a renda desse familiar ou morador (Contribuinte 2)?

(Valor em R\$: Ex.: 2000.00)

26 Qual a renda desse familiar ou morador (Contribuinte 3)?

(Valor em R\$: Ex.: 2000.00)

27 Qual a renda desse familiar ou morador (Contribuinte 4)?

(Valor em R\$: Ex.: 2000.00)

28 Qual a renda desse familiar ou morador (Contribuinte 5)?

(Valor em R\$: Ex.: 2000.00)

29 Quem é o(a) chefe da família?

- 1 Você (a própria mulher)
 2 Pai da criança
 4 Seu pai
 3 Sua mãe
 5 Outra pessoa
 6 Não soube responder

30 Ele/ela frequentou a escola?

- Sim
 Não

31 Até que grau ele/ela estudou?

- Ens. Fundamental (1º grau)
 Ens. Médio (2º grau)
 Ens. Superior
 Pós-graduação (esp., mest. ou dout.)

32 Até que série/ano ele/ela estudou e concluiu?

- 1º ano/alfabetização (1)
 2º ano/1ª série (2)
 3º ano/2ª série (3)
 4º ano/3ª série (4)
 5º ano/4ª série (5)
 6º ano/5ª série (6)
 7º ano/6ª série (7)
 8º ano/7ª série (8)
 9º ano/8ª série (9)

33 Até que série/ano ele/ela estudou e concluiu?

- 1º ano (10)
 2º ano (11)
 3º ano (12)

34 Até que série/ano ele/ela estudou e concluiu?

- 1º ano ES (Primeiro/segundo período) (13)
- 2º ano ES (Terceiro/quarto período) (14)
- 3º ano ES (Quinto/sexto período) (15)
- 4º ano ES (Sétimo/oitavo período) (16)
- 5º ano ES (Nono/décimo período) (17)
- 6º ano ES ou + (Décimo ou Décimo primeiro período) (18)

35 Até que série/ano ele/ela estudou e concluiu?

- Especialização - 1 ano (1)
- Mestrado - 2 anos (2)
- Doutorado - 4 anos (4)

36 Anos de estudo

(ENTREVISTADOR: observar o valor numérico entre parenteses ao lado da série respondida pela gestante e preencher. Não perguntar a entrevistada.)

37 Ele/ela sabe ler e escrever?

- Sim
- Não

ATENÇÃO ENTREVISTADOR: OS PRÓXIMOS CAMPOS DEVEM APENAS SER MARCADOS!

38 Status da gestante

- ativa
- perda
- exclusão

(ENTREVISTADOR: esse campo apenas deve ser preenchido, não deve ser lido ou perguntado)

39 Motivo de perda

- Faltou a entrevista,
- Não quis mais participar do estudo
- Trocou o pré-natal para outra unidade
- Outro

(ENTREVISTADOR: Campo de uso do entrevistador. Não deve ser lido ou perguntado)

40 Qual foi o outro motivo?

(ENTREVISTADOR: Sempre preencher o campo "outro" em caixa baixa (minúsculo))

41 Motivo da exclusão

- Não pretende amamentar
- Uso de antibiótico nos 3 meses anteriores
- Está esperando gêmeos
- Outro

(ENTREVISTADOR: Campo de uso do entrevistador. Não deve ser lido ou perguntado)

42 Qual o outro motivo?

Anexo 3 – Questionário de informações do nascimento, uso de medicamento infantil e informações do parto

Confidential

Compostos Bioativos do Leite ONDA 1 Dia 1 - ESTUDO.1 teste
Page 1 of 2

Informações sobre o nascimento

Record ID _____

1 Com quantas semanas de gestação o (a) nasceu?

(ENTREVISTADOR: colocar em semanas de gestação (ex.: 5, 3, 7).)

1.1 Qual a data de nascimento do(a) ?

(ENTREVISTADOR: atenção para o formato - DD/MM/AAAA)

2 Que horas o (a) nasceu?

(ENTREVISTADOR confirmar essa informação no cartão da criança)

3 O (a) chorou ao nascer?

Sim
 Não

4 O médico levou o (a) logo após o parto para ficar com a Sra.?

Sim
 Não

5 A Sra. amamentou nos primeiros 30 minutos logo após o parto?

Sim
 Não

6 A Sra. e o (a) ficaram em alojamento conjunto?

Sim
 Não

7 Por que o (a) não foi para o quarto junto da Sra.?

Foi para o berçário/incubadora/ berço aquecido
 Foi para a UI/UTI/berçário patológico
 Outro motivo

7.1 Qual o outro motivo

8 Houve algum destes problemas ou necessidades com o (a) ao nascer?

 Hipoglicemia/baixa de açúcar no sangue
 Malformação congênita (defeito cardíaco)
 Precisou de oxigênio após o nascimento
 O bebê ficou amarelo (icterícia)
 Tomou banho de luz
 Foi transferido para outro hospital
 Teve infecção
 Prematuridade
 HIV+ ou HTLV+
 Outros
 Nenhum

8.1 Se outro qual?

9 O (a) ficou internado após o parto?

 Sim
 Não

10 Quanto tempo o (a) ficou internado após o parto?

(ENTREVISTADOR: colocar o tempo em dias)

11 Qual é o sexo do (a) ?

Masculino
 Feminino

12 Qual o peso ao nascer? (ver o cartão da criança)

(ENTREVISTADOR: coloque o peso em gramas.)

13 Comprimento ao nascer (ver o cartão da criança)

(ENTREVISTADOR: coloque o comprimento em centímetros.)

14 Apgar no primeiro minuto (ver o cartão da criança)

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

15 Apgar no quinto minuto (ver o cartão da criança)

(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

Uso medicamento criança

Record ID _____

"Agora gostaria de saber seu/sua filho(a) usou algum medicamento desde que nasceu até hoje..."

29 A(o) usou ou está usando atualmente algum remédio?

- Sim
 Não

30 Quantos remédios?

- 1 Remédio
 2 Remédios
 3 Remédios
 4 Remédios ou mais
(ENTREVISTADOR: Em número (ex.: 5, 3, 7))

31 A Qual o nome do Remédio 01? Sra. trouxe a caixa do Remédio 1?

32.1 A(o) tomou/usou ou está tomando/usando o remédio 1?

- Tomou
 Está tomando

32.2 Você sabe a dosagem do Remédio 1?

- A Sra. lembra a dosagem
 É/foi fornecido pela Unidade
 A Sra. não lembra/não sabe informar

ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.

32.3 Qual a dosagem do Remédio 1?

_____ (EXEMPLO: 1 g; 200 mg; 100 ml)

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do remédio, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

32.4 Quantos comprimidos/dose por dia a(o) toma/tomava ou usa/usava?

_____ (ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos/doses por dia.)

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

32.5 Desde quando a(o) está tomando/usando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

32.7 Por quanto tempo a(o) . tomou/usou?

ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias

33.1 Qual o nome do Remédio 2? A Sra. trouxe a caixa do Remédio 2?

33.1 a) A(o) tomou/usou ou está tomando/usando o remédio 2?

- Tomou
- Está tomando

33.2 Você sabe a dosagem do Remédio 2?

- A Sra. lembra a dosagem
- É/foi fornecido pela Unidade
- A Sra. não lembra/não sabe informar

ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.

33.3 Qual a dosagem do Remédio 2?

(EXEMPLO: 1 g; 200 mg; 100 ml)

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do remédio, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

33.4 Quantos comprimidos/dose por dia a(o) toma/tomava ou usa/usava?

(ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos/doses por dia.)

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

33.5 Desde quando a(o) . está tomando/usando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

33.7 Por quanto tempo a(o) tomou/usou?

ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias

34.1 Qual o nome do Remédio 3? A Sra. trouxe a caixa do Remédio 3?

34.1 a) A(o) tomou/usou ou está tomando/usando o remédio 3?

- Tomou
- Está tomando

34.2 Você sabe a dosagem do Remédio 3?

- A Sra. lembra a dosagem
- É/foi fornecido pela Unidade
- A Sra. não lembra/não sabe informar

ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.

34.3 Qual a dosagem do Remédio 3?

(EXEMPLO: 1 g; 200 mg; 100 ml)

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do remédio, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

34.4 Quantos comprimidos por dia a(o) toma/tomava?

(ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos/doses por dia.)

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

34.5 Desde quando a(o) está tomando/usando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

34.7 Por quanto tempo a(o) tomou/usou?

ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias

35.1 Qual o nome do Remédio 4? A Sra. trouxe a caixa do Remédio 4?

35.1 a) A(o) tomou/usou ou está tomando/usando o remédio 4?

- Tomou
- Está tomando

35.2 Você sabe a dosagem do Remédio 4?

- A Sra. lembra a dosagem
- É/foi fornecido pela Unidade
- A Sra. não lembra/não sabe informar

ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante.

35.3 Qual a dosagem do Remédio 4?

(EXEMPLO: 1 g; 200 mg; 100 ml)

ENTREVISTADOR: Se a gestante tiver trazido a caixa do remédio, verificar e confirmar a dosagem descrita na embalagem.

35.4 Quantos comprimidos/doses por dia a(o) toma/tomava ou usa/usava?

(ENTREVISTADOR: Anotar a quantidade total de comprimidos/doses por dia.)

Ex.: dois comprimidos antes do almoço e dois antes do jantar. Anotar 4

35.5 Desde quando a(o) está tomando/usando?

ENTREVISTADOR: Se a entrevistada relatar que não recorda o dia exato, padronizar na seguinte forma:

- Início do mês = Colocar dia 05
- Meio do mês = Colocar dia 15
- Final do mês = Colocar dia 25

35.7 Por quanto tempo a(o) tomou/usou?

ENTREVISTADOR: Anotar tempo em dias

Atencao Ao Parto

Record ID

1 O que fez a Sra. achar que estava na hora de procurar atendimento para o parto?

ENTREVISTADOR: Não leia as opções (marque de acordo com a resposta da mulher). Caso a mulher informe que foi à consulta ou telefonou para o médico e ele mandou ela vir para a maternidade, pergunte a razão

1.1 Qual o outro motivo de procurar atendimento para o parto?

2 Quanto tempo se passou desde que a Sra. saiu de casa até chegar neste hospital/maternidade/casa onde fez o parto?

3 A Sra. tentou ganhar o (a) em mais de um lugar?

4 Romperam a bolsa depois que a Sra. chegou no hospital?

5 Qual foi a data de rompimento da bolsa?

6 Você lembra a hora que a bolsa rompeu?

7 Qual foi o horário?

8 Qual era a cor do líquido quando a bolsa estourou?

9 Você entrou em trabalho de parto?

ENTREVISTADOR: Ler as opções para a gestante

10 Qual foi o tipo de parto

11 Como foi a cesárea?

-
- Entrou em trabalho de parto
 - A bolsa rompeu
 - Teve o sinal/perda de tampão mucoso
 - Sentia dores/contrações
 - A data da cesariana estava marcada
 - Fui encaminhada pelo pré-natal/PSF
 - A indução do parto em casa não funcionou
 - Passou mal (pressão alta, sangrou)
 - O bebê estava passando do tempo
 - O bebê não estava mexendo
 - O bebê estava em sofrimento
 - Outro motivo
-

(ENTREVISTADOR: colocar em o tempo em minutos. Observação: 1 hora= 60 minutos. Atenção: preencher 00 para as que já estavam internadas.)

- Sim
- Não
- Não soube informar

- Não, rompeu antes da internação
 - Não, rompeu sozinha durante a internação
 - Sim
- (ENTREVISTADOR: leia as opções)

-
- Sim
 - Não
 - Não soube informar

-
- Claro
 - Esverdeado/Amarronzado
 - Com sangue
 - Amarelado/purulento
 - Não soube informar

- Sim
- Não
- Não soube informar
- Foi induzido

- normal
- fórceps
- cesárea
- cócoras

- Marcada com antecedência
- Decidida durante o trabalho de parto
- Outro

12 Foi posto no soro algum medicamento para aumentar as contrações (ocitocina)?

- Sim
- Não estava com soro
- Não

13 Houve algum problema durante o parto?

- Sim
- Não
- Não soube informar

14 Qual o problema?

15 A Sra. ficou internada?

- Sim
- Não

16 Quanto tempo a Sra. ficou internada?

(ENTREVISTADOR: colocar o tempo em dias)

Anexo 4 – Análise descritiva da amostra, *dofile Stata*

***** Análise descritiva – Tabela 1 e Tabela S1 e S2

tab coleta_fezes_bb3_enviada

*** Idade materna - não parametrica

swilk idade_mae

sum idade_mae, detail

sum idade_mae if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail

sum idade_mae if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos

ranksum idade_mae, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** paridade - não parametrica

swilk n_partos

sum n_partos, detail

sum n_partos if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail

sum n_partos if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

tab n_partos

gen n_partos_cat=.

replace n_partos_cat=1 if n_partos==0 & n_partos~=. .

replace n_partos_cat=2 if n_partos>=1 & n_partos~=. .

tab n_partos_cat

tab n_partos_cat if coleta_fezes_bb3_enviada==1

*** sem diferença entre os grupos

ranksum n_partos, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** escolaridade - não parametrica

swilk escolaridade

sum escolaridade, detail

sum escolaridade if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail

sum escolaridade if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos

ranksum escolaridade, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** Renda total - não parametrica

swilk renda_total

sum renda_total, detail

sum renda_total if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail

sum renda_total if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos

ranksum renda_total, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** renda per-capita - não parametrica

swilk renda_percapta

sum renda_percapta, detail

sum renda_percapta if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail

sum renda_percapta if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos

ranksum renda_percapta, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

```

*** peso pré - não parametrica
swilk peso_pre
sum peso_pre, detail
sum peso_pre if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum peso_pre if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos
ranksum peso_pre, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** Estatura materna - parametrica
swilk estatura_m
sum estatura_m, detail
sum estatura_m if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum estatura_m if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos
ttest estatura_m, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** Estatura use - Parametrica
swilk est_use
sum est_use, detail
sum est_use if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum est_use if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos
ttest est_use, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** IMC pre - não parametrica
swilk new_imc_pre
sum new_imc_pre, detail
sum new_imc_pre if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum new_imc_pre if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos
ranksum new_imc_pre, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** GPT - parametrica
swilk new_gpt
sum new_gpt, detail
sum new_gpt if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum new_gpt if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos
ttest new_gpt, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

** taxa de GPG total - parametrica
swilk taxa_GPG_total
sum taxa_GPG_total, detail
sum taxa_GPG_total if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum taxa_GPG_total if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos
ttest taxa_GPG_total, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** GP 3 TRI - parametrica
swilk gp3tri
sum gp3tri, detail
sum gp3tri if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum gp3tri if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

```

```

*** sem diferença entre os grupos
ttest gp3tri, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

** taxa de GPG - parametrica
swilk taxa_GPG
sum taxa_GPG, detail
sum taxa_GPG if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum taxa_GPG if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos
ttest taxa_GPG, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** IG parto - parametrica
swilk parto_sem
sum parto_sem, detail
sum parto_sem if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum parto_sem if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

gen ig_parto_cat=.
replace ig_parto_cat=1 if parto_sem>=37 & parto_sem<42
replace ig_parto_cat=2 if parto_sem<37 & parto_sem~=.
replace ig_parto_cat=3 if parto_sem>=42 & parto_sem~=.

tab ig_parto_cat if coleta_fezes_bb3_enviada==1

*** sem diferença entre os grupos
ttest parto_sem, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** PN - não parametrica
swilk pn
sum pn, detail
sum pn if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum pn if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos
ranksum pn, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** Comprimento ao nascer - não parametrica
swilk compm_nasc
sum compm_nasc, detail
sum compm_nasc if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum compm_nasc if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos
ranksum compm_nasc, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** Apgar 1 minuto - não parametrico
swilk apgar_1min
sum apgar_1min, detail
sum apgar_1min if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum apgar_1min if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

*** sem diferença entre os grupos
ranksum apgar_1min, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** Apgar 5 minuto - não parametrico
swilk apgar_5min
sum apgar_5min, detail
sum apgar_5min if coleta_fezes_bb3_enviada==1, detail
sum apgar_5min if coleta_fezes_bb3_enviada==0, detail

```


*** sem diferença entre os grupos
ranksum apgar_5min, by (coleta_fezes_bb3_enviada)

*** imc pré cat
tab imc_pre_2_cat coleta_fezes_bb3_enviada
tab imc_pre_2_cat coleta_fezes_bb3_enviada, exact

*** IMC quartil
tab imc_quartil coleta_fezes_bb3_enviada

*** sem diferença entre os grupos
tab imc_quartil coleta_fezes_bb3_enviada, chi2

*** desejo de engravidar materno
tab desejo_mae coleta_fezes_bb3_enviada

*** sem diferença entre os grupos
tab desejo_mae coleta_fezes_bb3_enviada, chi2

*** desejo do pai
tab desejo_pai coleta_fezes_bb3_enviada

*** sem diferença entre os grupos
tab desejo_pai coleta_fezes_bb3_enviada, chi2

*** sexo do bb
tab sexo_bebe if coleta_fezes_bb3_enviada==1
tab sexo_bebe coleta_fezes_bb3_enviada

*** sem diferença entre os grupos
tab sexo_bebe coleta_fezes_bb3_enviada, chi2

*** tipo de parto
tab tipo_parto if coleta_fezes_bb3_enviada==1
tab tipo_parto coleta_fezes_bb3_enviada

*** sem diferença entre os grupos - TENDENCIA
tab tipo_parto coleta_fezes_bb3_enviada, chi2

*** AM no parto
tab AM_parto coleta_fezes_bb3_enviada

*** sem diferença entre os grupos
tab AM_parto coleta_fezes_bb3_enviada, chi2

*** tipo de AM <5
tab tipo_AM coleta_fezes_bb3_enviada

*** teste exato de fischer - sem diferença entre os grupos
tab tipo_AM coleta_fezes_bb3_enviada, exact

*** tipo de AM - new_AM
tab new_AM coleta_fezes_bb3_enviada

*** teste exato de fischer - sem diferença entre os grupos
tab new_AM coleta_fezes_bb3_enviada, exact

Anexo 5 – Análise da composição e diversidade de MI, *script software R*

```
##### Script análises dissertação
```

```
### Gráficos de abundância
```

```
# amostra geral (resultado não mostrado)
```

```
mdf%>%
```

```
  group_by(Sample, Genus )%>%
```

```
  summarise(total = sum(Abundance))%>%
```

```
  mutate(total= round(prop.table(total),3))%>%
```

```
  select(Sample,Genus ,total)%>%
```

```
  mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",  
    "Others", "Others","Others", "Others", "Others","Others", "Others",  
    "o_Clostridiales","Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",  
    "f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",  
    "Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",  
    "Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",  
    "Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",  
    "Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",  
    "Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",  
    "Others", "Coprobacillus", "Coproccoccus", "Others", "Others", "Others",  
    "Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",  
    "Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",  
    "Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",  
    "Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",  
    "Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",  
    "Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",  
    "Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",  
    "Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",  
    "Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",  
    "Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",  
    "Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",  
    "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",  
    "Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",  
    "Others"))%>%
```

```
  ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+ geom_bar(stat =  
'identity')+ theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
```

```
  scale_y_continuous(labels=scales::percent)+
```

```
  scale_fill_manual(values=MyPalette2)+
```

```
  theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+ 
```

```
  theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
```

```
    axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
```

```
    title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
```

```
    legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
```

```
  theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+ 
```

```
  labs(title = "Infant Gut Microbiota at 1 month",
```

```
    x = "",
```

```
    y = "Relative frequency (%)",
```

```
    fill = "Genus")
```

```
##### Figura 1
```

```
# para IMC adequado
```

```
mdf_0%>%
```

```
  group_by(Sample, Genus )%>%
```

```
  summarise(total = sum(Abundance))%>%
```

```
  mutate(total= round(prop.table(total),3))%>%
```

```
  select(Sample,Genus ,total)%>%
```

```
  mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",  
    "Others", "Others","Others", "Others", "Others","Others", "Others",  
    "o_Clostridiales","Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",
```

```

"f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",
"Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",
"Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",
"Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",
"Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",
"Others", "Coprobacillus", "Coprococcus", "Others", "Others", "Others",
"Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",
"Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",
"Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",
"Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",
"Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",
"Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",
"Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",
"Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",
"Others"))>%>%
  ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+ geom_bar(stat =
'identity')+ theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
  scale_y_continuous(labels=scales::percent)+
  theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
  scale_fill_manual(values=MyPalette2)+
  theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+
  theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+
  theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
        axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
        title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
        legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
  labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",
        x = "Normal BMI",
        y = "Relative frequency",
        fill = "Genus")

# para IMC excessive

mdf_1%>%
  group_by(Sample, Genus )%>%
  summarise(total = sum(Abundance))%>%
  mutate(total= round(prop.table(total),3))%>%
  select(Sample,Genus ,total)%>%
  mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",
    "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others",
    "o_Clostridiales", "Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",
    "f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",
    "Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",
    "Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",
    "Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",
    "Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",
    "Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",
    "Others", "Coprobacillus", "Coprococcus", "Others", "Others", "Others",
    "Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",
    "Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",
    "Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",
    "Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",
    "Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",
    "Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",

```

```

"Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",
"Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",
"Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",
"Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",
"Others"))>%>%
ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+ geom_bar(stat =
'identity')+ theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
scale_y_continuous(labels=scales::percent)+
theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
scale_fill_manual(values=MyPalette2)+
theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+
theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",
x = "Above normal BMI",
y = "Relative frequency",
fill = "Genus")

```

Figura S1

IMC normal e AM exclusiva

```

mdf__1%>%
group_by(Sample, Genus )%>%
summarise(total = sum(Abundance))%>%
mutate(total= round(prop.table(total),3))%>%
select(Sample,Genus ,total)%>%
mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others",
"o_Clostridiales", "Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",
"f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",
"Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",
"Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",
"Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",
"Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",
"Others", "Coprobacillus", "Coproccoccus", "Others", "Others", "Others",
"Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",
"Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",
"Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",
"Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",
"Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",
"Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",
"Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",
"Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",
"Others")))%>%
ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+
geom_bar(stat = 'identity')+
scale_y_continuous(labels=scales::percent)+
theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+

```

```

scale_fill_manual(values=MyPalette__1)+
theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+
theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
      axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
      title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
      legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",
     x = "Normal BMI & Exclusive breastfeed",
     y = "Relative frequency",
     fill = "Genus")

```

IMC normal e AM predominante e complementado

```

mdf__2%>%
group_by(Sample, Genus )%>%
summarise(total = sum(Abundance))%>%
mutate(total= round(prop.table(total),3))%>%
select(Sample,Genus ,total)%>%
mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others",
  "o_Clostridiales", "Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",
  "f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",
  "Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",
  "Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",
  "Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",
  "Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",
  "Others", "Coprobacillus", "Coprococcus", "Others", "Others", "Others",
  "Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",
  "Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",
  "Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",
  "Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",
  "Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",
  "Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",
  "Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",
  "Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",
  "Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",
  "Others")))%>%
ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+
geom_bar(stat = 'identity')+
scale_y_continuous(labels=scales::percent)+
theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
scale_fill_manual(values=MyPalette__2)+
theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+
theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
      axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
      title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
      legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",
     x = "Normal BMI & No exclusive breastfeed",
     y = "Relative frequency",
     fill = "Genus")

```

```
# IMC excessive e AM esclusivo
```

```
mdf__3%>%  
  group_by(Sample, Genus )>%  
  summarise(total = sum(Abundance))>%  
  mutate(total= round(prop.table(total),3))>%  
  select(Sample,Genus ,total)>%  
  mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",  
    "Others", "Others","Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others",  
    "o_Clostridiales", "Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",  
    "f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",  
    "Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",  
    "Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",  
    "Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",  
    "Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",  
    "Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",  
    "Others", "Coprobacillus", "Coproccoccus", "Others", "Others", "Others",  
    "Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",  
    "Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",  
    "Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",  
    "Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",  
    "Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",  
    "Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",  
    "Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",  
    "Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",  
    "Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",  
    "Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",  
    "Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",  
    "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",  
    "Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",  
    "Others"))>%  
  ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+  
  geom_bar(stat = 'identity')+  
  scale_y_continuous(labels=scales::percent)+  
  theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+  
  scale_fill_manual(values=MyPalette__3)+  
  theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+  
  theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+  
  theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),  
    axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),  
    title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),  
    legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+  
  labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",  
    x = "Above normal BMI & Exclusive breastfeed",  
    y = "Relative frequency",  
    fill = "Genus")
```

```
# IMC eccessivo e AM predominante e complementar
```

```
mdf__4%>%  
  group_by(Sample, Genus )>%  
  summarise(total = sum(Abundance))>%  
  mutate(total= round(prop.table(total),3))>%  
  select(Sample,Genus ,total)>%  
  mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",  
    "Others", "Others","Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others",  
    "o_Clostridiales", "Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",
```

```

"f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",
"Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",
"Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",
"Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",
"Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",
"Others", "Coprobacillus", "Coprococcus", "Others", "Others", "Others",
"Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",
"Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",
"Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",
"Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",
"Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",
"Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",
"Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",
"Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",
"Others"))>%>%
ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+
geom_bar(stat = 'identity')+
scale_y_continuous(labels=scales::percent)+
theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
scale_fill_manual(values=MyPalette__4)+
theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+
theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",
x = "Above normal BMI & No exclusive breastfeed",
y = "Relative frequency",
fill = "Genus")

```

```

### Figura 1
# GP adequado

```

```

mdf_gp_0%>%
group_by(Sample, Genus )%>%
summarise(total = sum(Abundance))%>%
mutate(total= round(prop.table(total),3))%>%
select(Sample,Genus ,total)%>%
mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others",
"o_Clostridiales", "Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",
"f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",
"Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",
"Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",
"Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",
"Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",
"Others", "Coprobacillus", "Coprococcus", "Others", "Others", "Others",
"Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",
"Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",
"Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",
"Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",

```

```

"Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",
"Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",
"Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",
"Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",
"Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",
"Others"))>%>%
ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+
geom_bar(stat = 'identity')+
scale_y_continuous(labels=scales::percent)+
theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
scale_fill_manual(values=MyPalette2)+
theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+
theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",
x = "Adequate GWG",
y = "Relative frequency",
fill = "Genus")

```

GP eccessivo

```

mdf_gp_1)%>%
group_by(Sample, Genus ))%>%
summarise(total = sum(Abundance))>%>%
mutate(total= round(prop.table(total),3))>%>%
select(Sample,Genus ,total)%>%
mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others",
"o_Clostridiales", "Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",
"f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",
"Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",
"Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",
"Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",
"Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",
"Others", "Coprobacillus", "Coproccoccus", "Others", "Others", "Others",
"Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",
"Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",
"Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",
"Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",
"Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",
"Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",
"Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",
"Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",
"Others")))%>%
ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+
geom_bar(stat = 'identity')+
scale_y_continuous(labels=scales::percent)+

```



```

theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
scale_fill_manual(values=MyPalette_gp_1)+
theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+
theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
      axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
      title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
      legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",
     x = "Excessive GWG",
     y = "Relative frequency",
     fill = "Genus")

```

Figura S1

GP adequado e AM exclusivo

```

mdf_gp__1%>%
group_by(Sample, Genus )%>%
summarise(total = sum(Abundance))%>%
mutate(total= round(prop.table(total),3))%>%
select(Sample,Genus ,total)%>%
mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others",
  "o_Clostridiales", "Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",
  "f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",
  "Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",
  "Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",
  "Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",
  "Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",
  "Others", "Coprobacillus", "Coprococcus", "Others", "Others", "Others",
  "Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",
  "Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",
  "Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",
  "Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",
  "Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",
  "Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",
  "Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",
  "Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",
  "Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",
  "Others")))%>%
ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+
geom_bar(stat = 'identity')+
scale_y_continuous(labels=scales::percent)+
theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
scale_fill_manual(values=MyPalette2)+
theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+
theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
      axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
      title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
      legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",
     x = "Adequate GWG & Exclusive breastfeed",
     y = "Relative frequency",

```

```

fill = "Genus")

# GP adequado e AM predominante e complementado

mdf_gp__2%>%
group_by(Sample, Genus )%>%
summarise(total = sum(Abundance))%>%
mutate(total= round(prop.table(total),3))%>%
select(Sample,Genus ,total)%>%
mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others",
  "o_Clostridiales", "Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",
  "f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",
  "Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",
  "Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",
  "Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",
  "Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",
  "Others", "Coprobacillus", "Coproccoccus", "Others", "Others", "Others",
  "Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",
  "Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",
  "Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",
  "Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",
  "Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",
  "Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",
  "Others", "Sutterella", "Trabulsiiella", "Others", "Others", "Veillonella",
  "Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",
  "Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",
  "Others"))%>%
ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+
geom_bar(stat = 'identity')+
scale_y_continuous(labels=scales::percent)+
theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
scale_fill_manual(values=MyPalette_gp__2)+
theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+
theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
  axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
  title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
  legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",
  x = "Adequate GWG & No exclusive breastfeed",
  y = "Relative frequency",
  fill = "Genus")

```

```

# GP excessivo e AM exclusivo

```

```

mdf_gp__3%>%
group_by(Sample, Genus )%>%
summarise(total = sum(Abundance))%>%
mutate(total= round(prop.table(total),3))%>%
select(Sample,Genus ,total)%>%
mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",
  "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others",
  "o_Clostridiales", "Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",

```

```

"f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",
"Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",
"Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",
"Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",
"Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",
"Others", "Coprobacillus", "Coprococcus", "Others", "Others", "Others",
"Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",
"Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",
"Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",
"Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",
"Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",
"Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",
"Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",
"Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",
"Others"))>%
ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+
geom_bar(stat = 'identity')+
scale_y_continuous(labels=scales::percent)+
theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
scale_fill_manual(values=MyPalette_gp_3)+
theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+
theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",
x = "Excessive GWG & Exclusive breastfeed",
y = "Relative frequency",
fill = "Genus")

```

GP excessivo e AM predominante e complementado

```

mdf_gp_4%>%
group_by(Sample, Genus )%>%
summarise(total = sum(Abundance))%>%
mutate(total= round(prop.table(total),3))%>%
select(Sample,Genus ,total)%>%
mutate(Genus=factor(Genus, labels = c("f_Enterobacteriaceae", "Others", "Unclassified", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "Others",
"o_Clostridiales", "Others", "Others", "f_Enterobacteriaceae",
"f_Erysipelotrichaceae", "Others", "Eubacterium", "Prevotella",
"Ruminococcus", "Others", "Acidaminococcus", "Acinetobacter", "Others",
"Actinomyces", "Aggregatibacter", "Others", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Bacteroides", "Bifidobacterium", "Bilophila",
"Blautia", "Others", "Others", "Others", "Others", "Catenibacterium",
"Others", "Others", "Others", "Citrobacter", "Clostridium", "Collinsella",
"Others", "Coprobacillus", "Coprococcus", "Others", "Others", "Others",
"Dialister", "Dorea", "Dysgonomonas", "Others", "Others", "Others",
"Enterococcus", "Others", "Escherichia", "Others", "Others", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Others", "Haemophilus", "Others",
"Lactobacillus", "Lactococcus", "Others", "Others", "Megasphaera", "Others",
"Morganella", "Others", "Others", "Oscillospira", "Parabacteroides", "Others",
"Others", "Others", "Others", "Phascolarctobacterium", "Prevotella", "Others",

```

```

        "Proteus", "Others", "Pseudoramibacter", "Others", "Others", "Others",
        "Others", "Ruminococcus", "Others", "Serratia", "Others", "Others",
        "Others", "Others", "Staphylococcus", "Others", "Streptococcus", "Others",
        "Others", "Sutterella", "Trabulsiella", "Others", "Others", "Veillonella",
        "Others", "Others", "Others", "f_Lachnospiraceae", "Others", "Others",
        "Others", "Others", "Others", "Others", "Others", "f_Peptostreptococcaceae",
        "Others", "Others", "Others", "f_Rikenellaceae", "f_Ruminococcaceae",
        "Others"))>%>%
ggplot(aes(x= Sample, y = total, fill = fct_reorder(Genus, total, .desc = T)))+
geom_bar(stat = 'identity')+
scale_y_continuous(labels=scales::percent)+
theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0))+
scale_fill_manual(values=MyPalette_gp_4)+
theme(legend.position="bottom", legend.direction = "horizontal" )+
theme(plot.margin=unit(c(0.5,0.1,1,0.1),"cm"))+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
      axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 14),
      title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 14),
      legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 12))+
labs(title = "Infant gut microbiota at 1 month",
      x = "Excessive GWG & No exclusive breastfeed",
      y = "Relative frequency",
      fill = "Genus")

```

```
#### alfa e beta diversidade
```

```
microbiota_infant <- physeq
```

```
## arvore filogenetica - apenas para seguir os passos
```

```
library(ape)
```

```
phy_tree = rtree(ntaxa(microbiota_infant), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microbiota_infant))
```

```
library(phytools)
```

```
plotTree(phy_tree,ftype="i",fsize=0.6,lwd=.5)
```

```
microbiota_infant <- merge_phyloseq(microbiota_infant, phy_tree)
```

```
#### adicionar co variaveis do banco
```

```
# antes salvar o banco ordenado
```

```
library(haven)
```

```
banco <- read_dta("banco completo com dieta_151(28_10_19).dta")
```

```
## separar só as 57
```

```
banco <- banco[c(2,6,8,14,15,16,19,21,22,26,27,30,31,33,35,36,38,39,41,42,43,44,46,48,49,50,52,
55,56,57,58,62,66,67,69,71,74,76,79,81,82,85,86,87,88,89,94,96,98,99,102,104,107,108,112,113), ]
```

```
view(colnames(banco))
```

```
sampledata = sample_data(data.frame(
```

```
  ID = factor(banco$record_id),
```

```
  Idade=banco$idade_mae,
```

```
  anos_estudo= banco$escolaridade,
```

```
  pn= banco$pn,
```

```
  paridade = factor (banco$n_partos_cat, labels = c("0", ">=1")),
```

```
  GPT=banco$new_gpt,
```

```
  "Weight gain adequate" = factor(banco$gp_excessivo, labels = c("Adequate", "Excessive")),
```

```
  AM_parto = banco$AM_parto,
```

```

tipo_parto = factor(banco$tipo_parto, labels = c("normal", "cesariana")),
antib_bb = banco$antib_bb,
peso_pre = banco$new_peso_pre,
IMC_pre = banco$new_imc_pre,
IMC_pre_cat = factor(banco$cat_new_imc_pre, labels = c("baixo peso", "eutrofia", "sobrepeso",
"obesidade")),
`Prepregnacy BMI` = factor(banco$imc_pre_2_cat, labels = c("Normal", "Excessive")),
`Type of breastfeeding` = factor(banco$AM_exclusivo, labels = c("Exclusive", "Predominant or
complementary")),
"BMI & Breastfeeding" = factor(banco$imc_AM, labels = c("Normal BMI & Exclusive Breastfeeding",
"Normal BMI & No Exclusive Breastfeeding", "Above normal BMI & Exclusive Breastfeeding", "Above
normal BMI & No Exclusive Breastfeeding")),
"Weight gain and Breastfeeding" = factor(banco$gp_AM, labels = c("Weight gain adequate & Exclusive
Breastfeeding", "Weight gain adequate & No Exclusive Breastfeeding", "Weight gain excessive &
Exclusive Breastfeeding", "Weight gain excessive & No Exclusive Breastfeeding")),
row.names = sample_names(physeq),
stringsAsFactors = FALSE))

```

```
microbiota_infant <- merge_phyloseq(physeq, sampledata)
```

```
##### Alfa diversidade
```

```
alfa_diveridade_shan <- estimate_richness(microbiota_infant, measures = "Shannon")
```

```

alfa_diveridade_shan$bmi <- factor(microbiota_infant@sam_data[["Prepregnacy.BMI"]])
alfa_diveridade_shan$Breastfeeding <- factor(microbiota_infant@sam_data[["Type.of.breastfeeding"]])
alfa_diveridade_shan$bmi_breast <- factor(microbiota_infant@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]])
alfa_diveridade_shan$wg <- factor(microbiota_infant@sam_data[["Weight.gain.adequate"]])
alfa_diveridade_shan$wg_breast <-
factor(microbiota_infant@sam_data[["Weight.gain.and.Breastfeeding"]])
alfa_diveridade_shan$wg_num <- microbiota_infant@sam_data[["Weight.gain.adequate"]]
alfa_diveridade_shan$pn <- microbiota_infant@sam_data[["pn"]]
alfa_diveridade_shan$paridade <- microbiota_infant@sam_data[["paridade"]]
alfa_diveridade_shan$tipo_parto <- microbiota_infant@sam_data[["tipo_parto"]]
alfa_diveridade_shan$Idade <- microbiota_infant@sam_data[["Idade"]]
alfa_diveridade_shan$peso_pre <- microbiota_infant@sam_data[["peso_pre"]]
alfa_diveridade_shan$GPT <- microbiota_infant@sam_data[["GPT"]]

```

```
##### Figura 2
```

```

alfa_diveridade_shan%>%
ggplot(aes(x= bmi, y= Shannon))+
theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
geom_boxplot(fill=c("deepskyblue4","firebrick"))+
labs(title = "Infant Gut Microbiota at 1 month",
x = "Prepregnacy BMI",
y = "Shannon index")

```

```
## Figura S2
```

```

alfa_diveridade_shan%>%
ggplot(aes(x= bmi, y= Shannon, fill =Breastfeeding))+
theme_bw()+
scale_color_manual(values = c("deepskyblue4","firebrick"))+
theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),

```

```

    title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
    axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
    axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
theme(legend.position = "none")+
geom_boxplot()+
labs(title = "Infant Gut Microbiota at 1 month",
     x = "Prepregnancy BMI",
     y = "Shannon index")

#### Testar diferença entre as 2 categorias
wilcox.test(Shannon ~ bmi, data=alfa_diveridade_shan)

#### Testar diferença entre as 4 categorias
# Kruskal wallis
kruskal.test(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$bmi_breast)

## Post-hoc - Dunn test
install.packages("FSA")
library(FSA)
dunnTest(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$bmi_breast)

#### Testar diferença entre as 4 categorias
shannon_anova <- aov(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$bmi_breast)
summary(shannon_anova)

## Pós-hol - teste tukey
TukeyHSD(shannon_anova)

#### regressão para testar a diferença
summary(lm(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$bmi+
           alfa_diveridade_shan$pn + alfa_diveridade_shan$Idade+
           alfa_diveridade_shan$paridade + alfa_diveridade_shan$tipo_parto))

summary(lm(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$GPT+
           alfa_diveridade_shan$pn + alfa_diveridade_shan$Idade+
           alfa_diveridade_shan$paridade + alfa_diveridade_shan$tipo_parto))

#### regressão para testar a diferença
summary(lm(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$bmi_breast+
           alfa_diveridade_shan$pn + alfa_diveridade_shan$Idade+
           alfa_diveridade_shan$paridade + alfa_diveridade_shan$tipo_parto))

### Figura 3
alfa_diveridade_shan%>%
  ggplot(aes(x= wg, y= Shannon))+
  theme_bw()+
  theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
        axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
        title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
        axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
        axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
  geom_boxplot(fill=c("deepskyblue4","firebrick"))+
  labs(title = "Infant Gut Microbiota at 1 month",
       x = "Gestational weight gain",
       y = "Shannon index")

#### Figura S3
alfa_diveridade_shan%>%
  ggplot(aes(x= wg, y= Shannon, fill=Breastfeeding))+

```

```

scale_color_manual(values = c("deepskyblue4", "firebrick"))+
theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
      axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
      axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
theme(legend.position = "none")+
geom_boxplot()+
labs(title = "Infant Gut Microbiota at 1 month",
     x = "Gestational weight gain",
     y = "Shannon index")

#### Testar diferença entre as 2 categorias
var.test(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$wg)
t.test(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$wg)

## Kruskal wallis

kruskal.test(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$wg_breast)

## Post-hoc - Dunn test
dunnTest(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$wg_breast)

#### Testar diferença entre as 4 categorias
shannon_anova <- aov(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$wg_breast)
summary(shannon_anova)

## Pós-hol - teste tukey
TukeyHSD(shannon_anova)

#### regressão para testar a diferença
summary(lm(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$wg+
          alfa_diveridade_shan$peso_pre + alfa_diveridade_shan$pn+
          alfa_diveridade_shan$tipo_parto))

#### regressão para testar a diferença
summary(lm(alfa_diveridade_shan$Shannon~alfa_diveridade_shan$wg_breast +
          alfa_diveridade_shan$peso_pre + alfa_diveridade_shan$pn+
          alfa_diveridade_shan$tipo_parto))

#### Beta-diversidade

(bray_matrix <- distance(microbiota_infant, "bray"))
microbiota_ord <- ordinate(microbiota_infant, "PCoA", "bray")

### Figura 4
plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord, type="sample", color="Prepregnacy.BMI",
               title="Bray-Curtis dissimilarity")+
geom_point(size=7)+
scale_color_manual(values = c("deepskyblue4", "firebrick"))+
theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
      axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
      axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
theme(legend.position = "none")+
labs(color="Pre-pregnancy BMI")

```

```

adonis(bray_matrix ~ microbiota_infant@sam_data[["Prepregnacy.BMI"]], parallel = 2)

### Figura S4
p1= plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord, type="sample", color="Type.of.breastfeeding",
  title="Bray-Curtis dissimilarity")+
  geom_point(size=7)+
  scale_color_manual(values = c("turquoise3","tomato"))+
  theme_bw()+
  theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
  axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
  axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
  theme(legend.position = "none")
p1 + facet_wrap(~microbiota_infant@sam_data[["Prepregnacy.BMI"]], 3)+
  theme(text = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
  labs(color="Breastfeeding")

#### Figura 5
plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord, type="sample", color="Weight.gain.adequate",
  title="Bray-Curtis dissimilarity")+
  geom_point(size=7)+
  scale_color_manual(values = c("deepskyblue4","firebrick"))+
  theme_bw()+
  theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
  axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
  axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
  theme(legend.position = "none")+
  labs(color="Gestacional weight gain")

adonis(bray_matrix ~ microbiota_infant@sam_data[["Weight.gain.adequate"]], parallel = 2)

## Figura S5
p2= plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord, type="sample", color="Type.of.breastfeeding",
  title="Bray-Curtis dissimilarity")+
  geom_point(size=7)+
  scale_color_manual(values = c("turquoise3","tomato"))+
  theme_bw()+
  theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
  axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
  axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
  theme(legend.position = "none")
p2 + facet_wrap(~microbiota_infant@sam_data[["Weight.gain.adequate"]], 3)+
  theme(text = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
  labs(color="Breastfeeding")

unifrac_matrix <- distance(microbiota_infant, "unifrac")

microbiota_ord_unifrac <- ordinate(microbiota_infant, "PCoA", "unifrac")

#### Figura 4
plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord_unifrac, type="sample", color="Prepregnacy.BMI",
  title="Unweighted UniFrac")+
  geom_point(size=7)+
  scale_color_manual(values = c("deepskyblue4","firebrick"))+

```



```

theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
      axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
      axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
theme(legend.position = "none")+
labs(color="Pre-pregnancy BMI")

```

```
adonis(unifrac_matrix ~ microbiota_infant@sam_data[["Prepregnacy.BMI"]], parallel = 2)
```

```
## Figura 5
```

```

plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord_unifrac, type="sample",
color="Weight.gain.adequate",
               title="Unweighted UniFrac")+
geom_point(size=7)+
scale_color_manual(values = c("deepskyblue4","firebrick"))+
theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
      axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
      axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
theme(legend.position = "none")+
labs(color="Gestacional weight gain")

```

```
adonis(unifrac_matrix ~ microbiota_infant@sam_data[["Weight.gain.adequate"]], parallel = 2)
```

```
#### Figura S4
```

```

p1= plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord_unifrac, type="sample",
color="Type.of.breastfeeding",
                  title="Unweighted UniFrac")+
geom_point(size=7)+
scale_color_manual(values = c("turquoise3","tomato"))+
theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
      axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
      axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
theme(legend.position = "none")
p1 + facet_wrap(~microbiota_infant@sam_data[["Prepregnacy.BMI"]], 3)+
theme(text = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
labs(color="Breastfeeding")

```

```
#### Figura S5
```

```

p2= plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord_unifrac, type="sample",
color="Type.of.breastfeeding",
                  title="Unweighted UniFrac")+
geom_point(size=7)+
scale_color_manual(values = c("turquoise3","tomato"))+
theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
      title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
      axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
      axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
theme(legend.position = "none")
p2 + facet_wrap(~microbiota_infant@sam_data[["Weight.gain.adequate"]], 3)+
theme(text = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+

```

```

labs(color="Breastfeeding")

wunifrac_matrix <- distance(microbiota_infant, "wunifrac")

microbiota_ord_Wunifrac <- ordinate(microbiota_infant, "PCoA", "wunifrac")

### Figura 4
plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord_Wunifrac, type="sample",
color="Prepregnacy.BMI",
  title="Weighted UniFrac")+
  geom_point(size=7)+
  scale_color_manual(values = c("deepskyblue4", "firebrick"))+
  theme_bw()+
  theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
  axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
  axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
  legend.title = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
  legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
  theme(legend.position = "bottom", legend.direction = "vertical")+
  labs(color="Pre-pregnancy BMI")

adonis(wunifrac_matrix ~ microbiota_infant@sam_data[["Prepregnacy.BMI"]], parallel = 2)

#### Figura 5
plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord_Wunifrac, type="sample",
color="Weight.gain.adequate",
  title="Weighted UniFrac")+
  geom_point(size=7)+
  scale_color_manual(values = c("deepskyblue4", "firebrick"))+
  theme_bw()+
  theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
  axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
  axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
  legend.title = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
  legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
  theme(legend.position = "bottom", legend.direction = "vertical")+
  labs(color="Gestacional weight gain")

adonis(wunifrac_matrix ~ microbiota_infant@sam_data[["Weight.gain.adequate"]], parallel = 2)

### Figuar S4
p1= plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord_Wunifrac, type="sample",
color="Type.of.breastfeeding",
  title="Weighted UniFrac")+
  geom_point(size=7)+
  scale_color_manual(values = c("turquoise3", "tomato"))+
  theme_bw()+
  theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
  title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
  axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
  axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))
p1 + facet_wrap(~microbiota_infant@sam_data[["Prepregnacy.BMI"]], 3)+
  theme(text = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
  theme(legend.position = "bottom", legend.direction = "vertical",
  legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),

```

```

    legend.title = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
    labs(color="Breastfeeding")

### Figura S5
p2= plot_ordination(microbiota_infant, microbiota_ord_Wunifrac, type="sample",
color="Type.of.breastfeeding",
    title="Weighted UniFrac")+
geom_point(size=7)+
scale_color_manual(values = c("turquoise3","tomato"))+
theme_bw()+
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
    axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 30),
    title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 22),
    axis.text.x = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
    axis.text.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))
p2 + facet_wrap(~microbiota_infant@sam_data[["Weight.gain.adequate"]], 3)+
theme(text = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
theme(legend.position = "bottom", legend.direction = "vertical",
    legend.text = element_text(family = "Times New Roman", size = 30),
    legend.title = element_text(family = "Times New Roman", size = 30))+
labs(color="Breastfeeding")

# PERMANOVA
# IMC e AM – Não mostrado
####grupo1
(bray_matrix_1_2 <- distance(microb_inf_1_2, "bray"))
microbiota_ord_1_2 <- ordinate(microb_inf_1_2, "PCoA", "bray")
adonis(bray_matrix_1_2 ~ microb_inf_1_2@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_1_2), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_1_2))
microb_inf_1_2 <- merge_phyloseq(microb_inf_1_2, phy_tree)

wunifrac_matrix_1_2 <- distance(microb_inf_1_2, "wunifrac")
microbiota_ord_Wunifrac_1_2 <- ordinate(microb_inf_1_2, "PCoA", "wunifrac")
adonis(wunifrac_matrix_1_2~microb_inf_1_2@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

unifrac_matrix_1_2 <- distance(microb_inf_1_2, "unifrac")
microbiota_ord_unifrac_1_2 <- ordinate(microb_inf_1_2, "PCoA", "unifrac")
adonis(unifrac_matrix_1_2 ~ microb_inf_1_2@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

#####grupo2

(bray_matrix_1_3 <- distance(microb_inf_1_3, "bray"))

microbiota_ord_1_3 <- ordinate(microb_inf_1_3, "PCoA", "bray")

adonis(bray_matrix_1_3 ~ microb_inf_1_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_1_3), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_1_3))
microb_inf_1_3 <- merge_phyloseq(microb_inf_1_3, phy_tree)

wunifrac_matrix_1_3 <- distance(microb_inf_1_3, "wunifrac")
microbiota_ord_Wunifrac_1_3 <- ordinate(microb_inf_1_3, "PCoA", "wunifrac")
adonis(wunifrac_matrix_1_3~microb_inf_1_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

unifrac_matrix_1_3 <- distance(microb_inf_1_3, "unifrac")
microbiota_ord_unifrac_1_3 <- ordinate(microb_inf_1_3, "PCoA", "unifrac")
adonis(unifrac_matrix_1_3 ~ microb_inf_1_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

```

#####grupo3

```
(bray_matrix_1_4 <- distance(microb_inf_1_4, "bray"))
```

```
microbiota_ord_1_4 <- ordinate(microb_inf_1_4, "PCoA", "bray")
```

```
adonis(bray_matrix_1_4 ~ microb_inf_1_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)
```

```
phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_1_4), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_1_4))
```

```
microb_inf_1_4 <- merge_phyloseq(microb_inf_1_4, phy_tree)
```

```
wunifrac_matrix_1_4 <- distance(microb_inf_1_4, "wunifrac")
```

```
microbiota_ord_Wunifrac_1_4 <- ordinate(microb_inf_1_4, "PCoA", "wunifrac")
```

```
adonis(wunifrac_matrix_1_4~microb_inf_1_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)
```

```
unifrac_matrix_1_4 <- distance(microb_inf_1_4, "unifrac")
```

```
microbiota_ord_unifrac_1_4 <- ordinate(microb_inf_1_4, "PCoA", "unifrac")
```

```
adonis(unifrac_matrix_1_4 ~ microb_inf_1_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)
```

#####grupo4

```
(bray_matrix_2_3 <- distance(microb_inf_2_3, "bray"))
```

```
microbiota_ord_2_3 <- ordinate(microb_inf_2_3, "PCoA", "bray")
```

```
adonis(bray_matrix_2_3 ~ microb_inf_2_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)
```

```
phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_2_3), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_2_3))
```

```
microb_inf_2_3 <- merge_phyloseq(microb_inf_2_3, phy_tree)
```

```
wunifrac_matrix_2_3 <- distance(microb_inf_2_3, "wunifrac")
```

```
microbiota_ord_Wunifrac_2_3 <- ordinate(microb_inf_2_3, "PCoA", "wunifrac")
```

```
adonis(wunifrac_matrix_2_3~microb_inf_2_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)
```

```
unifrac_matrix_2_3 <- distance(microb_inf_2_3, "unifrac")
```

```
microbiota_ord_unifrac_2_3 <- ordinate(microb_inf_2_3, "PCoA", "unifrac")
```

```
adonis(unifrac_matrix_2_3 ~ microb_inf_2_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)
```

#####grupo5

```
(bray_matrix_2_4 <- distance(microb_inf_2_4, "bray"))
```

```
microbiota_ord_2_4 <- ordinate(microb_inf_2_4, "PCoA", "bray")
```

```
adonis(bray_matrix_2_4 ~ microb_inf_2_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)
```

```
phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_2_4), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_2_4))
```

```
microb_inf_2_4 <- merge_phyloseq(microb_inf_2_4, phy_tree)
```

```
wunifrac_matrix_2_4 <- distance(microb_inf_2_4, "wunifrac")
```

```
microbiota_ord_Wunifrac_2_4 <- ordinate(microb_inf_2_4, "PCoA", "wunifrac")
```

```
adonis(wunifrac_matrix_2_4~microb_inf_2_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)
```

```
unifrac_matrix_2_4 <- distance(microb_inf_2_4, "unifrac")
```

```
microbiota_ord_unifrac_2_4 <- ordinate(microb_inf_2_4, "PCoA", "unifrac")
```

```
adonis(unifrac_matrix_2_4 ~ microb_inf_2_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)
```

#####grupo6

```

(bray_matrix_3_4 <- distance(microb_inf_3_4, "bray"))

microbiota_ord_3_4 <- ordinate(microb_inf_3_4, "PCoA", "bray")

adonis(bray_matrix_3_4 ~ microb_inf_3_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_3_4), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_3_4))
microb_inf_3_4 <- merge_phyloseq(microb_inf_3_4, phy_tree)

wunifrac_matrix_3_4 <- distance(microb_inf_3_4, "wunifrac")
microbiota_ord_Wunifrac_3_4 <- ordinate(microb_inf_3_4, "PCoA", "wunifrac")
adonis(wunifrac_matrix_3_4~microb_inf_3_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

unifrac_matrix_3_4 <- distance(microb_inf_3_4, "unifrac")
microbiota_ord_unifrac_3_4 <- ordinate(microb_inf_3_4, "PCoA", "unifrac")
adonis(unifrac_matrix_3_4 ~ microb_inf_3_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

# GP e AM – Tabela S3

#####grupo1
(bray_matrix_gp_1_2 <- distance(microb_inf_gp_1_2, "bray"))

microbiota_ord_gp_1_2 <- ordinate(microb_inf_gp_1_2, "PCoA", "bray")

adonis(bray_matrix_gp_1_2 ~ microb_inf_gp_1_2@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_gp_1_2), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_gp_1_2))
microb_inf_gp_1_2 <- merge_phyloseq(microb_inf_gp_1_2, phy_tree)

wunifrac_matrix_gp_1_2 <- distance(microb_inf_gp_1_2, "wunifrac")
microbiota_ord_Wunifrac_gp_1_2 <- ordinate(microb_inf_gp_1_2, "PCoA", "wunifrac")
adonis(wunifrac_matrix_gp_1_2~microb_inf_gp_1_2@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

unifrac_matrix_gp_1_2 <- distance(microb_inf_gp_1_2, "unifrac")
microbiota_ord_unifrac_gp_1_2 <- ordinate(microb_inf_gp_1_2, "PCoA", "unifrac")
adonis(unifrac_matrix_gp_1_2 ~ microb_inf_gp_1_2@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

##### grupo2

(bray_matrix_gp_1_3 <- distance(microb_inf_gp_1_3, "bray"))

microbiota_ord_gp_1_3 <- ordinate(microb_inf_gp_1_3, "PCoA", "bray")

adonis(bray_matrix_gp_1_3 ~ microb_inf_gp_1_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_gp_1_3), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_gp_1_3))
microb_inf_gp_1_3 <- merge_phyloseq(microb_inf_gp_1_3, phy_tree)

wunifrac_matrix_gp_1_3 <- distance(microb_inf_gp_1_3, "wunifrac")
microbiota_ord_Wunifrac_gp_1_3 <- ordinate(microb_inf_gp_1_3, "PCoA", "wunifrac")
adonis(wunifrac_matrix_gp_1_3~microb_inf_gp_1_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

unifrac_matrix_gp_1_3 <- distance(microb_inf_gp_1_3, "unifrac")
microbiota_ord_unifrac_gp_1_3 <- ordinate(microb_inf_gp_1_3, "PCoA", "unifrac")
adonis(unifrac_matrix_gp_1_3 ~ microb_inf_gp_1_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

```

```

##### grupo3

(bray_matrix_gp_1_4 <- distance(microb_inf_gp_1_4, "bray"))

microbiota_ord_gp_1_4 <- ordinate(microb_inf_gp_1_4, "PCoA", "bray")

adonis(bray_matrix_gp_1_4 ~ microb_inf_gp_1_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_gp_1_4), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_gp_1_4))
microb_inf_gp_1_4 <- merge_phyloseq(microb_inf_gp_1_4, phy_tree)

wunifrac_matrix_gp_1_4 <- distance(microb_inf_gp_1_4, "wunifrac")
microbiota_ord_Wunifrac_gp_1_4 <- ordinate(microb_inf_gp_1_4, "PCoA", "wunifrac")
adonis(wunifrac_matrix_gp_1_4~microb_inf_gp_1_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

unifrac_matrix_gp_1_4 <- distance(microb_inf_gp_1_4, "unifrac")
microbiota_ord_unifrac_gp_1_4 <- ordinate(microb_inf_gp_1_4, "PCoA", "unifrac")
adonis(unifrac_matrix_gp_1_4 ~ microb_inf_gp_1_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

##### grupo4

(bray_matrix_gp_2_3 <- distance(microb_inf_gp_2_3, "bray"))

microbiota_ord_gp_2_3 <- ordinate(microb_inf_gp_2_3, "PCoA", "bray")

adonis(bray_matrix_gp_2_3 ~ microb_inf_gp_2_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_gp_2_3), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_gp_2_3))
microb_inf_gp_2_3 <- merge_phyloseq(microb_inf_gp_2_3, phy_tree)

wunifrac_matrix_gp_2_3 <- distance(microb_inf_gp_2_3, "wunifrac")
microbiota_ord_Wunifrac_gp_2_3 <- ordinate(microb_inf_gp_2_3, "PCoA", "wunifrac")
adonis(wunifrac_matrix_gp_2_3~microb_inf_gp_2_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

unifrac_matrix_gp_2_3 <- distance(microb_inf_gp_2_3, "unifrac")
microbiota_ord_unifrac_gp_2_3 <- ordinate(microb_inf_gp_2_3, "PCoA", "unifrac")
adonis(unifrac_matrix_gp_2_3 ~ microb_inf_gp_2_3@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

##### grupo5

(bray_matrix_gp_2_4 <- distance(microb_inf_gp_2_4, "bray"))

microbiota_ord_gp_2_4 <- ordinate(microb_inf_gp_2_4, "PCoA", "bray")

adonis(bray_matrix_gp_2_4 ~ microb_inf_gp_2_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_gp_2_4), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_gp_2_4))
microb_inf_gp_2_4 <- merge_phyloseq(microb_inf_gp_2_4, phy_tree)

wunifrac_matrix_gp_2_4 <- distance(microb_inf_gp_2_4, "wunifrac")
microbiota_ord_Wunifrac_gp_2_4 <- ordinate(microb_inf_gp_2_4, "PCoA", "wunifrac")
adonis(wunifrac_matrix_gp_2_4~microb_inf_gp_2_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

unifrac_matrix_gp_2_4 <- distance(microb_inf_gp_2_4, "unifrac")
microbiota_ord_unifrac_gp_2_4 <- ordinate(microb_inf_gp_2_4, "PCoA", "unifrac")
adonis(unifrac_matrix_gp_2_4 ~ microb_inf_gp_2_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

```

```
##### grupo6

(bray_matrix_gp_3_4 <- distance(microb_inf_gp_3_4, "bray"))

microbiota_ord_gp_3_4 <- ordinate(microb_inf_gp_3_4, "PCoA", "bray")

adonis(bray_matrix_gp_3_4 ~ microb_inf_gp_3_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

phy_tree = rtree(ntaxa(microb_inf_gp_3_4), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(microb_inf_gp_3_4))
microb_inf_gp_3_4 <- merge_phyloseq(microb_inf_gp_3_4, phy_tree)

wunifrac_matrix_gp_3_4 <- distance(microb_inf_gp_3_4, "wunifrac")
microbiota_ord_Wunifrac_gp_3_4 <- ordinate(microb_inf_gp_3_4, "PCoA", "wunifrac")
adonis(wunifrac_matrix_gp_3_4~microb_inf_gp_3_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)

unifrac_matrix_gp_3_4 <- distance(microb_inf_gp_3_4, "unifrac")
microbiota_ord_unifrac_gp_3_4 <- ordinate(microb_inf_gp_3_4, "PCoA", "unifrac")
adonis(unifrac_matrix_gp_3_4 ~ microb_inf_gp_3_4@sam_data[["BMI...Breastfeeding"]], parallel = 2)
```