UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

ASSOCIAÇÃO ENTRE OS OLIGOSSACARÍDEOS DO LEITE HUMANO, A MICROBIOTA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO INFANTIL: ESTUDO PROSPECTIVO NOS PRIMEIROS DOZE MESES DE IDADE

AMANDA CAROLINE CUNHA FIGUEIREDO

RIO DE JANEIRO
2021

Amanda Caroline Cunha Figueiredo

ASSOCIAÇÃO ENTRE OS OLIGOSSACARÍDEOS DO LEITE HUMANO, A MICROBIOTA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO INFANTIL: ESTUDO PROSPECTIVO NOS PRIMEIROS DOZE MESES DE IDADE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Nutricionais.

Orientador: Professor Dr. Gilberto Kac

Rio de Janeiro

2021

Figueiredo, Amanda Caroline Cunha

Associação entre os oligossacarídeos do leite humano, a microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil: estudo prospectivo nos primeiros doze meses de idade/ Amanda Caroline Cunha Figueiredo - Rio de Janeiro, 2021.

161f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Nutricionais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-graduação em Nutrição, Rio de Janeiro, 2021.

Orientador: Gilberto Kac

1. Aleitamento materno. 2. Leite humano. 3. Oligossacarídeos. 4. Microbiota intestinal. 5. Desenvolvimento infantil. 6. Crescimento infantil. - Tese. I. Kac, Gilberto (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

Amanda Caroline Cunha Figueiredo

ASSOCIAÇÃO ENTRE OS OLIGOSSACARÍDEOS DO LEITE HUMANO, A MICROBIOTA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO INFANTIL: ESTUDO PROSPECTIVO NOS PRIMEIROS DOZE MESES DE IDADE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Nutricionais.

Aprovada em:

_____

Professor Dr. Gilberto Kac
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Nutrição Josué de Castro
Orientador

_____

Prof. Dr. Carla Taddei de Castro Neves
Universidade de São Paulo/Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Banca examinadora

_____

Prof. Dr. Júlio Beltrame Daleprane
Universidade de do Estado do Rio de Janeiro/ Instituto de Nutrição
Banca examinadora

_____

Prof. Dr. Patrícia de Carvalho Padilha
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Nutrição Josué de Castro
Banca examinadora

_____

Prof. Dr. Wilza Arantes Ferreira Peres
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Nutrição Josué de Castro
Banca examinadora

_____

Prof. Dr. Karla Rodrigues Miranda
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Revisora

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Neuza e Adilson, que sempre me incentivaram, apoiaram, e se esforçaram para eu poder chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser fonte de vida, sabedoria, amor, e pelo seu cuidado em todos os momentos da minha vida, me fortalecer e ser a luz que clareia o meu caminho.

À minha mãe Neuza Cunha, por tanto amor, dedicação e suporte, por ser a melhor mãe e amiga que eu poderia ter, a sua bondade e exemplo me inspiram a ser melhor a cada dia.

Ao meu pai Adilson Figueiredo, por todo amor e apoio, e ser meu melhor amigo, que sempre me incentivou a evoluir, e lutar pelos meus sonhos.

A minha família, que é a minha base, o meu muito obrigada por todo amor, incentivo, e compreensão nos meus momentos de ausência devido a dedicação a tese. Com destaque para os meus tios Edileuza, Deusa, e Mizael que estão sempre presentes.

Agradeço aos meus avós Astrodêmia, Paulo, e Augustinho, que descansam em paz, e a minha avó Júlia por todo carinho. Ao meu avô Enedino, em memória, por todo amor e cuidado, que foi também como um pai para mim.

A minha irmã, e primos-irmãos, Lara, Mariane, Renata, Rafael e Tatiana, que também são grandes amigos, e tornam os encontros da família mais leves e divertidos.

Agradeço também ao meu cachorro Lucky, que faleceu no último mês do meu doutorado, por ser tão companheiro e amoroso nesses mais de 14 anos que ficou ao nosso lado.

A minha *soul sister*, Vanessa Moreira, amiga de todos os momentos, o seu bom coração, criatividade e sabedoria me permitem crescer a cada dia.

Ao caríssimo Pedro Pimentel, pelo apoio, incentivo e parceria tão especial, que permitiu que o período da pandemia fosse menos difícil, e repleto de *jazz*.

Aos meus queridos amigos do ensino médio e graduação, representados principalmente pela Beatriz Moraes, Valeria Costa, Maylin Lopes e Henrique Marcondes.

As amigas Larissa Marques, Lohanny Pinheiro e Bruna Araújo, por me aproximarem de Deus, pelas orações em um momento tão delicado da minha vida.

As minhas grandes amigas Ana Lorena e Lissandra Amorim, pela parceria, incentivo e inspiração A amizades e apoio de vocês fizeram toda a diferença e deixaram os meus dias mais iluminados.

A minha dupla do doutorado, Monica Batalha, pelo apoio, conselhos, e amizade tão bonita que construímos ao longo dessa jornada. A sua amizade, calmaria e “morri de sorrir” (rs) deixaram o doutorado mais leve e feliz.

A Nathalia Costa, que vi “crescer” desde a iniciação científica (Rs), pela amizade e parceria nesse tema tão complexo e desafiador de microbiota intestinal.

A minha “mãe”, Thais Rangel, pela parceria, generosidade e ser uma inspiração como pesquisadora.

A Marina Padilha por todo aprendizado com as análises de microbiota, e suporte para a elaboração da tese. Por mais que a gente (ainda) não se conheça pessoalmente, construímos uma relação profissional e pessoal com muito carinho.

Ao meu querido orientador Gilberto Kac, pela sua sabedoria, competência, e dedicação que me inspiram desde o mestrado. Agradeço também pelo apoio nos momentos difíceis. Sou muito grata pelos seus ensinamentos, e oportunidades preciosas que foram essenciais para a minha formação e amadurecimento como pesquisadora.

A equipe do projeto MILQ “*The Mothers, Infants and Lactation Quality”,* pela convivência e tantas trocas de saberes desde o planejamento do projeto às atividades de campo, e limpeza de dados. Em especial a Érica Barros, Daniela Mucci, e Livia Belcastro pela parceria durante as intensas jornadas de trabalho.

A todos os colegas do Observatório de Epidemiologia Nutricional, que é o melhor grupo de pesquisa que eu poderia ter. Vocês fizeram o meu dia a dia mais divertido e produtivo.

Ao professor Brent Williams, pelas análises da microbiota intestinal, orientação e disponibilidade para discussões intensas e semanais das análises da microbiota.

Ao professor Lars Bode, pelas análises dos oligossacarídeos do leite humano, e pelas considerações para a realização desse trabalho.

A professora Karla Rodrigues, pelas suas contribuições para esse trabalho desde a qualificação, e por ter aceitado o convite de ser a revisora dessa tese.

A professora Carla Taddei, pelas considerações, e suporte desde a qualificação, e ter aceitado fazer parte da banca examinadora da tese.

Ao professor Júlio Daleprane pela disponibilidade e ter aceitado o convite de ser membro da banca examinadora da tese.

As professores Patrícia Padilha e Wilza Peres por terem sido professoras incríveis, que contribuíram para a minha formação desde a graduação, e por aceitarem fazer parte da minha banca de defesa da tese do doutorado. Também agradeço as professoras suplentes Elisa Lacerda e Márcia Soares da Mota, que também foram muito importantes para a minha formação desde a graduação.

A todos as mães e seus filhos por fazerem parte desse estudo, pela confiança, aprendizados e disponibilidade durante esse período.

Aos funcionários da clínica família Assis Valente, pela colaboração na realização desse estudo.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Nutrição Josué de Castro, por todos os ensinamentos e convivência desde 2009, quando iniciei a graduação.

Por fim, agradeço a todos os colegas, professores e alunos que puderam contribuir de alguma forma para eu me tornar um profissional, e ser humano melhor.

Amanda Figueiredo

EPÍGRAFE

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria “.

Paulo Freire.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência de aleitamento materno em crianças brasileiras segundo pesquisas nacionais. 28

Figura 2. Composição e estrutura geral dos oligossacarídeos do leite humano. 30

Figura 3. Fenótipos de composição de oligossacarídeos do leite humano. 31

Figura 4. Funções dos oligossacarídeos do leite humano no trato gastrointestinal de lactentes. 34

Figura 5. Classificação taxonômica das principais bactérias identificadas no trato gastrointestinal humano adulto. 36

Figura 6. Fluxograma do estudo. 63

Figura 7. Fluxograma de coleta e armazenamento das amostras de fezes infantil. 66

Artigo 1

Figura 1. Fluxorama do estudo.
Flowchart of the study. 96

Figura 2. Perfil de oligossacarídeos do leite humano de acordo com *hierarquical clusters*.
Human Milk Oligosaccharides profile according to hierarchical clusters. 98

Figura 3. Abundância relativa dos filos e gêneros mais abundantes identificados na microbiota intestinal infantil.
Relative abundance of the most abundant bacterial phyla and genera identified in infant gut microbiota at one month of age. 99

Figura 4. Associação entre o status secretor materno e alfa e beta diversidade da microbiota intestinal infantil.
Associations of maternal secretor status with alpha and beta diversity of the infant gut microbiota. 102

Figura 5. Associação entre os *clusters* de Oligossacarídeos do Leite humano com a alfa e beta diversidade da microbiota intestinal entre mulheres secretoras
Associations of Human Milk Oligosaccharides clusters with alpha and beta diversity of the infant gut microbiota among secretor women. 104

Figura 6. Abudância relativa da microbiota intestinal entre filhos de mães com diferentes perdis de oligossacarídeos do leite humano e entre secretoras e não secretoras.
Relative abundance of bacterial taxa in the infant gut microbiota among infants from mothers with different Human Milk Oligosaccharides profiles and between mothers with secretor and non-secretor status. 106

Figura 7. *Heatmap* com as associações significativas entre os filos e gêneros da microbiota e concentrações de oligossacarídeos do leite humano
Heatmap summarizing the significant associations between microbial taxa at phylum and genus levels and Human Milk Oligosaccharides concentration between secretor women. 108

Artigo 2

Figura 1. Fluxograma do estudo.
Flow diagram of the study 129

Figura 2. Abundância relativa dos 10 principais bacterias identififcadas na microbiota intestinal infantil em um mês de idade.
Relative abundance of the top 10 bacterial taxa identified in the infant gut microbiota at one month of age. 131

Figura 3. Associações significativas entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil com um, seis e doze meses de vida.
S*ignificant associations between microbial taxa at genus level and infant development at one, six, and twelve months of the life* 136

Figura 4. Associações significativas entre a microbiota intestinal e o crescimento infantil com um, seis e doze meses de vida.
Significant associations between microbial taxa at genus level and infant growth at one, six, and twelve months of life. 137

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação das práticas de aleitamento materno 27

Q**uadro 2**. Características gerais dos estudos que avaliaram a associação entre oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil. 43

Q**uadro 3**. Principais resultados dos estudos que avaliaram a associação entre oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil. 45

Quadro 4. Características gerais dos estudos que avaliaram a associação entre a microbiota intestinal e o crescimento infantil. 50

Quadro 5. Principais resultados dos estudos que avaliaram a associação entre o a microbiota intestinal e o crescimento infantil. 52

Quadro 6. Características gerais dos estudos que avaliaram a associação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil. 55

Quadro 7. Principais resultados dos estudos que avaliaram a associação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil. 57

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Características das mães e crianças de acordo com os *clusters* maternos de oligossacarídeos do leite humano.
Characteristics of mother-infant pairs according to maternal human milk oligosaccharides cluster 100

Tabela 2. Associação entre as concentrações individuais de oligossacarídeos do leite humano e a beta diversidade da microbiota intestinal infantil.
Associations between individual human milk oligosaccharides concentrations and beta diversity of infant gut microbiota among secretor women. 109

Tabela Suplementar 1. Associação entre as concentrações individuais de oligossacarídeos do leite humano e a abundância da microbiota intestinal infantil entre mulheres secretoras.
Associations between human milk oligosaccharides concentration and bacterial taxa present in the infant gut microbiota among secretor women. 110

Artigo 2

Tabela 1. Características das mães e crianças incluídas no estudo.
Characteristics of mother-child pairs included in the study. 130

Tabela 2. Associação entre a alfa diversidade da microbiota intestinal e o crescimento infantil ao longo do primeiro ano de vida.
Association between alpha-diversity of infant gut microbiota and infant growth throughout the first year of life. *132*

Tabela 3. Associação entre a alfa diversidade da microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil ao longo do primeiro ano de vida.
Association between alpha-diversity of infant gut microbiota and infant development throughout the first year of life. *133*

Tabela 4. Associação entre a beta diversidade da microbiota intestinal e o crescimento infantil.
Association between beta-diversity of infant gut microbiota and infant growth. *134*

Tabela 5. Associação entre a beta diversidade da microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil.
Association between beta-diversity of infant gut microbiota and infant development. *135*

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro 157

Anexo 2. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Escola – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 158

Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 159

A**nexo 4**. Questionários, protocolo de coleta de leite humano e de fezes da criança (online). 161

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ASQ-3	*Age and Stages Questionnaire*
ASV	*Amplicon sequence variants*
AM	Aleitamento Materno
AME	Aleitamento Materno Exclusivo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DFLac	Difucosilactose
DFLNH	Difucosilacto-N-hexaose
DFLNT	Difucosilacto-N-tetrose
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOHaD	*Developmental Origins of Health and Disease*
DSLNH	Disiaililacto-N-hexaose
DSLNT	Disiailacto-N-tetraose
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FDR	*False Discovery Rate*
FDSLNH	Fucosil-disialacto-N-hexaose
FLNH	Fucosilacto-N-hexaose
FUT2	Fucosiltransferase-2
FUT3	Fucosiltransferase-3
HMO	*Human Milk Oligosaccharides*
IGF I	*Insulin Growth Factor I*
IMC	Índice de Massa Corporal
IOM	*Institute of Medicine*
IGF	*Insulin-like Growth Factor*
MI	Microbiota Intestinal
LDFT	Lacto-difucotetraose
LEfSe	*Linear discriminant analysis Effect Size*
LME	*Linear mixed effects*
LNDFH	Lacto-N-difucohexaose

LNFP	Lacto-N-fucopentaose
LNH	Lacto-N-hexaose
LNnT	Lacto-N-neotetraose
LNT	Lacto-N- tetrose
LSTb	Sialil-lacto-N-tetraose b
LSTc	Sialil-lacto-N-tetraose c
MaAsLin	Modelos lineares multivariados para associação do microbioma
MFLNH	Monofucosyllacto-N-hexaose
MI	Microbiota intestinal
NA	Não se aplica
OLH	Oligossacarídeos do Leite Humano
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTU	*Operational taxonomic units*
PERMANOVA	*Permutational multivariate analysis of variance*
PCoA	*Principal Coordinates Analysis*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
QIIME	*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*
REDCap	*Research Electronic Data Capture*
RNA	*Ribonucleic acid*
SNPs	*Single Nucleotide Polymorphisms*
SUS	Sistema Único de Saúde
TFLNH	Trifucosilacto-N-hexaose
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
2'FL	2'-fucosilactose
3FL	3-fucosilactose
3'SL,	3'-sialilactose
6'SL	6'-sialilactose

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO **19**
RESUMO **21**
ABSTRACT **23**
1. INTRODUÇÃO **25**
2. REFERENCIAL TEÓRICO **27**
2.1 Aleitamento materno 27
2.2 Composição do leite humano 29
2.2.1 Oligossacarídeos do leite humano 30
2.3 Microbiota intestinal infantil 35
2.4 Associação entre os oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil 39
2.5 Crescimento e desenvolvimento infantil 47
2.6 Associação entre a microbiota intestinal infantil e o crescimento e desenvolvimento infantil 49
3. JUSTIFICATIVA **59**
4. HIPÓTESES **60**
5. OBJETIVOS **61**
5.1 Objetivo geral 61
5.2 Objetivos específicos 61
5.2.1 Artigo 1 61
5.2.2 Artigo 2 61
6. METODOS **62**
6.1 Desenho do estudo 62
6.2 Local do estudo 62
6.3 Amostra do estudo 62
6.4 Treinamento e estudo piloto 64
6.5 Coleta e gerenciamento dos dados 64
6.6 Variáveis do estudo 64
6.6.1 Leite humano 64
6.6.2 Fezes infantil 65
6.6.3 Crescimento infantil 68
6.6.4 Desenvolvimento infantil 68
6.6.5 Covariáveis 69
6.7 Análise estatística 70

7. RESULTADOS 72
7.1 Artigo 1 73
7.2 Artigo 2 112
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS 138
9. REFERÊNCIAS 140
10. ANEXOS 157

APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado faz parte de um estudo maior intitulado ‘Compostos bioativos do leite humano e associação com a saúde materna e o desenvolvimento infantil’. Esse projeto foi realizado pelos pesquisadores do Observatório de Epidemiologia Nutricional do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e coordenado pelo Professor Gilberto Kac. O desenho do estudo consiste em uma coorte prospectiva de acompanhamento de mães e seus filhos, desde o terceiro trimestre gestacional até os doze meses de vida da criança, realizado na Clínica da Família Assis Valente, no município do Rio de Janeiro. O recrutamento ocorreu entre fevereiro de 2017 e abril de 2019 e a coleta de dados foi concluída em janeiro de 2020.

O objetivo dessa tese de doutorado foi avaliar a associação entre os oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil, e verificar a associação entre a microbiota intestinal com o crescimento e desenvolvimento infantil até os doze meses de vida da criança. Como aluna de doutorado, participei das atividades do projeto desde o planejamento, elaboração dos questionários, treinamentos, coleta e análises dos dados. Houve a concessão de uma bolsa de doutorado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

O estudo principal foi financiado pelo edital 46/2014 do Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, pelo edital 01/2016 da chamada Universal do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela chamada 12/2017 de Bolsa de Produtividade em Pesquisa do CNPq e pelo edital 02/2017 do Programa Cientista do Nosso Estado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). As análises dos oligossacarídeos do leite humano foram realizadas pela equipe coordenada pelo Professor Lars Bode da Universidade de San Diego, na Califórnia, Estados Unidos. As análises da microbiota das fezes do lactente foram realizadas pelo Professor Brent Williams do *Center for Infection and Immunity* da Universidade de Columbia, Nova Iorque, Estados Unidos. Essas análises foram financiadas por dois editais da *Columbia University: Calderone Award for Junior Faculty* (2017) e *Dean’s Interdisciplinary Research Pilot Award* (2018) dos quais a equipe do observatório de Epidemiologia Nutricional fez parte.

A tese está organizada de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas e está estruturado nas seguintes seções: resumo, *abstract*, introdução, revisão da

literatura, justificativa, hipóteses, objetivos, métodos, resultados, considerações finais, referências e anexos.

A seção de resultados e discussão foram apresentadas no formato de dois artigos científicos. O primeiro artigo é intitulado *"Associations between human milk oligosaccharides and infant gut microbiota in healthy Brazilian infants at one month of age"/* Associação entre oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil em crianças brasileiras saudáveis com um mês de idade*',* e será submetido em breve na revista científica mBio. O segundo artigo intitula-se *"Association between infant gut microbiota and infant growth and development: Brazilian cohort throughout the first year"*/ "Associação entre a microbiota intestinal infantil com o crescimento e desenvolvimento infantil: Coorte brasileira ao longo do primeiro ano", com previsão de submissão em revista científica após as considerações da banca de defesa do doutorado.

RESUMO

FIGUEIREDO, Amanda Caroline Cunha. **Associação entre os oligossacarídeos do leite humano, a microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil: estudo prospectivo nos primeiros doze meses de idade.** Rio de Janeiro, 2021. Tese (Doutorado em Ciências Nutricionais) - Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021

Os oligossacarídeos do leite humano (OLHs) são importantes compostos bioativos e podem estar associados com a microbiota intestinal (MI) infantil, e estudos recentes investigaram a associação entre MI e o adequado crescimento e desenvolvimento infantil. Os objetivos deste estudo foram: estimar a associação entre os OLHs e a MI infantil, e verificar a associação entre a MI com o crescimento e o desenvolvimento infantil até os doze meses de idade. Uma coorte prospectiva foi realizada no município do Rio de Janeiro, Brasil, com mães e seus filhos acompanhados entre 28-35 semanas gestacionais (linha de base) e quatro ondas de seguimentos: 2-8 dias (visita 1), 28-50 dias (visita 2), seis meses (visita 3) e doze meses (visita 4). Amostras de leite humano e fezes infantil foram coletadas na visita 2. OLHs foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. Análises de *clusters* hierarquizados foram realizadas para identificar grupos de mulheres de acordo com o perfil de OLHs. A MI foi sequenciada a partir da amplificação do gene 16S rRNA. O crescimento infantil foi avaliado por meio do escore z dos índices peso/idade, comprimento/idade e IMC/idade. O ganho de peso rápido foi classificado pela diferença entre o escore z do peso/idade > 0,67 entre as visitas 2-3 e as visitas 2-4. O desenvolvimento infantil foi avaliado pela escala '*Ages and Stages Questionnaire'* (ASQ-BR). As avaliações antropométricas e de desenvolvimento infantil foram realizadas nas visitas 2, 3 e 4. Os gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Clostridium* e a família *Enterobacteriaceae* foram os mais predominantes na MI infantil. Foram identificados três *clusters* de acordo com o perfil de OLH: *cluster* 1, que incluiu as mães não secretoras e os *clusters* 2 e 3, contendo as secretoras. O *cluster* 1 apresentou menor abundância de *Bacteroides* e *Bifidobacterium*, e maior abundância de *Proteus* em comparação com os *clusters* 2 e 3. LNnT e DFLac foram diretamente associados com *Bifidobacterium*, enquanto LNH, e FLNH foram diretamente associados com *Akkermansia*. Crianças classificadas com ganho de peso rápido (1-6 meses) apresentaram maior abundância de *Enterococcus* e *Proteus* em comparação com aquelas com ganho de peso adequado. Houve associação entre a abundância de *Coprococcus*, *Eubacterium* e escore de coordenação motora fina com 1 mês de

vida, e esse domínio de desenvolvimento infantil com 6 meses também foi associado a maior abundância de *Sutterella.* A alfa diversidade (índice Chao1) da MI foi diretamente associada ao menor escore de coordenação motora fina ao longo do primeiro ano de vida da criança. A beta diversidade (*Unweighted UniFrac*) também foi associada com esse domínio com 1 mês de vida. Conclui-se que o *status* secretor foi associado com maior abundância de bactérias relevantes para saúde da criança, como *Bifidobacterium*, enquanto o perfil de OLH entre os *clusters* de mães secretoras foi associado com menor abundância de bactérias da MI. Houve associações relevantes entre as concentrações individuais de OLHs e a maior abundância de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* e *Akkermansia.* A MI no início da vida foi associada com o crescimento e o desenvolvimento infantil, principalmente em relação ao ganho de peso rápido e o domínio de coordenação motora fina.

Palavras-chave: aleitamento materno, leite humano, oligossacarídeos, microbiota intestinal infantil, desenvolvimento infantil, crescimento infantil.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Amanda Caroline Cunha. **Associação entre os oligossacarídeos do leite humano, a microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil: estudo prospectivo nos primeiros doze meses de idade.** Rio de Janeiro, 2021. Tese (Doutorado em Ciências Nutricionais) - Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021

Human milk oligosaccharides (HMO) are important bioactive compounds associated with infant gut microbiota (GM), and recent studies observed the association between GM and adequate infant growth and development. The main goals of the study were to estimate the association between HMOs and infant GM, and to evaluate the association between infant GM and infant growth and development throughout the first year of life. Prospective cohort was conducted at Rio de Janeiro, Brazil, with mother-infant dyads with 28-35 gestational weeks (baseline) and four follow-ups: 2-8 days (visit 1), 28-50 days (visit 2), six months (visit 3) and twelve months (visit 4) after birth. Milk samples and infant stool were collected at visit 2. HMOs were quantified using liquid chromatography with fluorescence detection. HMO hierarchical clustering analysis was performed to identify groups of women based on their HMO profile. Infant GM was evaluated using the amplification of the bacterial 16S rRNA gene. Infant growth was evaluated using the weight/age, length/age, and BMI/Age z score. Rapid infant growth was defined as a weight/age z score > 0.67 between visits 2-3 and 2-4. The infant development was evaluated by Age and Stages Questionnaire scale translated to Portuguese (ASQ-BR). Anthropometric and infant development were assessed at visits 2, 3, and 4. Infant GM was characterized by *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Clostridium* genus, and *Enterobacteriaceae* family. Three HMO clusters were identified: cluster 1, non-secretor women; clusters 2 and 3 both based on secretor women. HMO cluster 1 had a lower relative abundance of *Bacteroides* and *Bifidobacterium* and a higher relative abundance of *Proteus* than clusters 2 and 3. LNnT and DFLac were positively associated with the *Bifidobacterium* genus, and LNH and FLNH were positively associated with *Akkermansia*. Infants with rapid growth (1-6months) had a higher relative abundance of *Enterococcus* and *Proteus* in GM than those with adequate growth. Positive associations were found between the abundance of *Eubacterium* and *Coprococcus* with the fine motor skills score at one month. This same domain at six months was also associated with a higher abundance of *Sutterella.* Alpha diversity (Chao1 index) was positively associated with fine motor skills scores throughout the first year of life. Beta diversity

(Unweighted UniFrac) was associated with this same domain at one month. In conclusion, secretor status substantially impacts the composition of the infant GM, affecting the relative abundance of important bacterial taxa associated with infant health, such as *Bifidobacterium*. In contrast, HMO differences among secretor women were responsible for few changes in the infant GM composition.There were relevant associations between the individual concentrations of OLHs and a higher abundance of beneficial bacteria, such as *Bifidobacterium* and *Akkermansia*. Infant GM in early life was associated with infant growth and development, mainly rapid infant growth, and the fine motor skills score.

Keywords: breastfeeding, human milk, infant gut microbiota, infant development, infant growth.

1. INTRODUÇÃO

A teoria da origem desenvolvimentista da saúde e doença (DOHaD) investiga a influência da exposição a fatores ambientais no início da vida e seu impacto a curto e longo prazo, como em relação às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (BARKER, 2007). De fato, os primeiros mil dias de vida, período que compreende a concepção e os dois anos de vida da criança, são uma janela crítica com maior vulnerabilidade para a saúde a curto e longo prazo (HEINDEL; VANDENBERG, 2015; BELUSKA-TURKAN *et al.*, 2019; DARLING *et al.*, 2020). Dessa forma, a nutrição adequada nos primeiros meses de vida é um dos principais fatores que deve ser avaliado e promovido para permitir que o potencial de crescimento e o desenvolvimento infantil seja alcançado (HEINDEL; VANDENBERG, 2015; BELUSKA-TURKAN *et al.*, 2019; PERRELLA *et al.*, 2021). Nessa direção, estudos sobre o aleitamento materno e os componentes do leite humano são muito relevantes para a saúde pública (OMS, 2003; BALLARD; MORROW; 2013; VICTORA *et al.*, 2016).

O leite materno é o alimento ideal para o lactente, pois fornece nutrientes, microrganismos e compostos bioativos que são necessários para o seu adequado crescimento e desenvolvimento (BALLARD; MORROW, 2013; ORCZYK-PAWIŁOWICZ; LIS-KUBERKA, 2020). Entre esses compostos bioativos, os oligossacarídeos do leite humano (OLHs) estão sendo investigados pelos benefícios para a saúde do lactente, como em relação à modulação da microbiota intestinal (MI) nos primeiros meses de vida (JOST *et al.*, 2015; KORPELA *et al.*, 2018; LACKEY *et al.*, 2019; ORCZYK-PAWIŁOWICZ; LIS-KUBERKA, 2020).

Os OLHs constituem o terceiro componente sólido mais abundante do leite humano (BODE, 2012; CHEN, 2015) e são considerados prebióticos, ou seja, podem atuar como substrato para microrganismos hospedeiros, conferindo benefícios à saúde (GIBSON *et al.*, 2017). Estudos *in vitro* destacam que os OLHs podem estar associados à maior abundância de bactérias com potencial benéfico e inversamente associados à abundância de bactérias patogênicas (BODE, 2012; JOST *et al.*, 2015; CHEN, 2015). Contudo, existem poucos estudos em humanos que investigaram essa associação entre os OLHs e a MI infantil (WANG *et al.* 2015; KORPELA *et al.*, 2018; BAI *et al.*, 2018; BOREWICZ *et al.*, 2019; BOREWICZ *et al.*, 2020).

A MI desempenha um papel importante nos primeiros dias de vida, pois promove o desenvolvimento do sistema imunológico e tem um papel fundamental na fisiologia e regulação intestinal (MARCHESI *et al.*, 2016; TAMBURINI *et al.*, 2016; ROBERTSON *et al.*, 2019).

Por outro lado, a disbiose intestinal, que consiste no desequilíbrio na composição e função da MI, pode estar associada à ocorrência de desfechos desfavoráveis, como a doença inflamatória intestinal, asma, alergias, doenças autoimunes e obesidade (RODRÍGUEZ *et al.*, 2015; MARCHESI *et al.*, 2016; TAMBURINI *et al.*, 2016).

Além disso, evidências sugerem que a MI pode estar associada aos indicadores antropométricos e ao desenvolvimento infantil (GOULET, 2015; KOZYRSKYJ *et al.*, 2016; ROBERTSON *et al.*, 2019). O crescimento e desenvolvimento adequados no início da vida podem apresentar grande impacto na saúde física, mental, e no bem-estar em curto e longo prazo, e estão associados ao desenvolvimento social e econômico em todo o mundo (MONTEIRO; VICTORA, 2005; SHONKOFF *et al.*, 2012; OMS, 2020). Dessa forma, a avaliação de fatores que podem estar associados com o crescimento e desenvolvimento infantil inadequados durante o período crítico dos primeiros meses de vida é de grande relevância para a saúde pública (RICHTER *et al.*, 2020). No entanto, pesquisas que investigam a associação entre a MI e o crescimento e desenvolvimento infantil são escassas e os mecanismos ainda não foram completamente esclarecidos (SCHEEPERS *et al.*, 2015; IGNACIO *et al.*, 2016; STANISLAWSKI *et al.*, 2018; KAMNG'ONA *et al.*, 2019).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aleitamento materno

O aleitamento materno é um processo natural e uma estratégia segura, eficaz e econômica de vínculo afetivo, proteção e nutrição com impacto a curto e longo prazo na saúde materno-infantil (BRASIL, 2009; BALLARD; MORROW, 2013; VICTORA *et al.*, 2016; PERRELLA *et al.*, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que o aleitamento materno se inicie assim que possível e de forma exclusiva até os seis meses de idade. Em seguida, o aleitamento materno deve ser complementado com outros alimentos até pelo menos os dois anos de vida da criança (OMS, 2018). As classificações do tipo de aleitamento materno estão descritas no **Quadro 1**.

Quadro 1. Classificação das práticas de aleitamento materno.

Tipo de aleitamento materno	Definição
Aleitamento materno	LH direto da mama ou ordenhado, independente de receber outros alimentos.
Aleitamento materno exclusivo	Somente LH, direto da mama ou ordenhado, ou LH de outras fontes, sem outros líquidos ou sólidos, com exceção de gotas ou xaropes contendo vitaminas, sais de reidratação oral, suplementos minerais ou medicamentos.
Aleitamento materno predominante	Além do LH, água ou outras bebidas à base de água (água adocicada, chás, infusões), sucos de frutas e fluídos rituais.
Aleitamento materno misto ou parcial	Leite materno e outros tipos de leite, como de vaca, cabra, e etc.
Aleitamento materno complementado	Além do LH, qualquer alimento sólido ou semissólido com a finalidade de complementá-lo e não de substituí-lo. O recebimento de outro tipo de leite, como o leite de vaca, por exemplo, não é classificado como alimento complementar.

Fonte: Ministério da Saúde (BRASIL, 2009).
Nota: LH= leite humano

A interrupção precoce do aleitamento materno gera custos de US$ 1,1 bilhão de dólares por ano em todo o mundo, considerando o seu impacto na saúde materna e infantil (WALTERS *et al.* 2019). Estima-se que a ampliação do aleitamento materno em níveis mundiais poderia prevenir 823 mil mortes anuais em crianças menores de dois anos (VICTORA *et al.*, 2016). Esse fato é devido à composição do leite humano e benefícios do aleitamento materno para a saúde da criança, como o melhor desenvolvimento cognitivo, proteção contra o excesso de peso e diabetes mellitus, e redução do risco de morte por diarreia e infecção

respiratória (OMS, 2003; BALLARD; MORROW, 2013; DIETERICH *et al.*, 2013; VICTORA *et al.*, 2016).

A prevalência de mundial de aleitamento materno exclusivo (AME) em crianças menores de seis meses aumentou de 35,4 em 2000 para 48,6 em 2019 (NEVES *et al.*, 2021). No Brasil, essa prevalência mudou de 2,9% em 1986 para 45,7% em 2019 (UFRJ, 2020), como revelado na **Figura 1**. Apesar desse aumento, a meta de prevalência de AME é de pelo menos 70% em menores de seis meses até 2030, de acordo com o *Comprehensive implementation plan on maternal, infant and young child nutrition* (OMS, 2017). Dessa forma, aumentar a prevalência de crianças em aleitamento materno, especialmente de forma exclusiva, ainda é um desafio para a saúde pública.

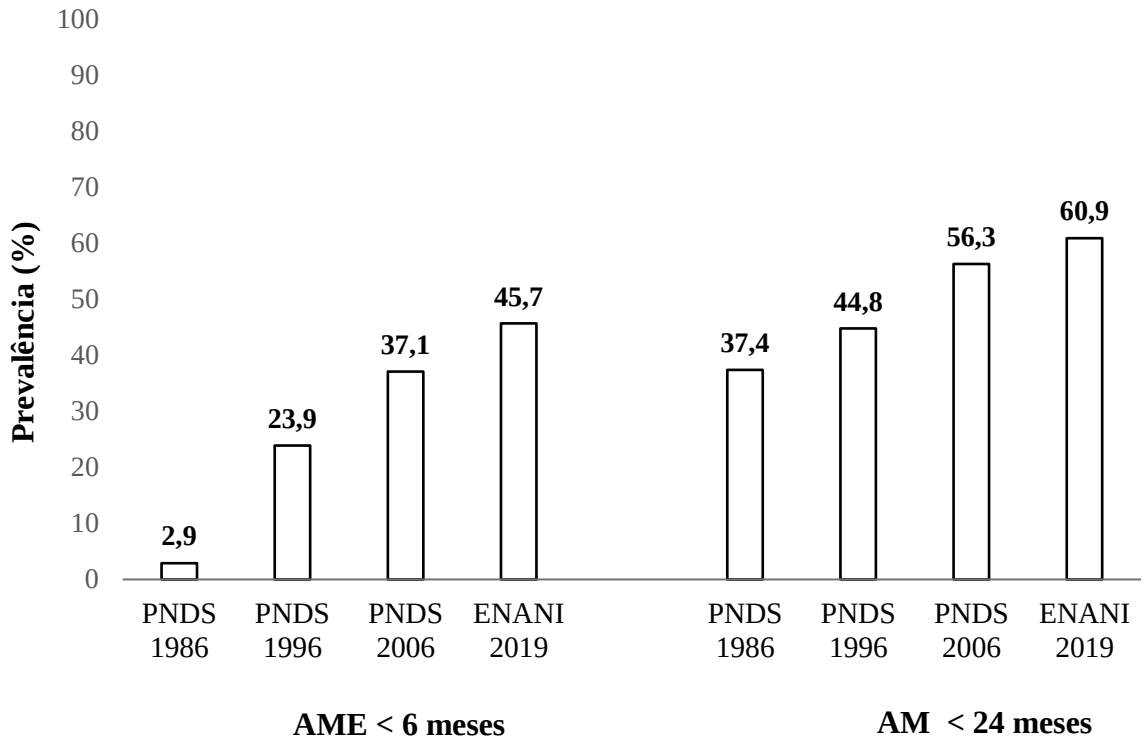

Figura 1. Prevalência de aleitamento materno em crianças brasileiras segundo pesquisas nacionais.
Fonte: Adaptado dos resultados preliminares do 'Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI)-2019 (UFRJ, 2020).
Nota: AME: Aleitamento materno exclusivo; AM: Aleitamento materno; PNDS: Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde.

O Brasil é reconhecido internacionalmente pelas políticas públicas de proteção, promoção e apoio ao aleitamento materno, que se iniciaram em 1981 com o Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (BRASIL, 1991). Desde então, diversas ações nessa área foram implementadas pelas esferas de gestão do Sistema Único de Saúde (SUS), com a participação da sociedade civil e científica. Atualmente, estão em vigor e se destacam a Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactantes (1988), a Iniciativa Hospital Amigo da Criança (1992), as normas sanitárias para o funcionamento de Bancos de Leite Humano (1998) e a Estratégia Alimenta e Amamenta Brasil (2013). Essas políticas públicas são fundamentais para a garantia do direito humano a alimentação adequada, com o fornecimento de importantes nutrientes e compostos bioativos presentes para o lactente (BRASIL, 2017).

2.2 Composição do leite humano

O leite humano apresenta quantidades adequadas de macro e micronutrientes, e compostos bioativos, como imunoglobulinas, fatores de crescimento, interleucinas, hormônios, lactoferrina, microrganismos benéficos e oligossacarídeos. Dessa forma, é considerado o alimento padrão-ouro para a nutrição infantil nos primeiros meses de vida (BALLARD; MORROW; 2013; GILA-DIAZ *et al.*, 2019).

O leite humano apresenta composição dinâmica e capaz de variar de acordo com a idade e necessidades da criança (BALLARD; MORROW, 2013; BOUDRY *et al.*, 2021). Dessa forma, o leite humano é definido como colostro até quatro dias após o parto, o qual apresenta volume reduzido e, apesar de apresentar baixa concentração de lactose, é rico em compostos imunológicos, como imunoglobulina IgA secretora, lactoferrina e leucócitos. Neste período o leite humano destaca-se pelo seu importante papel para o sistema imunológico do lactente (BALLARD; MORROW, 2013).

Entre cinco e 14 dias após o parto ocorre o leite de transição, que apresenta composição imunológica semelhante ao colostro, mas com maior volume e concentrações de carboidrato e gordura. A partir de 15 dias, o leite materno é definido como maduro, apresentando maior volume e concentrações de gordura e lactose (BALLARD; MORROW, 2013; BOUDRY *et al.*, 2021). Outros componentes do leite humano, como OLHs também podem variar de acordo com o período de lactação, com maior concentração no colostro e menor no leite maduro.

2.2.1 Oligossacarídeos do leite humano

Os OLHs são definidos como glicanos complexos e não conjugados, que podem ser encontrados como os monossacarídeos: glicose, galactose, N-acetilglucosamina, fucose, e ácido siálico (BODE, 2012; CHEN, 2015). Essas moléculas são o terceiro componente sólido mais abundante do leite humano, após a lactose e os lipídios (BODE, 2012; CHEN, 2015). Os OLHs podem ser encontrados na sua forma livre ou ligados a proteínas (glicoproteínas) e lipídios (glicolipídios). Todas as estruturas de OLHs apresentam uma molécula de lactose e, assim, é provável que a sua biossíntese pela glândula mamária seja realizada por meio da extensão desse carboidrato (BODE, 2012; CHEN, 2015). Os OLHs podem ser classificados como ácidos ou neutros, de acordo com a presença ou não de ácido siálico na sua estrutura. Por sua vez, os OLHs neutros podem ser encontrados em duas formas: fucosilados ou não fucosilados (**Figura 2**) (SPRENGER; BAUMGARTNER; ALBERMANN, 2017).

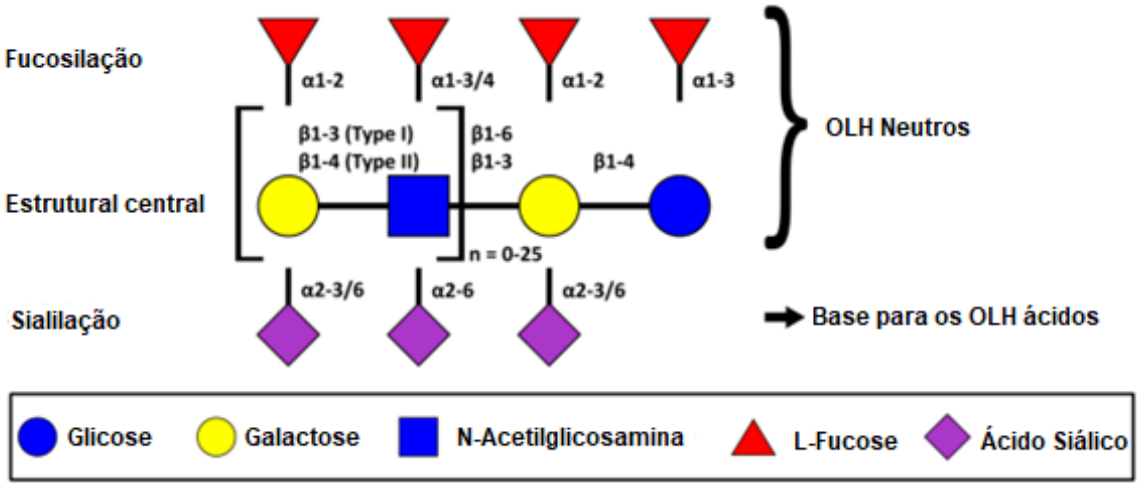

Figura 2. Composição e estrutura geral dos oligossacarídeos do leite humano.
Fonte: Adaptado de Sprenger, Baumgartner, Albermann. (2017).
Nota: OLH: Oligossacarídeos do leite humano.

As concentrações de OLHs são muito maiores do que as de outros mamíferos e apresentam maior complexidade e diversidade. Até o momento foram identificadas mais de 150 estruturas diferentes de OLHs no leite humano, que apresentam tamanhos e funções distintas (NINONUEVO *et al.*, 2006; BODE, 2012; CHEN, 2015). No entanto, aproximadamente 90% dessas frações de OLHs são compostas por cerca de 20 diferentes estruturas representativas (BODE, 2019). Em um estudo de revisão sistemática com 21 artigos selecionados, Thurl e

colaboradores (2017) relataram trifucosilacto-N-hexaose (TFLNH), 2'fucosilactose (2'-FL), difucosilacto-N-hexaose (DFLNH) II, e lacto-N-fucopentaose (LNFP I) como os OLHs neutros mais abundantes. Já o 6'-sialilactose (6'-SL) foi descrito como o OLH ácido mais abundante.

As concentrações de OLHs podem variar principalmente de acordo com a idade gestacional ao nascimento, estágio da lactação e fatores genéticos (BODE, 2012; MCGUIRE *et al.*, 2017; THURL *et al.*, 2017; AZAD *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2020). Estudos recentes observaram que o leite humano de mães de recém-nascidos prematuros apresenta maiores concentrações de OLHs do que o leite de mães dos que nasceram a termo. Além disso, as concentrações de OLHs são maiores no colostro (20 a 25 g/L) do que no leite maduro (5 a 20 g/L) (BODE, 2012).

A variação de OLHs segundo fatores genéticos ocorre devido ao polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) nos genes secretor e de Lewis (BODE; JANTSCHER-KRENN, 2012). O gene secretor codifica a enzima fucosiltransferase-2 (FUT2) que, quando ativo, dá origem a elevadas concentrações de OLHs alfa 1-2 fucosilados, como 2'FL e o LNFP I. Mulheres que expressam a enzima FUT 2 são chamadas de secretoras, e as que não expressam essa enzima são classificadas como não secretoras. Além disso, o gene Lewis codifica a enzima a fucosiltransferase-3 (FUT3), que dá origem a OLHs alfa 1-4 fucosilados. Dessa forma, quatro genótipos de leite humano são possíveis, considerando o status secretor e a presença do gene Lewis (**Figura 3)** (BODE; JANTSCHER-KRENN, 2012).

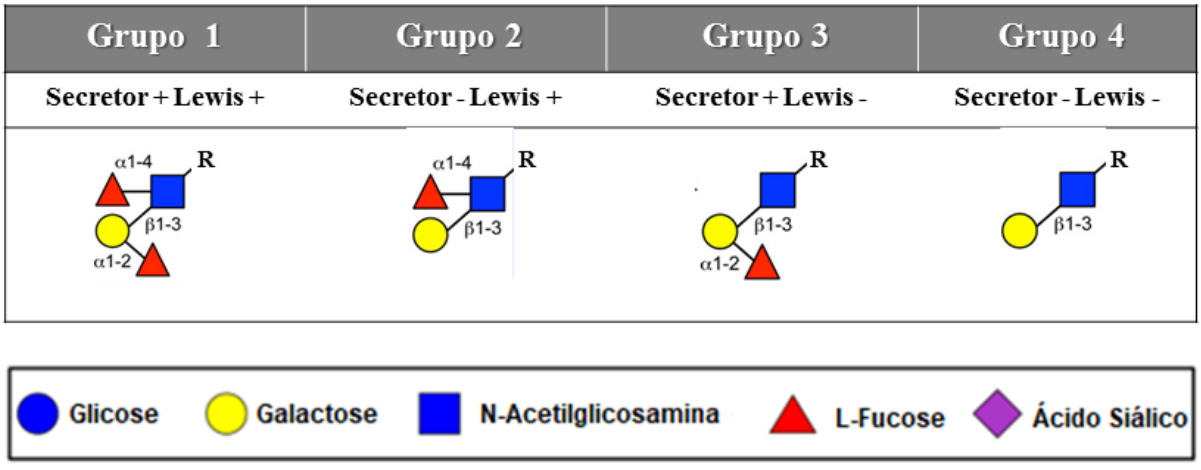

Figura 3. Fenótipos de composição de oligossacarídeos do leite humano.
Fonte: Adaptado de Bode; Jantscher-Krenn (2012).

Outras características modificáveis, como dieta e o estado nutricional materno podem influenciar as concentrações de OLHs. Contudo, a literatura sobre o tema é escassa, recente e

contraditória (MCGUIRE *et al.*, 2017; AZAD *et al.*, 2018; SAMUEL *et al.*, 2019; TONON *et al.*, 2019). Em uma recente revisão da literatura com 29 estudos, os autores descreveram que o período de lactação, índice de massa corporal (IMC) pré-gestacional, idade materna, tipo de parto, idade gestacional no nascimento e sexo da criança foram os principais fatores que poderiam estar associados com as concentrações de OLHs (HAN *et al.*, 2021).

Além disso, existem evidências de que o perfil de OLHs pode ser diferente de acordo com a localização geográfica (MCGUIRE *et al.*, 2017). Nesse sentido, estudos observaram que a prevalência de mulheres secretoras é maior em países da América Latina do que América do Norte, África e Ásia. (CASTANYS-MUÑOZ; MARTINS; PRIETO, 2013; MCGUIRE *et al.*, 2017; TONON *et al.*, 2021). No estudo multicêntrico internacional *INSPIRE*, realizado com 410 mulheres saudáveis da Espanha, Suécia, Peru, Estados Unidos, Etiópia, Gâmbia, Gana e Quênia, os autores observaram que a prevalência de mulheres secretoras variou de acordo com a região do estudo. A prevalência mais elevada de mulheres secretora foi observada no Peru (98%), e as mais baixas na Etiópia e Gambia (65%) (MCGUIRE *et al.*, 2017). Em um estudo transversal realizado em São Paulo com 78 mulheres entre 17 e 76 dias de pós-parto, os autores observaram a prevalência de 89,7 % de mães secretoras (TONON *et al.*, 2021).

Existem evidências de que a associação entre as concentrações de OLHs no início da vida seja importante para a saúde a curto e longo prazo, especialmente para o adequado crescimento e desenvolvimento infantil (WICIŃSKI *et al.*, 2020; BAI *et al.*, 2018). Alguns tipos de OLHs como o Disiailacto-N-tetraose (DSLNT) parecem ter um efeito protetor em relação à enterocolite necrosante (BODE, 2018; WICIŃSKI *et al.*, 2020). Doherty e colaboradores (2018), em estudo de revisão sistemática com 10 artigos, descreveram a importância da exposição a OLHs no início da vida em relação a redução do risco para diarreia, alergia à proteína do leite de vaca, doenças respiratórias e do trato gastrointestinal, além de redução do risco de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, durante o período de lactação. Esse fato ocorre devido as funções fisiológicas atribuídas aos OLHs, no qual as principais estão apresentadas na **Figura 4**.

Nesse sentido, aproximadamente 99% dos OLHs são resistentes ao pH ácido do estômago, bem como às enzimas pancreáticas. Assim, esses compostos não são digeridos e, podem atuar como importantes substratos para a fermentação por bactérias do trato gastrointestinal (BODE, 2012; THOMSON; MEDINA; GARRIDO, 2017; WALSH *et al.*, 2020). Essa fermentação resulta em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que, por sua vez, atuam como substrato energético para as células do epitélio intestinal, contribuindo, assim, para a sua integridade. Os OLHs também são importantes moduladores do sistema imune e

influenciam a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (THOMSON; MEDINA; GARRIDO, 2017; WALSH *et al.*, 2020). Os OLHs apresentam atividade antiaderente e antimicrobiana no epitélio intestinal, ao mimetizar receptores celulares glicanos e, consequentemente, evitar a ligação de microrganismos patogênicos aos receptores do epitélio (BODE, 2012). Além disso, contribuem para redução da permeabilidade da barreira intestinal, por meio da modulação da expressão de proteínas das "*tight junctions*" (JOST *et al.*, 2015; BODE, 2015; CHEN, 2015). Diversos estudos relatam importantez funções dos OLHs na modulação da MI infantil, a qual tem sido diretamente relacionada à saúde da criança (WALSH *et al.*, 2020; WICIŃSKI *et al.*, 2020).

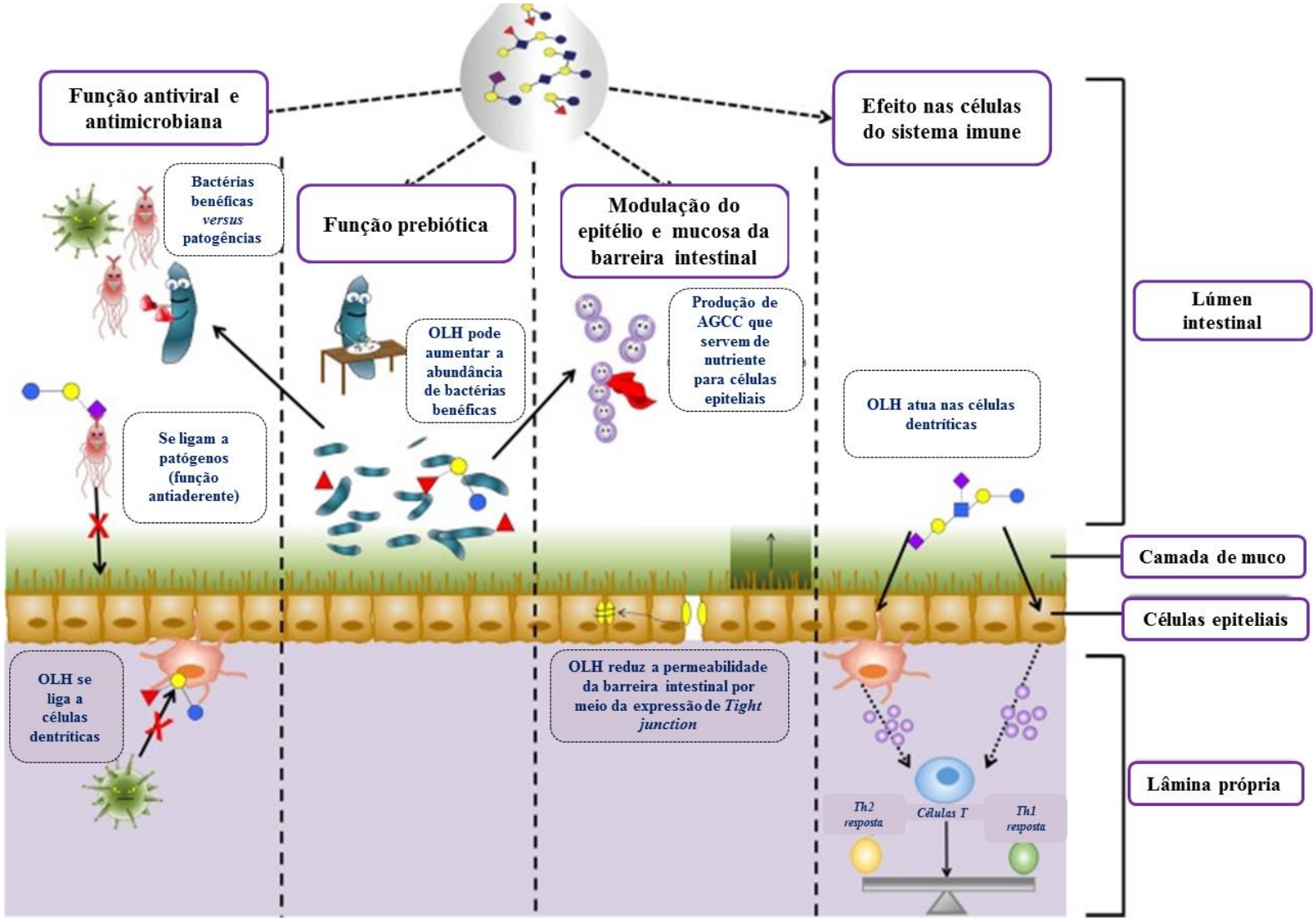

Figura 4. Funções dos oligossacarídeos do leite humano no trato gastrointestinal de lactentes.

Fonte: Adaptado de Walsh *et al.* (2020).
Nota: OLH: Oligossacarídeos do leite humano; AGCC: ácidos graxos de cadeia curta; TH: linfócitos T *helper*.

2.3 Microbiota intestinal infantil

A microbiota refere-se à população de microrganismos vivos presentes em um ambiente definido, como, por exemplo, bactérias, fungos, vírus e protozoários que colonizam, de forma simbiótica, determinada parte do corpo humano (MARCHESI *et al.*, 2016; BERG *et al.*, 2020). Já o termo microbioma é mais amplo e é definido como o conjunto desses microrganismos, bem como metabólitos/moléculas de sinalização, elementos estruturais e condições ambientais (MARCHESI *et al.*, 2016; BERG *et al.*, 2020). A maioria dos estudos com microbiota são com bactérias e estima-se que a proporção de células bacterianas para as humanas é de 1:1 (SENDER; FUCHS; MILO, 2016; CHUNG *et al.*, 2018). A maior parte das bactérias está presente no cólon, com uma quantidade total aproximadamente 10^{14} (SENDER; FUCHS; MILO, 2016; CHUNG *et al.* 2018).

Em relação à classificação taxonômica, os filos das bactérias representam o nível mais alto, seguidos por classe, ordem, família, gênero e espécie (CHUNG et al. 2018) (**Figura 5)**. No indivíduo adulto, os principais filos são Firmicutes e Bacteroidetes, que representam cerca de 90% das bactérias intestinais, seguidos em menor quantidade por outros filos, como Actinobacteria e Proteobacteria (CHUNG *et al.*, 2018; RINNINELLA *et al.*, 2019). O filo Firmicutes é composto principalmente pelo gênero *Clostridium* e, em menor quantidade, por outros gêneros, como *Lactobacillus, Bacillus, Enterococcus e Ruminococcus* (RINNINELLA *et al.*, 2019). A maior abundância de Firmicutes nos primeiros meses de vida tem sido associada ao maior risco de doença para a criança (STEWART *et al.*, 2018; ROBERTSON *et al.*, 2019). Já o filo Bacteroidetes é representado pelos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella* (RINNINELLA *et al.*, 2019). Essas bactérias são benéficas, atuando como protetoras para o desenvolvimento de obesidade, diabetes *mellitus*, aterosclerose, doenças inflamatórias e neurodegenerativas (GIBIINO *et al.*, 2018). O gênero *Bifidobacterium* recebe destaque em relação ao filo Actinobacteria, uma vez que constitui um dos primeiros gêneros bacterianos a colonizar o trato gastrointestinal humano (TOJO *et al.*, 2014; RINNINELLA *et al.*, 2019). As bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* são mais abundantes em recém-nascidos em aleitamento materno e estão relacionadas a efeitos benéficos como proteção à alergia atópica, obesidade e câncer colorretal (TOJO *et al.*, 2014; STEWART *et al.*, 2018). O filo *Proteobacteria* geralmente está associado à disbiose intestinal, uma vez que está frequentemente aumentado no intestino de indivíduos com doenças metabólicas e inflamatórias, quando comparados a indivíduos saudáveis (SHIN; WHON; BAE, 2015).

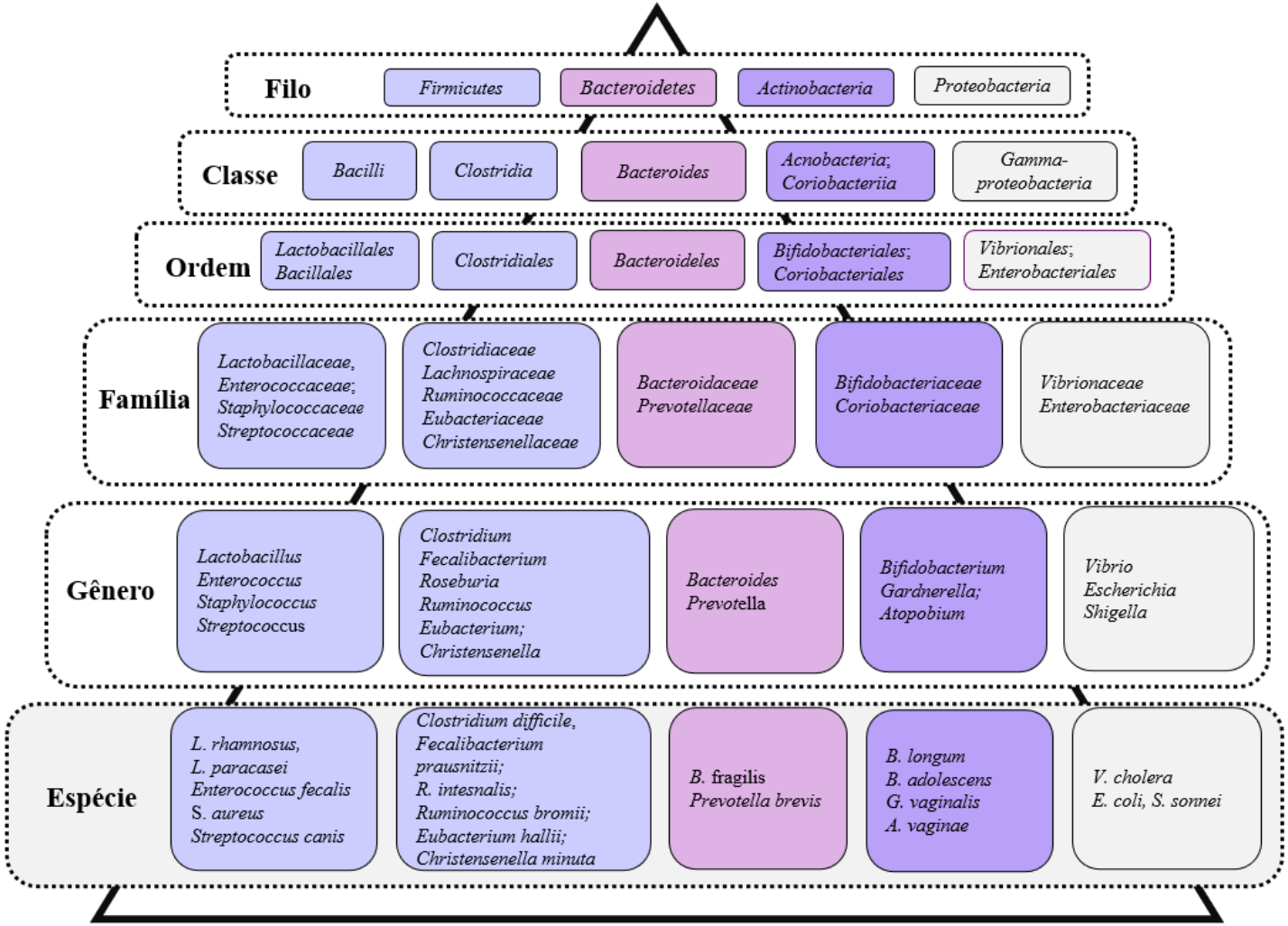

Figura 5. Classificação taxonômica das principais bactérias identificadas no trato gastrointestinal humano adulto.
Fonte: Adaptado de Chung *et al.* (2018).

Os primeiros microrganismos que colonizam o intestino dos recém-nascidos são anaeróbios facultativos, devido à presença de oxigênio, como os pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Em seguida, a ausência de oxigênio permite a maior abundância das bactérias anaeróbias obrigatórias. Assim, os gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium* passam a predominar na MI, já nos primeiros meses de vida (PALMER, 2007; MESA *et al.*, 2020). Apesar de alguns estudos relatarem algumas possíveis hipóteses, a origem da MI do recém-nascido ainda não é totalmente esclarecida e o seu desenvolvimento, complexo (MOORE; TOWNSEND, 2019; GOFFAU *et al.*, 2019; MESA *et al.*, 2020; TURUNEN *et al*., 2021).

As hipóteses sobre o desenvolvimento da MI infantil consideram três estágios: intrauterino, nascimento e infância. O primeiro estágio é considerado o mais controverso, e é relacionado à colonização de bactérias no ambiente intrauterino (MOORE; TOWNSEND, 2019). Estudos recentes descreveram a presença de microrganismos no líquido amniótico, placenta e mecônio (MOORE; TOWNSEND, 2019; TURUNEN *et al*., 2021). No entanto, Goffau e colaboradores (2019) sugerem que a maioria das bactérias identificadas na placenta foram adquiridas durante o parto e/ou podem ser devido a contaminação cruzada durante as análises laboratoriais. Até o momento não existem estudos suficientes para sustentar a hipótese do desenvolvimento da microbiota no período intrauterino (MOORE; TOWNSEND, 2019; GOFFAU *et al.*, 2019; MESA *et al.*, 2020).

O segundo estágio está relacionado com eventos associados ao nascimento, que se inicia com a ruptura do saco amniótico. Em seguida, ocorre a fase de inoculação da microbiota durante o parto (MOORE; TOWNSEND, 2019). O tipo de parto é um dos principais determinantes da MI. Recém-nascidos de parto normal apresentam a composição de microbiota semelhante à da vagina materna, com maior abundância de espécies consideradas importantes para a saúde, como os gêneros *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (MOORE; TOWNSEND, 2019; MESA *et al.*, 2020). Em contrapartida, a MI de recém-nascidos de parto cesáreo está relacionada a bactérias presentes na pele materna, como o gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus*; além de espécies potencialmente patogênicas, como *Clostridium difficile*.

O último estágio de desenvolvimento da microbiota contempla os primeiros meses de vida após o nascimento. Nesse período, a criança é exposta a importantes fatores que podem modular a microbiota, como o contato pele a pele entre o binômio mãe e filho, aleitamento materno, uso de fórmula infantil, uso de antibióticos e a introdução à alimentação complementar (MOORE; TOWNSEND, 2019; MESA *et al.*, 2020). Por exemplo, o leite humano, além de apresentar OLHs, também apresenta microrganismos e, portanto, é considerado um dos

principais fatores que podem modular a microbiota do lactente (JOST *et al.*, 2015; MOOSSAVI *et al.*, 2019; CORONA-CERVANTES *et al.*, 2020)

O primeiro ano de vida da criança é um período crítico para a modulação da MI infantil, já que essa população microbiana está sendo estabelecida e, assim, mais susceptível a alterações. A partir de um ano de idade, a MI se torna mais complexa e estável, sendo que no período entre dois e três anos de idade se assemelha a microbiota de um adulto (MOORE; TOWNSEND, 2019). Existem evidências de que a maturação da MI infantil é impulsionada pela interrupção do aleitamento materno e pela introdução da alimentação complementar (BÄCKHED *et al.*, 2015; STEWART *et al.*, 2018).

Outros importantes determinantes da MI infantil estão relacionados a fatores maternos e inclui idade gestacional no parto, uso de antibiótico, dieta e obesidade materna (MUELLER *et al.* 2016; HENDERICKX *et al.*, 2019; MAHER *et al.*, 2020; ECK *et al.*, 2020). O maior IMC pré-gestacional materno parece estar associado a MI do recém-nascido com maior abundância do gênero *Bacteroides* (COLLADO *et al.*, 2010; MUELLER *et al.* 2016). Maher e colaboradores (2020), em uma revisão sistemática, com dados de sete estudos, observaram que a dieta materna rica em lipídios e fibra foram associadas com menor e maior diversidade da MI, respectivamente. Recém-nascidos prematuros apresentam a MI com maior abundância de bactérias anaeróbias facultativas e potencialmente patogênicas comparados aos que nasceram a termo. Os gêneros que predominam no intestino de prematuros são geralmente *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia* e *Klebsiella* (HENDERICKX *et al.*, 2019). O uso de antibiótico na gestação, após o parto e nos primeiros meses de vida da criança demonstra ser um dos principais fatores que prejudicam o processo de desenvolvimento da MI saudável (KUPERMAN; KOREN, 2016; AZAD *et al.*, 2016; ECK *et al.*, 2020).

A localização geográfica também tem influência na MI e esse fato ocorre provavelmente devido aos diferentes estilos de vida, dieta, cultura e fatores genéticos (CASTANYS-MUÑOZ; MARTINS; PRIETO, 2013; LACKEY *et al.*, 2019). Lackey e colaboradores (2019), no estudo multicêntrico internacional *INSPIRE*, com 377 lactentes entre 20 e 161 dias de vida, observaram maior abundância de *Lactobacillus* na MI de lactentes da área rural da Etiópia e Gâmbia e menor abundância desse gênero nos lactentes da Espanha, Suécia, Peru e Estados Unidos.

Estudos na América Latina que avaliaram a MI infantil ainda são escassos. Mueller e colaboradores (2016), em um estudo realizado em Porto Alegre, Brasil, com 74 recém-nascidos entre dois e três dias de vida, observaram que *Pseudomonas* foi o gênero mais abundante na MI. Adicionalmente, foi relatado que os filhos de mães obesas apresentaram maior proporção de *Bacteroides* e menor de *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Hidrogenophilus*

quando comparados aos filhos de mães eutróficas. Em outro estudo com a mesma base de dados, os autores encontraram que a MI dos lactentes nascidos por parto cesárea apresentou maior abundância de *Bacteroides*, *Parabacteroides* e *Clostridium* em relação aos que nasceram por parto normal (MUELLER *et al.*, 2016). Talarico e colaboradores (2017), em um estudo longitudinal no período de 2, 7, 30, 90, 180 e 360 dias de vida realizado em São Paulo com 12 lactentes em AME, observaram o predomínio dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* na MI de nascidos por parto vaginal. Em um estudo realizado no México, com 67 lactentes, os autores observaram que a família *Pseudomonadaceae* e os gêneros *Clostridium* e *Bifidobacterium* foram os mais prevalentes na MI infantil (CORONA-CERVANTES *et al.*, 2020).

O equilíbrio da MI, com maior abundância de bactérias com potencial benefício para a saúde, é muito importante para o hospedeiro, especialmente nos primeiros meses de vida (RUTAYISIRE *et al.*, 2016; ROWLAND *et al.*, 2018; ROBERTSON *et al.*, 2019; MESA *et al.*, 2020). A MI desempenha importantes funções, como a síntese de vitaminas K e do complexo B, metabolismo de proteínas e lipídios (JANDHYALA *et al.*, 2015; ROWLAND *et al.*, 2018). A fermentação de carboidratos não digeríveis, tais como os OLHs, resulta em ácidos graxos de cadeia curta, com funções também essenciais para o organismo (WALSH *et al.*, 2020). A microbiota também participa do processo de desenvolvimento do sistema imune, além de auxiliar com a degradação de compostos xenobióticos e medicamentos (JANDHYALA *et al.*, 2015; ROWLAND *et al.*, 2018). Adicionalmente, estudos realizados durante a infância destacam a relevância da MI para o adequado crescimento e desenvolvimento infantil (ARRIETA *et al.*, 2014; ROBERTSON *et al.*, 2019).

2.4 Associação entre os oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil

O leite materno apresenta vários nutrientes e compostos bioativos que podem ser importantes moduladores da MI infantil (THOMSON; MEDINA; GARRIDO, 2017). O AME está associado a maior abundância de bactérias consideradas benéficas e menor abundância de bactérias potencialmente patogênicas no trato gastrointestinal. Além disso, a MI de lactentes em AME apresenta menor diversidade e menor maturação em relação aos lactentes que estão em uso de fórmula infantil ou que introduziram a alimentação complementar precocemente (HO *et al.*, 2018; GALAZZO *et al.*, 2020).

Em uma revisão sistemática e meta-análise, com sete artigos científicos, incluindo 1.825 amostras de fezes de 684 lactentes, os autores encontraram que aqueles que não estavam em

AME apresentaram maior diversidade de MI e maior abundância de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* em comparação com crianças em AME (HO *et al.*, 2018). Stewart e colaboradores (2018) estudaram 903 crianças acompanhadas entre três e 46 meses de idade em um estudo multicêntrico realizado na Alemanha, Suécia, Finlândia e nos Estados Unidos. Os autores observaram maiores concentrações de *Bifidobacterium*, particularmente as espécies *B. breve*, *B. bifidum, B. dentium*, além de *Lactobacillus rhamnosus* e *Staphylococcus epidermidis* e menores concentrações das espécies *Escherichia coli*, *Tyzzerella nexilis*, *Eggerthella lenta*, *Ruminococcus torques* e *Roseburia intestinalis*. Por sua vez, a interrupção do aleitamento materno modificou a MI, com predomínio do filo *Firmicutes* (STEWART *et al.*, 2018).

Evidências sugerem que a presença de OLH pode ser um dos principais mecanismos pelo qual o aleitamento materno pode modular a MI infantil (THOMSON; MEDINA; GARRIDO, 2017). Esses compostos são considerados prebióticos, ou seja, o substrato que é utilizado seletivamente pelos microrganismos hospedeiros e, assim, conferem benefícios à saúde (THOMSON; MEDINA; GARRIDO, 2017; GIBSON *et al.*, 2017). Contudo, a maioria dos estudos que avaliaram a associação entre OLH e a MI são *in vitro*, com variações em relação às estruturas de OLH e classificação taxonômica das bactérias avaliadas, bem como o método de análise (MARCOBAL *et al.*, 2010; SAKANAKA *et al.*, 2019; WALSH *et al.*, 2020).

Sakanaka e colaboradores (2019), em um estudo de revisão com 11 estudos *in vitro*, identificaram múltiplos genes presentes em *Bifidobacterium* envolvidos na degradação e transporte de OLH. As espécies *B. bifidum* e *B. infantis* apresentaram elevada capacidade de degradar a maioria das estruturas desses carboidratos (SAKANAKA *et al.*, 2019). Marcobal e colaboradores (2010), em um estudo *in vitro,* encontraram que *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, *Bacteroides fragilis*, e *Bacteroides vulgatus* foram capazes de metabolizar os OLH com alta eficiência, enquanto *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Eubacterium*, *Clostridium* e *E. coli* apresentaram menor eficiência. Além disso, o estudo identificou que o lacto-N-neotetraose (LNnT), OLH de cadeira curta, foi mais associado com a espécie de *Bifidobacterium* em relação a *Bacteroides* e, que as espécies *B. longum subsp*. *infantis* e *B. vulgatus* foram mais relacionados a OLH fucosilados (MARCOBAL *et al.*, 2010). De fato, Ashida e colaboradores (2009), em um estudo *in vitro*, observaram que OLH com ligações alfa 1-2-fucosilados, como 2'FL, promoveram o crescimento de espécies de *Bifidobacterium* (ASHIDA *et al*., 2009).

Considerando que o status secretor ativo dá origem a elevadas concentrações de OLH alfa 1-2 fucosilados, estima-se que a MI de lactentes que são amamentados por mães secretoras apresentem maior abundância dos gêneros *Bifidobacterium* em relação a mães não secretoras

(LEWIS *et al.*, 2015). Nesse sentido, Lewis e colaboradores (2015), em um estudo longitudinal com 44 pares de mães e seus filhos norte-americanos, investigaram a associação entre o status secretor da mãe e a MI de seu filho entre sete e 120 dias após o parto. Os autores encontraram que *Bifidobacterium* e *Bacteroides* estavam presentes em maior abundância e esses gêneros foram estabelecidos na MI mais precocemente em filhos de mães secretoras do que os de não secretoras. Adicionalmente, houve uma associação inversa entre as concentrações de *Bifidobacterium* e a concentração de oligossacarídeos nas fezes da criança, o que indica o maior consumo dessas moléculas por essas bactérias (LEWIS *et al.*, 2015).

Além disso, os OLH podem estar inversamente associados com a abundância de bactérias potencialmente patogênicas no intestino, como *E. coli* e *Helicobacter pylori*. Entre os principais mecanismos relacionados à proteção contra as bactérias patogênicas, destacam-se a propriedade prebiótica que, por estimular a multiplicação de bactérias benéficas, promove indiretamente a redução bactérias potencialmente nocivas. Adicionalmente, OLHs podem se ligar diretamente a agentes patogênicos e, assim, diminuir o risco de infecções por esses microrganismos. Outro mecanismo está associado à fermentação dos OLH pelas bactérias do hospedeiro que resulta na produção de AGCC (acetato, propionato e butirato), os quais reduzem o pH luminal, dificultando a colonização por enteropatógenos (THOMSON; MEDINA; GARRIDO, 2017; WALSH *et al.*, 2020; WICIŃSK *et al.*, 2020).

A associação entre os OLH e a MI demonstra ser dependente da estrutura desses carboidratos, bem como as diferentes espécies e cepas de bactérias avaliadas (THOMSON; MEDINA; GARRIDO, 2017; SAKANAKA *et al.*, 2019; WALSH *et al.*, 2020). De forma geral, as bactérias que apresentam a enzima fucosidase podem ser capazes de metabolizar os OLHs fucolisados e as que possuem enzimas sialidases podem metabolizar apenas OLHs sialiados. No entanto, algumas bactérias podem apresentar fucosidases, sialidases e/ou outras enzimas capazes de clivar diferentes estruturas de OLH (WALSH *et al.*, 2020). Alguns autores destacam que a capacidade de metabolizar os OLH deve-se a adaptações evolutivas resultantes das condições do trato gastrointestinal (MAJTA *et al.*, 2019; SAKANAKA *et al.*, 20219; WALSH *et al.*, 2020), e podem variar também de acordo com a localização geográfica (MAJTA *et al.*, 2019).

Majta e colaboradores (2019) descreveram que a MI de lactentes finlandeses apresenta menos enzimas específicas para OLHs do grupo 1 (secretor e Lewis positivo) em cepas de *Bifidobacterium* em relação aos lactentes russos. Por isso, a MI de lactentes finlandeses apresenta maior abundância de *Bacteroides*, que por apresentar também capacidade de degradar os OLHs conseguem predominar no trato gastrointestinal e utilizar mais esse carboidrato como

fonte de energia. Por sua vez, os lactentes russos apresentam maior abundância de *Bifidobacterium*, o que demonstra que associação entre os OLHs e a MI pode depender de adaptações evolutivas que variam de acordo com a população avaliada (MAJTA *et al.*, 2019).

Em um ensaio clínico randomizado duplo-cego multicêntrico, os pesquisadores testaram o impacto da adição de 2'FL e LNnT em fórmulas infantis no estabelecimento da MI de crianças na Itália e na Bélgica. As crianças do grupo com intervenção (n=58) apresentaram a MI mais próxima das crianças em AME (n= 35), do que o grupo controle (n=63), que recebeu fórmula infantil padrão aos três meses de idade. Observou-se também uma menor alfa diversidade da MI, maior abundância de *Bifidobacterium* e menor abundância de *Escherichia* e *Peptostreptococcaceae* (BERGER *et al.*, 2020).

Até o momento os estudos em humanos que investigaram a associação entre os OLH e a MI infantil são escassos (WANG *et al.*, 2015; KORPELA *et al.*, 2018; BAI *et al.*, 2018; BOREWICZ *et al.*, 2019; BOREWICZ *et al.*, 2020; LAURSEN *et al.*, 2021). Bai e colaboradores (2018) em um estudo com 56 crianças chinesas, encontrou correlação positiva entre os OLH fucosilados e a abundância de *Bifidobacterium* na MI infantil no período de 6 e 42 dias após o parto. Por sua vez, Laursen colaboradores (2021) observaram que a *Escherichia* spp. foi positivamente e negativamente correlacionada com 6′SL e OLHs fucosilados, respectivamente. Assim, os resultados apresentados entre os estudos ainda são ainda controversos, destacando a importância de uma investigação mais aprofundada, e incluindo pesquisas com participantes brasileiros. Os principais estudos com essa temática estão descritos nos **Quadro 2** e **3**.

Quadro 2. Características gerais dos estudos que avaliaram a associação entre oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil.

Referência	Origem País (cidade ou região)	Desenho do estudo	Tamanho Amostral	Período de avaliação (dias)		Número de OLH avaliados	Método de análise	
				OLH	Microbiota		OLH	Microbiota
Wang *et al.* (2015)	Estados Unidos (Urbana)	Transversal	22	90	90	16	CLAE/MS	Sequenciamento da região V1–V3 do RNA ribossomal 16S O processamento das sequências foi realizado no QIIME 1.6.0 Plataforma não informada
Korpela *et al.* (2018)	Finlândia (Helsinki)	Transversal	91	3	90	NA	NA	Sequenciamento da região V3–V4 do RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na Plataforma Illumina MiSeq.
Bai *et al.* (2018)	China (Jinzhou)	Coorte	56	6, 42, 120 e 180	6, 42, 120 e 180	33	CLAE/MS	Sequenciamento da região V4 RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na plataforma Illumina HiSeq. O processamento das sequências foi realizado no QIIME 1.8.0.
Borewicz *et al.* (2019)	Holanda (Região Sul)	Transversal	121	30	30	12	CLAE/MS	Sequenciamento da região V4 RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na plataforma Illumina HiSeq.
Borewicz *et al.* (2020)	Holanda (Região Sul)	Longitudinal	24	14, 42 e 84	14, 42 e 84	18	CLAE/MS	Sequenciamento da região V4 RNA ribossômico 16S Sequenciamento realizado na Plataforma Illumina HiSeq.

Quadro 2. Características gerais dos estudos que avaliaram a associação entre oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil (continuação).

Referência	Origem País (cidade ou região)	Desenho do estudo	Tamanho Amostral	Período de avaliação (dias)		Número de OLH avaliados	Método de análise	
				OLH	Microbiota		OLH	Microbiota
Laursen *et al*. (2021)	Dinamarca (Copenhagen)	Longitudinal	34	150–195 e 270	150–195 e 270	6	CLAE	Sequenciamento da região V3 do RNA ribossômico 16S O processamento das sequências foi realizado no QIIME 1.8.0. Sequenciamento foi realizado na plataforma Ion OneTouch™ e Ion PGM

Nota: CLAE/MS: Cromatografia Liquida Acoplada a Espectrometria de Massa; OLH: Oligossacarídeos do Leite Humano; MI: Microbiota Intestinal; QIIME: *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*; RNA: *Ribonucleic acid*.

Quadro 3. Principais resultados dos estudos que avaliaram a associação entre oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil.

Referência	Análise estatística	Principais resultados
Wang *et al.* (2015)	• Correlação de *Spearman* • Regressão *Partial Least Square*	• A abundância de *Bifidobacterium* foi diretamente associada com a presença de LNFP I, MFLNH III, LSTb e DSLNT, e inversamente com 2′FL e LDFT; • 2′FL foi diretamente associado a *Bacteroides* e inversamente associado com *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Veillonella e Rothia*.
Korpela *et al.* (2018)	• PERMANOVA • Estratificação pelo tipo de parto e *status* secretor	• Não houve associação entre o *status* secretor e a composição da MI de recém-nascidos por parto normal; • A abundância de *Bifidobacterium* foi reduzida e a de *Enterococcus* aumentou em recém-nascidos de parto cesárea e mães não secretoras em comparação com as mães secretoras e parto vaginal. • Houve maior abundância de *Akkermansia* em recém-nascidos de parto normal e mães secretoras em comparação com as mães não secretoras e parto cesárea.
Bai *et al.* (2018)	• Correlação de *Spearman*	• Houve diferença na beta diversidade da MI infantil entre lactantes de mães secretoras *versus* não secretoras no período de 42 dias; • A abundância de *Bifidobacterium* foi menor em lactentes filhos de mães não secretoras *versus* secretoras em todos os períodos avaliados; • O filo Actinobacteria foi mais abundante em lactantes filhos de mães secretoras em comparação com não secretoras no período de seis dias; • A espécie *Staphylococcus epidermidis* foi mais abundante em lactantes filhos de secretoras *versus* não secretoras no período de seis e 42 dias; • *Lactobacillales* e *Streptococcus* spp. foram mais abundantes em lactantes filhos de secretoras, enquanto *Bacteroidetes* spp foram mais abundantes em não secretoras no período de 180 dias; • Houve correlação positiva entre as concentrações totais de OLH fucosilados e a abundância de *Bifidobacterium* sp. no período de seis e 42 dias.
Borewicz *et al.* (2019)	• Análise de cluster por *Dirichlet Multinomial Mixture* • *Partial Least Square*	• Foram identificados três clusters na MI infantil: representados por diferentes bactérias (A), elevada abundância de *Bifidobacterium e Bacteroides* (B) e elevada abundância de *Bifidobacterium* (C). • Houve associação entre as concentrações de LNFP I e 2'FL e *cluster* da Ml infantil com menor abundância do gênero *Bacteroides* e *Bifidobacterium*; • Não houve associação entre os demais OLH e MI infantil; • Não houve associação entre o *status* secretor e os *clusters* de microbiota.

Quadro 3. Principais resultados dos estudos que avaliaram a associação entre oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil (continuação).

Referência	Análise estatística	Principais resultados
Borewicz *et al*. (2020)	• Análise de redundância • Correlação de Spearman	• Houve forte correlação positiva entre LNFP III e a abundância dos gêneros *Veillonella*, *Enterococcus* e *Streptococcus* em todas as visitas. As correlações entre as demais concentrações de OLH e a abundância da MI infantil foram fracas e variaram com a idade; • Houve correlação positiva entre 3′SL e *Enterobacteriaceae* e *Actinomyces* em todas as visitas; • O 6′SL foi positivamente correlacionado com *Clostridium* em 14 dias e 84 dias; • LNFP III foi positivamente correlacionado com *Enterococcus* em 42 e 84 dias; • Houve correlação negativa entre LNDFH II e *Lachnospiraceae incertae sedi*, 3′SL e *Lactobacillus*; e LNFP I e *Bifdobacterium* no período de 14 e 42 dias.
Laursen *et al*. (2021)	• Correlação de Spearman • Teste ANOSIM • Teste ADONIS	• Não houve associação entre o *status* secretor materno e a MI • *Escherichia*/ASV_13 (*Escherichia* spp.) foi positivamente correlacionada com 6′SL (FDRp < 0.02) e houve uma tendência de correlação negativa entre essa bactéria e OLHs fucosilados (FDRp < 0,1).

Nota: ASV: *Amplicon sequence variants*; OLH: Oligossacarídeos do Leite Humano; MI: Microbiota Intestinal; 2'FL: 2'-fucosilactose; 3'FL: 3-fucosilactose; 3'SL: 3'-sialilactose; 6'SL: 6'-sialilactose; DSLNT: Disiailacto-N-tetraose; LNFP: lacto-N-fucopentaose I, II, III; LSTb: Sialil-lacto-N-tetraose b; LNDFH: Lacto-N-difucohexaose; MFLNH: Monofucosyllacto-N-hexaose; LDFT: Lacto-difucotetraose; NA= Não se aplica.

2.5 Crescimento e desenvolvimento infantil

O crescimento e desenvolvimento são processos contínuos e dinâmicos que ocorrem desde a concepção. O crescimento físico é caracterizado pelo aumento do tamanho corporal (BRASIL, 2012). Já o desenvolvimento infantil é um processo complexo definido pela aquisição progressiva de habilidades perceptivas, motoras, cognitivas, linguísticas, socioemocionais e autorreguladoras, que permitem às crianças se tornarem autônomas (BRASIL, 2002; BLACK; PEREZ-ESCAMILLA; FERNANDEZ, 2015; OMS, 2020; BLACK *et al.*, 2017).

A avaliação e monitoramento do crescimento e desenvolvimento infantil representam a ação central e organizadora de toda a atenção à saúde da criança (BRASIL, 2006; OMS, 2006; BRASIL, 2012). A antropometria é o principal método utilizado para avaliação do estado nutricional infantil (BRASIL, 2006). Esse é um método de baixo custo, não invasivo, com simplicidade e facilidade de realização e padronização, se for realizada por profissionais treinados (BRASIL, 2006). A avaliação do crescimento é realizada de acordo com as curvas de crescimento da OMS para crianças de zero a cinco anos de idade (OMS, 2006). Essas curvas apresentam como parâmetros o perímetro cefálico, peso, comprimento e IMC para a idade. Além disso, outro indicador importante e que tem sido utilizado nos estudos é o ganho de peso rápido na infância, que pode ser definido como aumento maior do que 0,67 no escore Z do peso para idade, considerando a diferença entre dois períodos de avaliação antropométrica da criança, como por exemplo entre o nascimento e o primeiro ano de vida (MONTEIRO; VICTORA, 2005).

A avaliação do desenvolvimento infantil é mais complexa, e envolve o relato de preocupação dos pais, observação clínica das atividades realizadas pela criança e também o uso de escalas de diagnóstico e rastreamento (BRASIL, 2012; ZEPPONE; VOLPON; DEL-CIAMPO, 2012; DOSMAN; ANDREWS; GOULDEN, 2012). O monitoramento do desenvolvimento infantil em serviços de saúde é mais limitado, considerando a escassez de profissionais treinados e qualificados (BRASIL, 2012; DOSMAN; ANDREWS; GOULDEN, 2012). Contudo, as escalas mais adequadas e utilizadas em estudos científicos são *Bayley Scales of Infant Development*, *Vineland Adaptive Behavior Scale*, *Mullen Scales of Early Learning* e *Ages and Stages Questionnaire* (ASQ-3) (SILVA *et al.*, 2018).

O crescimento e o desenvolvimento infantil são considerados importantes indicadores de qualidade de vida e saúde da infância (BRASIL, 2012; BLACK *et al.*, 2017). Por exemplo, o ganho de peso rápido no início da vida é um dos principais fatores de risco para o

desenvolvimento de obesidade (MONTEIRO; VICTORA, 2005). De acordo com a OMS, 39% da população em todo o mundo apresenta excesso de peso e 13% são obesos (OMS, 2020). Em relação as crianças menores de cinco anos, 38,9 milhões (5,7%) apresentam excesso de peso em todo o mundo (OMS, 2021). A obesidade está associada a diversos desfechos desfavoráveis como, por exemplo, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer, como de mama e fígado, o que resulta em gastos consideráveis para o SUS (BRASIL, 2020; OLIVEIRA, 2013).

Do mesmo modo, os primeiros anos de vida são considerados críticos para o desenvolvimento infantil (OMS, 2020; BLACK *et al.*, 2017). Apesar do desenvolvimento do cérebro se iniciar com cerca de duas semanas de gestação e continuar até os 20 anos de idade, o maior desenvolvimento cerebral ocorre no primeiro ano de vida. Nesse período, ocorre a maior formação dos sistemas sensoriais e perceptivos que são importantes para a linguagem, comportamento social e emoção (TIERNEY; NELSON, 2009). Em países em desenvolvimento e de baixa renda, a prevalência de crianças menores de cinco anos de idade que apresentaram o risco de não atingir todo o seu potencial de desenvolvimento é de 43%, que representa um total de 250 milhões de crianças (BLACK *et al.*, 2017). Dessa forma, o desenvolvimento infantil pode ter impacto em relação às habilidades intelectuais, rendimento escolar, criatividade e saúde a longo prazo (BLACK *et al.*, 2017).

É fundamental que haja maior investimento em fatores que podem estar associados com o crescimento e desenvolvimento infantil, e assim contribuir com melhores resultados de saúde, econômicos e sociais para a população (SILVER; SINGER, 2014; BLACK et al., 2017). O crescimento e o desenvolvimento são processos multifatoriais, que podem sofrer a influência de características genéticas, biológicas e ambientais (OMS, 2006; MAGGI *et al.*, 2010; BRASIL, 2012). A exposição a fatores considerados desfavoráveis nos primeiros meses de vida pode prejudicar o crescimento e o potencial do desenvolvimento infantil (OMS, 2020; BLACK *et al.*, 2017). Nesse sentido, alguns autores relataram evidências de que a MI no início da vida possa estar associada com o crescimento e o desenvolvimento infantil. No entanto, ainda são necessários mais estudos com essa temática, especialmente longitudinais e considerando a população brasileira (CARLSON *et al.*, 2018; STANISLAWSKI *et al.*, 2018; KAMNG'ONA *et al.*, 2019; LOUGHMAN *et al.*, 2020; ACUÑA *et al.*, 2021; ROTHENBERG *et al.*, 2021; TAMANA *et al.* 2021).

2.6 Associação entre a microbiota intestinal infantil e o crescimento e desenvolvimento infantil

Atualmente existe grande interesse em investigar a influência da MI sobre o crescimento e desenvolvimento infantil no início da vida, por serem importantes indicadores da saúde a curto e longo prazo (GOULET, 2015; KOZYRSKYJ *et al.,* 2016; ROBERTSON *et al*., 2019).

A MI pode estar envolvida no crescimento infantil e na regulação do peso corporal por aumentar a absorção de energia proveniente da dieta, alterar o tempo de trânsito intestinal e modular as vias de sinalização de lipogênese, o que resulta em um acúmulo de energia e inflamação no hospedeiro (PALIY *et al.*, 2014). Ademais, estudos sugerem também que a MI pode regular o eixo somatotrópico do hospedeiro, que controla o crescimento do recém-nascido e compreende hormônios de crescimento e fatores de crescimento semelhantes à insulina (*Insulin Growth Factor I*, IGF I) (SCHWARZER *et al.*, 2016; ROBERTSON *et al.*, 2019).

Em uma revisão sistemática realizada com 32 estudos, os autores observaram que a MI de adultos obesos apresenta a maior razão Fimicutes/Bacteroidetes, maior abundância de *Fusobacteria*, Proteobacteria, *Mollicutes*, *Lactobacillus reuteri,* e menor abundância de *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, Bacteroidetes, *Methanobrevibacter smithii*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei* (CROVESY; MASTERSON; ROSADO, 2020).

Os estudos clínicos que descrevem a MI infantil e sua relação com o crescimento na infância ainda apresentam resultados inconsistentes. Em um estudo de coorte realizado na Noruega com 165 participantes, os autores encontraram que abundância da MI aos dez dias e dois anos foi associada com o IMC para a idade aos doze anos (STANISLAWSKI *et al.*, 2018). Recentemente, alguns estudos investigaram a associação entre a MI intestinal e o ganho de peso rápido na infância, e alguns autores encontraram associações entre esse desfecho e os gêneros *Bacteroides* e *Enteroccus* (LAURSEN *et al.*, 2020; ALDERETE *et al.*, 2021; GONZÁLEZ *et al.*, 2021). Contudo, esses achados também variam de acordo com os estudos, que por sua vez apresentam diferentes metodologias. Os principais estudos que investigaram a associação entre a MI e o crescimento infantil estão descritos nos **Quadros 4** e **5** (STANISLAWSKI *et al.*, 2018; KAMNG'ONA *et al.*, 2019; LAURSEN *et al.*, 2020; HUEY *et al.*, 2020; LAURSEN *et al.*, 2020; ALDERETE *et al.*, 2021; GONZÁLEZ *et al.*, 2021).

Quadro 4. Características gerais dos estudos que avaliaram a associação entre a microbiota intestinal e o crescimento infantil.

Referência	Origem País (região)	Desenho do estudo	Tamanho amostral	Período de avaliação		Método de análise	Índices antropométricos
				Microbiota	Crescimento	Microbiota	Crescimento/composição corporal
González *et al.* (2021)	Espanha (Oviedo e Valência)	Coorte	88	1 mês	Nascimento e 12 meses 6 e 12 meses	Sequenciamento da região V4 RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na plataforma Illumina MiSeq O processamento das sequências foi realizado no QIIME 2 1.9.7	Ganho de peso rápido (Peso/idade >/≤ 0,67)
Alderete *et al.* (2021)	Estados Unidos (California)	Coorte	132	1 mês	Nascimento e 12 meses	Sequenciamento da região V4 RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na plataforma Illumina MiSeq O processamento das sequências foi realizado no QIIME 2 1.9.7	Ganho de peso rápido (Peso/idade >/≤ 0,67) IMC/idade
Huey *et al.* (2020)	Índia (Mumbai)	Transversal	53	10-18 meses	10-18 meses	Sequenciamento da região V4 RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na plataforma Illumina MiSeq O processamento das sequências foi realizado no QIIME 2 1.9.7	Peso/idade Comprimento/idade Peso/comprimento Perímetro cefálico
Laursen *et al.* (2020)	Dinamarca (Copenhagen)	Coorte	30	5 meses	5 e 9 meses	Sequenciamento da região V3 RNA ribossomal 16S O processamento das sequências foi realizado no QIIME 1.8.0. Sequenciamento foi realizado na plataforma Ion OneTouch™ e Ion PGM	Peso/ idade IMC/idade Perímetro da cintura Bioimpedância (% de massa gorda)

Quadro 4. Características gerais dos estudos que avaliaram a associação entre a microbiota intestinal e o crescimento infantil (continuação).

Referência	Origem País (região)	Desenho do estudo	Tamanho amostral	Período de avaliação		Método de análise	Índices antropométricos
				Microbiota	Crescimento	Microbiota	Crescimento/composição corporal
Kamng'ona *et al.* (2019)	Malawi (Zomba)	Coorte	6 meses (n=527) 12 meses (n=632) 18 meses (n=629)	6, 12 e 18 meses	6-12 12-18 meses	Sequenciamento da região V4 RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na plataforma Illumina MiSeq O processamento das sequências foi realizado no QIIME 1.9.1	Peso/idade Comprimento/idade Peso/comprimento Perímetro cefálico/idade
Stanislawski *et al.* (2018)	Noruega (Oslo)	Coorte	165	4, 10, 30, 120, 365 e 730 dias	12 anos	Sequenciamento da região V4 RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na plataforma Illumina HiSeq O processamento das sequências foi realizado no QIIME 1.9.1	IMC/idade

Nota**:** QIIME: *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*; PCR; *Polymerase Chain Reaction* RNA: *Ribonucleic acid*; IMC: Índice de massa corporal.

Quadro 5. Principais resultados dos estudos que avaliaram a associação entre o a microbiota intestinal e o crescimento infantil.

Referência	Análise estatística	Variáveis de ajuste	Principais resultados
González *et al.* (2021)	• LME	Tipo de parto, sexo e prática de aleitamento materno	• Bacteroides em 1 mês de vida foi associado ao ganho de peso rápido entre 6 e 12 meses.
Alderete *et al.* (2021)	• Regressão logística • Regressão multinomial • PERMANOVA	IMC materno, uso de antibiótico infantil, prática de aleitamento materno	• A alfa diversidade (Shannon e diversidade filogenética de Faith) com 1 mês de vida aumentaram a chance do ganho de peso rápido; • Crianças com ganho de peso rápido apresentaram maior abundância de *Acinetobacter*, *Collinsella*, *Enterococcus*, *Neisseria* e *Parabacteroides* em comparação com as com ganho de peso adequado.
Huey *et al.* (2020)	• PERMANOVA • Regressão linear • Benjamini-Hochberg ajustada por FDR	Idade e sexo	• A alfa diversidade da MI pelo índice de Shannon foi diretamente associada ao perímetro cefálico e ao escore do peso para o comprimento.
Laursen *et al.* (2020)	• Correlação de Spearman	NA	• Foram encontradas correlações negativas entre a abundância de *Enterococcus* na MI aos 5 meses de idade e escore Z de IMC/idade, peso/idade e perímetro da cintura; • Foram encontradas correlações negativas entre a abundância de *Enterococcus* na MI e a percentual de gordura no período de 5 meses; • Não houve diferença em relação à alfa-diversidade da MI e a antropometria/composição corporal infantil.

Quadro 5. Principais resultados dos estudos que avaliaram a associação entre o a microbiota intestinal e o crescimento infantil (continuação).

Referência	Análise estatística	Variáveis de ajuste	Principais resultados
Kamng'ona *et al.* (2019)	• ANCOVA para medidas repetidas • Benjamini-Hochberg ajustada por FDR	Grupo de intervenção (estudo maior); idade da criança; idade materna, estatura e IMC maternos, paridade, escolaridade, status de HIV e hemoglobina; bens domésticos, segurança alimentar, fonte de água potável, acesso ao saneamento básico, estação do ano; tipo de parto, local de nascimento e sexo da criança.	• A maturação da MI aos 6 meses de idade foi diretamente associada ao peso/idade entre 6 e 12 meses; • A alfa diversidade da MI aos 6 meses foi diretamente associada ao peso/idade e ao peso/comprimento entre 6 e 12 meses.
Stanislawski *et al.* (2018)	• PERMANOVA • regressão baseada no teste de associação de Kernel (MiRKAT)	Tipo de aleitamento materno (exclusivo ou não), duração do aleitamento materno exclusivo, tipo de parto, uso de antibiótico, gestação gemelar ou de feto único, idade gestacional no parto.	• A taxa da MI aos 10 dias e dois anos de idade explicou 50% da variação do IMC/idade aos 12 anos de idade.

Nota: HIV= vírus da imunodeficiência humana; LME= Modelo longitudinal de efeitos mistos; FDR: *False Discovery Rate*; IMC: Índice de massa corporal; MI: Microbiota Intestinal; NA= Não se aplica; IC95%= Intervalo de Confiança de 95%.

Em relação a associação entre a MI e o desenvolvimento infantil, alguns autores sugerem que as funções da MI, especialmente relacionadas à imunidade e o metabolismo de nutrientes podem ser mediadoras nesse processo (CARABOTTI *et al.*, 2015; DINAN; CRYAN, 2017; CARLSON *et al.*, 2018). Além disso, a MI também pode interagir com o eixo intestino-cérebro, comunicação bidirecional entre os sistemas nervoso central e entérico (CARABOTTI *et al.*, 2015; SHARON *et al.*, 2016). Em geral, os estudos sugerem que a influência da MI no eixo intestino-cérebro pode ocorrer por meio de ligações neurais, endócrinas, imunológicas e humorais (CARABOTTI *et al.*, 2015; SHARON *et al.*, 2016; DINAN; CRYAN, 2017).

Estudos clínicos observaram que a MI pode estar associada a outras doenças cognitivas, relacionadas ao neurodesenvolvimento e neurodegenerativas (SHARON *et al.*, 2016; DINAN; CRYAN, 2017). Contudo, pesquisas que investigaram a associação entre a MI e o desenvolvimento infantil são mais recentes e escassas (CARLSON *et al.*, 2018; SORDILLO *et al.*, 2019; LOUGHMAN *et al.*, 2020; ACUÑA *et al.*, 2021; ROTHENBERG *et al.*, 2021; TAMANA *et al.* 2021). Sordillo e colaboradores (2019) em um estudo com 309 americanos, avaliaram a associação entre a MI aos três a seis meses e o desenvolvimento infantil aos três anos de idade. Esses autores encontraram que a abundância de *Clostridiales*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*, bem como do *cluster* da MI caracterizado por menor abundância de *Bacteroides*, foram inversamente associados com o domínio de comunicação (SORDILLO *et al.*, 2019). Em um estudo de coorte realizado no Canadá com 405 participantes, os autores observaram que a abundância do gênero *Bacteroides* no período de 12 meses foi diretamente associada aos escores do desenvolvimento cognitivo e de linguagem aos 24 meses de idade (TAMANA *et al.*, 2020). Acuña e colaboradores (2021), em um estudo com 71 crianças na Espanha, encontraram diferença entre a beta diversidade da MI e o domínio de coordenação motora fina. Esses autores também encontraram associação entre a abundância de alguns gêneros de bactérias, como *Coprococcus*, *Enterococcus*, *Roseburia*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* com esse domínio de desenvolvimento infantil (ACUÑA *et al.*, 2021). Dessa forma, mais estudos são necessários para preencher lacunas sobre a possível associação entre a MI e o desenvolvimento infantil (**Quadro 6 e 7**).

Quadro 6. Características gerais dos estudos que avaliaram a associação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil.

Referência	Origem País (cidade ou região)	Desenho do estudo	Tamanho amostral	Período de avaliação (meses)		Método de análise	
				Microbiota	Desenvolvimento	Microbiota	Desenvolvimento
Carlson *et al.* (2018)	Estados Unidos (Carolina do Norte)	Coorte	89	12	12 e 24	Sequenciamento da região V1-V2 RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na plataforma Illumina MiSeq O processamento das sequências foi realizado no QIIME *software* (versão não informada)	*Mullen Scales of Early Learning* Imagem com ressonância magnética
Sordillo *et al.* (2019)	Estados Unidos (Massachusetts)	Coorte	309	3-6	36	Sequenciamento da região V3-V5 RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado no Pyrosequencing data. O processamento das sequências foi realizado no Ribosomal Database Project Naive Bayesian Classifier version 2.2.	*Ages and Stages Questionnaire*
Tamana *et al.* (2020)	Canadá (Vancouver, Edmonton, Manitoba e Toronto)	Coorte	405	4 e 12	12 e 24	Sequenciamento da região V4 RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na plataforma Illumina MiSeq O processamento das sequências foi realizado no QIIME *software* (v 1.6.0)	*Bayley Scales of Infant Development III*

Quadro 6. Características gerais dos estudos que avaliaram a associação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil (continuação).

Referência	Origem País (cidade ou região)	Desenho do estudo	Tamanho amostral	Período de avaliação (meses)		Método de análise	
				Microbiota	Desenvolvimento	Microbiota	Desenvolvimento
Acuña *et al*. (2021)	Espanha (Granada)	Transversal	71	18	18	Sequenciamento da região V1-V2 RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na plataforma Illumina MiSeq O processamento das sequências foi realizado no European Molecular Biology Open Software Suite (versão não informada).	*Bayley Scales of Infant Development III*
Loughman *et al.* (2020)	Austrália (Barwon)	Coorte	201	1, 6 e 12	24	Sequenciamento da região V4 do RNA ribossomal 16S Sequenciamento realizado na plataforma Illumina MiSeq O processamento das sequências foi realizado no *software* Mothur (versão não informada)	*Child behaviour Checklist*

Nota**:** QIIME: *Quantitative Insights Into Microbial Ecology;* RNA: *Ribonucleic acid*.

Quadro 7. Principais resultados dos estudos que avaliaram a associação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil.

Referência	Análise estatística	Principais resultados
Carlson *et al.* (2018)	• LME • *Likelihood ratio* test sem e com ajuste por FDR.	• Foram identificados três *clusters* na MI infantil: representados por *Faecalibacterium*, *Bacteroides* e *Ruminococcaceae* Os *clusters* de *Bacteroides* e *Faecalibacterium* apresentaram maior e menor escore de desenvolvimento infantil, respectivamente; • O domínio de linguagem receptiva e expressiva foi diferente entre os três *clusters* da MI no período de dois anos de idade; • Houve correlação negativa entre o índice de alfa diversidade ChaoI e espécies observadas e diversidade filogenética *Faith's* com o escore do desenvolvimento cognitivo infantil aos dois anos de idade*;* • Observou-se correlação negativa entre o escore de linguagem expressiva com ChaoI e espécies observadas e diversidade filogenética *Faith's*; • Houve correlação negativa entre recepção visual e ChaoI, espécies observadas e índice de Shannon.
Sordillo *et al.* (2019)	• Correlação de Spearman • MaAsLin • Regressão linear e logística	• As pontuações para o fator 1 (aumento da abundância de *Lachnospiraceae* e *Clostridiales* com diminuição de *Bacteroides*) foram associadas ao menor escore do domínio de comunicação pessoal e social; • Observou-se correlação negativa entre os domínios de comunicação e a abundância de *Clostridiales*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcus*; • Não houve associação entre a diversidade da MI e o escore dos domínios de desenvolvimento infantil.
Tamana *et al*. (2020)	Modelo linear generalizado ajustado por tipo de parto, sexo, cor da pele, tipo de aleitamento materno com seis meses de idade, renda, IMC materno, presença de irmão mais velho e data da coleta.	• Não houve associação entre a abundância da microbiota intestinal infantil com quatro meses e o desenvolvimento com 12 e 24 meses de idade; •A abundância do gênero *Bacteroides* no período de 12 meses foi diretamente associada com os escores de domínios do desenvolvimento cognitivo e de linguagem aos 24 meses de idade.
Acuña *et al*. (2021)	PERMANOVA Teste de Wald bilateral ajustado por IMC pré gestacional e aleitamento materno	• Houve diferença entre a beta diversidade da microbiota intestinal infantil (weighted Unifrac) e as categorias acima e abaixo da mediana do domínio coordenação motora fina; • Houve maior abundância de *Turicibacter*, *Parabacteroides* na categoria abaixo da mediana do domínio de coordenação motora fina • *Collinsella*, *Coprococcus*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Holdemanella*, *Propionibacterium*, *Roseburia*, *Veillonella*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* foram mais abundantes na categoria acima da mediana da coordenação motora fina.

Quadro 7. Principais resultados dos estudos que avaliaram a associação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento infantil (continuação).

Referência	Análise estatística	Principais resultados
Loughman *et al.* (2020)	• PERMANOVA • Regressão linear e logística	• Não houve associação entre a abundância e a diversidade da MI em 1 e 6 meses de idade e o desenvolvimento infantil aos 24 meses de idade nos modelos ajustados. •A abundância de *Sutterella* com seis nesses foi menor em crianças com problemas comportamentais em 24 meses no modelo sem ajuste. • Houve associação entre a redução da abundância *Prevotella* em 12 meses de idade e problemas comportamentais aumentados em 24 meses.

Nota: LME= Modelo longitudinal de efeitos mistos; MI: Microbiota Intestinal; FDR= false discovery rate; MaAsLin= Modelos lineares multivariados para associação do microbioma.

3. JUSTIFICATIVA

O aleitamento materno exclusivo até seis meses e complementado até os dois anos são importantes determinantes da saúde infantil, a curto e longo prazo. O leite humano apresenta na sua composição, além de nutrientes, compostos bioativos, como os OLH. Estudos recentes sugerem que os OLH podem estar associados com o desenvolvimento da MI infantil. Contudo, a maioria desses estudos é *in vitro* e apresentam resultados contraditórios. studos clínicos sobre a associação entre OLH e a MI podem auxiliar na melhor compreensão sobre a relação entre OLHs específicos e bactérias intestinais importantes para a saúde do lactente. Esses estudos são ainda mais relevantes nos primeiros meses de vida, nos quais a MI é mais instável e vulnerável à disbiose intestinal.

Ademais, a MI no início da vida apresenta importantes funções na maturação do sistema imune e pode, inclusive, estar associada com o adequado crescimento e desenvolvimento infantil. Os primeiros meses de vida representam uma janela crítica para o crescimento e desenvolvimento infantil. Por exemplo, o ganho de peso rápido na infância é um fator de risco para o desenvolvimento da obesidade na vida adulta. Por sua vez, nos primeiros meses de vida também ocorre maior plasticidade cerebral e formação dos sistemas sensoriais e perceptivos. Dessa forma, a identificação e intervenção de fatores modificáveis associados com o crescimento e desenvolvimento infantil no início da vida podem ser mais efetivas comparadas a outras fases da vida. Ademais, o crescimento e desenvolvimento infantil inadequados podem estar relacionados a resultados econômicos e sociais desfavoráveis.

Estudos nacionais com o objetivo de avaliar a associação de OLH, MI, crescimento e desenvolvimento infantil são necessários, considerando que as concentrações de OLHs e a abundância da MI podem variar de acordo com a localização geográfica. Além disso, a metodologia do presente estudo apresenta importantes pontos positivos, como a análises de 19 OLHs por cromatografia líquida de alta eficiência e da MI por sequenciamento do RNAr 16S. Dessa forma, os resultados advindos dessa tese poderão preencher lacunas na literatura, considerando que são escassos os estudos na América Latina com essa temática, especialmente longitudinais. O conhecimento de bactérias que podem estar relacionadas com o adequado crescimento e desenvolvimento infantil poderá destacar a importância de fatores moduladores da MI, como o AME, e contribuir para o uso futuro de intervenções terapêuticas, como o emprego de probióticos, prebióticos ou simbióticos.

4. HIPÓTESES

Artigo 1

- Os filhos de mulheres secretoras apresentam maior abundância dos gêneros *Bifidobacterium* e *Bacteroides* na MI em comparação com os de não secretoras.
- A concentração de OLH está positivamente correlacionada com a composição de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium*, e negativamente correlacionada a bactérias com potencial patogênico, como *Echerichia coli*, na MI infantil.

Artigo 2

- A abundância relativa de bactérias com potencial benéfico, como *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, esta inversamente associadas ao maior ganho de peso rápido no primeiro ano de vida.
- A abundância relativa de bactérias com potencial benéfico, como *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, está diretamente associada ao escore dos domínios desenvolvimento infantil ao longo do primeiro ano de vida.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Estimar a associação entre as concentrações dos OLHs e a composição bacteriana da MI infantil e verificar a associação entre a MI e o crescimento e desenvolvimento infantil ao longo do primeiro ano de vida.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Artigo 1

i. Identificar *clusters* de acordo com o perfil de OLH no período de um mês pós-parto;
ii. Estimar a associação entre a concentração e o perfil de OLH e a composição da MI infantil no primeiro mês de vida do lactente.

5.2.2 Artigo 2

i. Avaliar a associação entre a composição da MI infantil no primeiro mês e os indicadores antropométricos infantis ao longo do primeiro ano de vida;
ii. Avaliar a associação entre a composição da MI infantil no primeiro mês e o desenvolvimento infantil ao longo do primeiro ano de vida.

6. MÉTODOS

6.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo com desenho do tipo coorte prospectiva com seis visitas. A linha de base do estudo ocorreu no pré-natal, entre a 28ª e 35ª semanas gestacionais. As ondas de seguimento ocorreram com 2-8 dias (onda 1), 28-50 dias (onda 2), 88-119 dias (onda 3), 180-216 dias (onda 4), e 365-404 dias (onda 5) (**Figura 6)**.

Foram elaborados dois artigos científicos com os dados do presente estudo. Para o primeiro artigo foram utilizados dados da linha de base e da segunda onda de seguimento, e o tamanho amostral foi de 44 participantes. Já para o segundo artigo foram utilizados os dados da linha de base e da segunda, quarta e quinta onda de seguimento. O tamanho da amostra para as participantes com crescimento e o desenvolvimento infantil foi de 54 e 53 participantes, respectivamente.

6.2 Local do estudo

O estudo foi realizado na Clínica da Família Assis Valente, localizada na Ilha do Governador, na cidade do Rio de Janeiro. A clínica funciona de acordo com o Programa de Saúde da Família e faz parte da Coordenadoria de Saúde da Área de Planejamento 3.1, que é responsável pelo atendimento de aproximadamente 24.000 moradores.

6.3 Amostra do estudo

As mulheres foram convidadas a participar do estudo se apresentassem os seguintes critérios de elegibilidade: idade entre 18 e 40 anos, realização do acompanhamento pré-natal no local de estudo, idade gestacional entre 28 e 35 semanas, estar livre de DCNT (exceto obesidade, IMC $\geq$ 30 kg/m^2) e de doenças infecciosas, não apresentar gestação gemelar e residir na área programática do estudo. Foram excluídas as participantes que desenvolveram algum problema da saúde, como pré-eclâmpsia ou diabetes gestacional, tiveram aborto ou recém-nascidos com problemas de saúde, como hipóxia neonatal. Adicionalmente, para esse estudo também foram excluídas as crianças em uso de antibiótico e sem dados de MI e OLH.

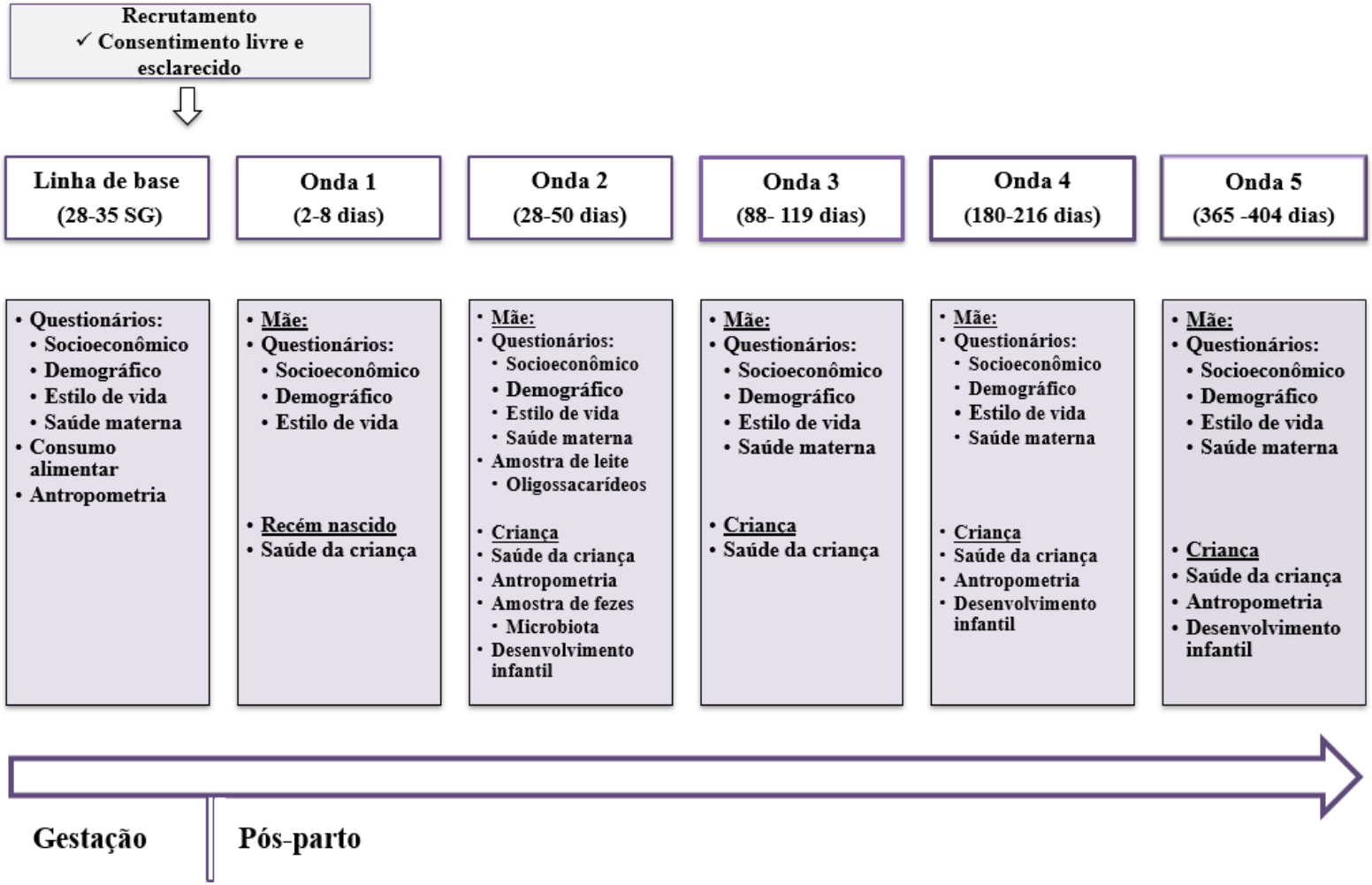

Figura 6. Fluxograma do estudo.
Nota: SG= semanas gestacional.

6.4 Treinamento e estudo piloto

Foram elaborados protocolos para a aplicação dos questionários, coleta de amostras biológicas e antropometria. Todos os entrevistadores foram treinados no período de julho a novembro de 2017. Em seguida, foi realizado estudo piloto na CSF Assis Valente com 12 participantes que foram acompanhadas entre novembro de 2016 a janeiro de 2017. Ao longo do período do estudo piloto, foram propostas e executadas modificações nos questionários, protocolos, aperfeiçoamento da avaliação antropométrica e logística do estudo.

6.5 Coleta e gerenciamento dos dados

O *Research Eletronic Data Capture* (REDCap) é um software que permite aos pesquisadores construir formulários de entrada de dados e realizar o gerenciamento do banco de dados. Os questionários foram aplicados por meio de aplicativo de acesso remoto do REDCap, em um *tablet* e de forma *offline*. Essa ferramenta é considerada segura para a construção e gerenciamento de dados (http://project-redcap.org/). O controle de qualidade na coleta de dados foi feito diariamente por meio da revisão dos questionários aplicados por outro entrevistador e, em seguida, esses dados eram enviados para o sistema do *Redcap*® (http://project-redcap.org/). O banco de dados era exportado do sistema a cada quinze dias com o objetivo de avaliar a qualidade dos dados e identificar possíveis erros.

6.6 Variáveis do estudo

6.6.1 Leite humano

O leite humano foi coletado na onda 2 (28-50 dias) na Clínica da Família Assis Valente, de acordo com as recomendações da Resolução de Diretoria Colegiada nº 171 (BRASIL, 2006) e da Rede de Banco de Leite Humano (BRASIL, 2007). Aproximadamente 17 mL de leite humano foram coletados manualmente pela própria lactante com suporte e supervisão da equipe do estudo. Foram utilizados para essa coleta tubos tipo Falcon de 50 mL, estéreis, livres de RNase e DNase e não pirogênicos. As

amostras foram imediatamente armazenadas em uma alíquota de 5 mL e 12 de 1 mL a -20ºC e, em seguida, transferidas para armazenamento a -80ºC no Instituto de Nutrição Josué de Castro da UFRJ, até o momento das análises. O tipo de aleitamento materno foi classificado de acordo com a OMS (BRASIL, 2009). A variável de aleitamento materno no estudo foi avaliada de forma dicotômica, considerando o AME como a categoria de referência *versus* o aleitamento materno predominante, parcial e complementado.

6.6.1.1 Concentrações de oligossacarídeos do leite humano

As amostras de leite materno foram transportadas da UFRJ para a Universidade da Califórnia (San Diego, EUA) em uma caixa térmica com temperatura controlada e com gelo seco para garantir que as temperaturas fossem próximas a -80° C até a chegada ao local de destino. A análise dos OLH foi realizada pela equipe do professor Lars Bode. Os OLHs foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção de fluorescência, sendo a rafinose o padrão interno. Os lipídios e proteínas foram removidos por extração em fase sólida e os glicanos foram marcados com 2-aminobenzamida e separados por CLAE com detecção de fluorescência (SEFEROVIC *et al*., 2020).Foram analisados 19 OLHs com base nas curvas de resposta padrão individuais e em relação ao padrão: 2'FL, 3FL, 6'SL, DFLNH, DSLNT, LNnT, LNFP I, LNFP II, LNFP III, 3'-sialilactose (3'SL), difucosilactose (DFLac), difucosilacto-N-tetrose (DFLNT), disiaililacto-N-hexaose (DSLNH), fucosil-disialacto-N-hexaose (FDSLNH), fucosilacto-N-hexaose (FLNH), lacto-N-hexaose (LNH), lacto-N- tetrose (LNT), sialil-lacto-N-tetraose b (LSTb) e sialil-lacto-N-tetraose c (LSTc). O status secretor materno foi determinado por meio da presença (secretoras) ou quase ausência (não secretoras) de 2'-FL e LNFP I.

6.6.2 Fezes infantil

As fezes do lactente foram coletadas diretamente da fralda pela própria mãe ou outro responsável até 48 horas antes da consulta realizada na segunda onda de seguimento (28-50 dias). A puérpera recebeu um tubo coletor de fezes e uma pá coletadora [*Globe Scientific* (Mahwah, EUA)], um saco com fecho hermético, uma caixa térmica e blocos de gelo rígidos reutilizáveis (Gelox). As mulheres foram orientadas a armazenar as amostras imediatamente após a coleta em freezer/congelador até o dia da consulta. As

amostras foram transportadas até a unidade de saúde em uma caixa térmica com gelox (**Figura 7**). Após o recebimento pela equipe, as amostras foram imediatamente armazenadas a -20°C e, posteriormente, a -80ºC.

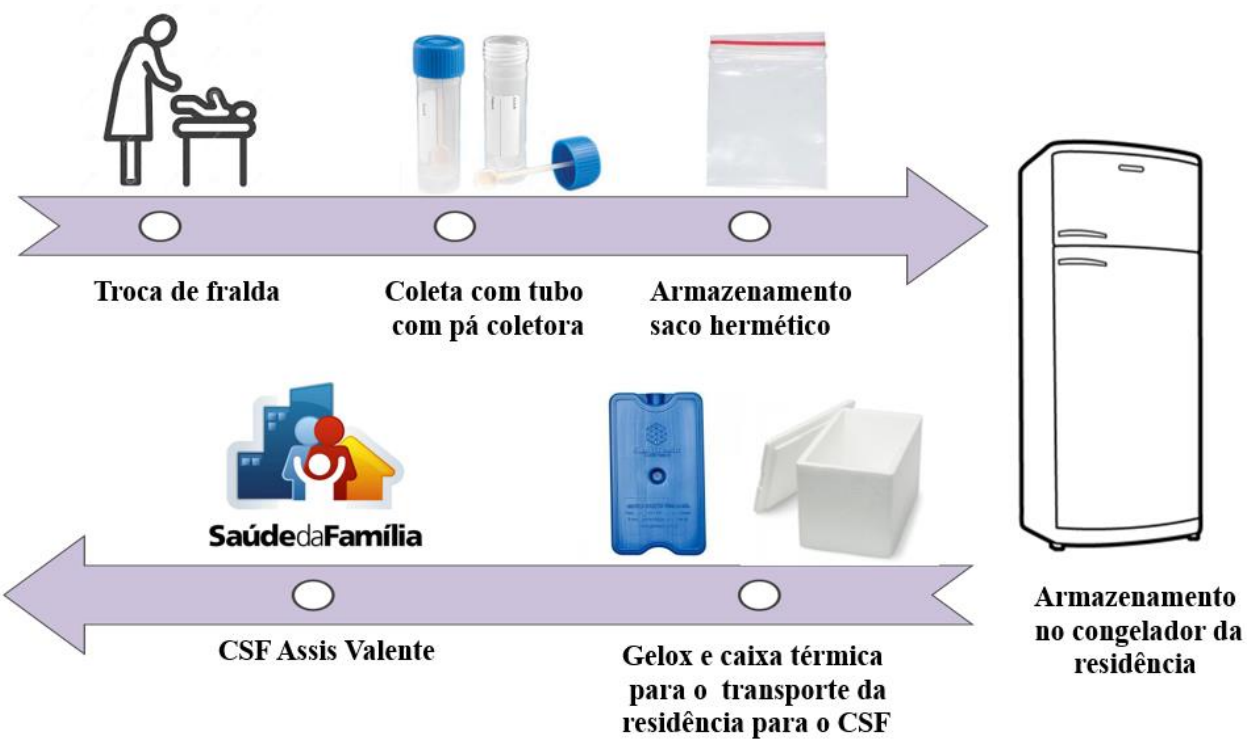

Figura 7. Fluxograma de coleta e armazenamento das amostras de fezes infantil.
Nota: CSF= Clínica de saúde da Família

6.6.2.1 Microbiota intestinal infantil

Extração de DNA das fezes

Para a identificação da microbiota das fezes, foi realizada a extração do DNA das amostras no Laboratório do *Center for Infection and Immunity*, sob supervisão do Professor Brent L. Williams. Para esta finalidade, foi utilizado o kit de extração QIAgen AllPrep DNA/RNA kit® (QIAgen, MD, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, adicionado de uma etapa prévia de ruptura celular mecânica, utilizando *beads* de vidro de 0,1 e 0,5 mm e RLT *buffer*® (QIAgen, MD, EUA). A concentração e pureza do DNA foi mensurada em espectrofotômetro NanoDrop ND-100 (*NanoDrop Technologies*, DE, EUA) e o DNA armazenado a -80 ºC. Adicionalmente, 10 controles negativos (sem a amostra de fezes) foram adicionados na extração.

Sequenciamento da região V4 do RNA_r 16S

O DNA obtido a partir das fezes do lactente foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se iniciadores específicos para a região V4 do gene que codifica o RNA ribossomal 16S (RNA_r 16S) adicionados de sequências específicas de nucleotídeos (*barcodes*) para identificação das amostras (CAPORASO *et al.*, 2012).

A PCR foi realizada de acordo com o protocolo padrão, descrito no *Earth Microbiome Project* (http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/). Em todas as reações foram incluídos 10 controles negativos de extração e três controles negativos para a reação de PCR (sem adição do DNA na reação).

A concentração e integridade dos produtos amplificados foram verificadas em gel de agarose a 1% (p/v) e em BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Os produtos da amplificação foram purificados por kit com *beads* magnéticas Ampure® (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, EUA) e, em seguida, quantificados por meio do kit Quanti-iT PicoGreen dsDNA Assay® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Concentrações equimolares de cada amostra foram combinadas em um *pool* para compor a biblioteca a ser sequenciada na plataforma Illumina MiSeq®. As análises do sequenciamento do RNA_r 16S foram realizadas no Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME2). As sequências geradas foram demultiplexadas pela ferramenta DEMUX, baseando-se nas sequências únicas dos barcodes. Os dados das sequências demultiplexadas foram submetidas a filtro de qualidade e truncadas (--p-trim-left 10, --p-trunc-len 275) a fim de reduzir qualquer viés de qualidade. Subsequentemente, Denoising foi realizado com a ferramenta DADA2 para geração de *Amplicon Sequence Variants (*ASVs). A identificação dessas sequências (255 nucleotídeos) foi realizada por meio do alinhamento com banco de dados específicos pré-treinados (Greengenes 13_8 99% truncadas para a região V4 limitada pelo par de iniciadores 515F / 806R). A ferramenta de *Feature table* foi utilizada para remover as sequências classificadas como cloroplasto e mitocôndria. Dessa forma, a tabela com as ASVs foi obtida com a abundância de cada nível taxonômico.

6.6.3 Crescimento infantil

O peso corporal da criança foi avaliado em balança pediátrica digital modelo 336 da marca Seca (Hamburgo, Alemanha), com precisão de 10 g e capacidade de 15 kg, sendo realizada com a criança sem roupas e acessórios. O comprimento infantil foi medido em infantômetro modelo 417 da marca Seca (Hamburgo, Alemanha), com precisão de 1 mm. O perímetro cefálico foi aferido utilizando uma fita de medição descartável da marca Seca modelo 211 (Hamburgo, Alemanha). Para o comprimento e perímetro cefálico foram realizadas duas medidas consecutivas para cálculo da média aritmética, admitindo-se uma diferença máxima de 0,5 cm para o comprimento e 0,2 cm para perímetro cefálico. Nos casos em que a diferença foi maior, uma terceira avaliação foi realizada para o cálculo da média dessas medidas. A avaliação antropométrica foi realizada em aproximadamente 30 dias (onda 2), seis meses (onda 4) e 12 meses (onda 5). O protocolo utilizado para realização dessas medidas seguiu as recomendações do manual antropométrico do estudo Intergrowth-21st (INTERGROWTH-21ST, 2012).

As curvas de crescimento infantil propostas pela OMS para sexo e idade foram utilizadas como referência (OMS, 2006). O escore z dos índices peso, comprimento e IMC para idade foram calculados por meio do programa Anthro, disponibilizado gratuitamente no site da OMS (https://www.who.int/tools/child-growth-standards/software). Adicionalmente, foi calculado o ganho de peso rápido por meio da diferença entre o escore z do peso/idade > 0,67 entre as ondas 2 e 4, e as ondas 2 e 5 (MONTEIRO; VICTORA, 2005).

6.6.4 Desenvolvimento infantil

O desenvolvimento infantil foi avaliado por meio da escala de rastreamento "*Ages and Stages Questionnaire version 3*" (ASQ-3), traduzida para o português (ASQ-BR). A versão original desse instrumento foi desenvolvida por Squires e colaboradores (2009), nos Estados Unidos, apresentando sensibilidade de 87,4% e especificidade de 95,7% (SINGH; YEH; BLANCHARD, 2017). No Brasil, Filgueiras e colaboradores (2013) fizeram a retrotradução dessa escala para o português e, também, a adaptação transcultural, com propriedades psicométricas consideradas satisfatórias.

O ASQ-BR pode ser aplicado em crianças de um a 60 meses de idade. No presente estudo essa escala foi aplicada em aproximadamente um mês (onda 2), seis meses (onda 4) e 12 meses (onda 5), por meio de entrevista com a mãe. Essa escala apresenta cinco

domínios: comunicação, coordenação motora ampla, coordenação motora fina, resolução de problemas e pessoal-social. Cada domínio desse questionário apresenta seis itens de resposta e o escore pode ter valores de zero a 60 pontos (SQUIRES *et al.*, 2009). Até o momento, não foram estabelecidos pontos de corte específicos desse instrumento para a população brasileira.

6.6.5 Covariáveis

Um questionário estruturado foi aplicado na linha de base da coorte para coletar informações sócioeconômicas, demográficas, reprodutivas e de estilo de vida. As seguintes variáveis foram coletadas: idade (anos), escolaridade (anos), tabagismo atual (sim/não), consumo atual de bebida alcoólica (sim/não), estado marital (vive com o companheiro ou não), renda familiar per-capita (reais) e paridade (número de filhos). A idade gestacional das mulheres foi calculada com base na informação do primeiro exame de ultrassonografia. Porém, se a gestante realizou o exame após 24 semanas de gestação foi utilizada a data da última menstruação para estimar a semana gestacional. As informações sobre o uso de antibiótico (sim/não) foram coletadas na gestação e nas demais ondas de seguimento. O tipo de parto (cesárea e vaginal) foi coletado na primeira onda de seguimento.

As mensurações antropométricas foram realizadas com procedimentos padronizados segundo Lohman e colaboradores (1988). O peso corporal da mãe foi avaliado em todas as consultas de acompanhamento, utilizando balança de coluna digital com capacidade de 300 kg da marca Seca modelo 704 (Seca, Hamburgo, Alemanha). As mães foram medidas sempre descalças com roupas leves e sem adornos e acessórios, como relógios. A estatura foi mensurada por meio de estadiômetro multifuncional Altura Exata (Altura Exata, Minas Gerais, Brasil). A medida foi feita em duplicata e a média calculada. Caso a diferença entre as duas medidas fosse superior a 0,5 cm, duas novas medidas eram realizadas. O IMC foi obtido por meio da fórmula: IMC= Peso/Estatura^2 e classificado de acordo com a OMS (WHO, 1995). O ganho de peso gestacional foi avaliado de acordo com a recomendação do *Institute of Medicine* (IOM, 2009).

6.7 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada por meio da construção de histogramas, medidas de assimetria, curtose e pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi realizada a análise exploratória de todos os dados para descrever as medidas de dispersão amostral, média, desvio-padrão, mediana e intervalo interquartilar, para as variáveis com e sem distribuição normal, respectivamente. Os dados categóricos foram apresentados como frequências absolutas e proporção (%). O teste U Mann-Whitney foi realizado para comparar medianas e o teste chi-quadrado ou teste exato de Fischer (n<5) para comparar proporções.

Análise de *cluster* por método hierárquico (*hierarchical clustering*) foi realizada para agrupar as mulheres de acordo com o perfil de OLH. Essa análise foi baseada na distância euclidiana entre as amostras, partindo-se de uma matriz de covariância dos OLHs de cada participante. Para a construção do dendrograma foi utilizado o *Ward's linkage method* ("dendextend" and "factoextra" packages in R).

A alfa diversidade refere-se à diversidade dentro de uma amostra específica (WHITTAKER, 1972) e foi avaliada por meio índice de Shannon, índice de Chao1 e diversidade filogenética (SPELLERBERG; FEDOR, 2003). A beta diversidade da MI foi calculada pelas métricas de dissimilaridade de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957), UniFrac ponderada, não-ponderada e generalizada (LOZUPONE; KNIGHT, 2005) e visualizada por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA). A beta diversidade avalia a mudança na diversidade de espécies entre as amostras (WHITTAKER, 1960; 1972) e a PCoA permite a exploração e visualização das diferenças e similaridades entre os dados (GROTH *et al*., 2013)

A avaliação entre OLH e a alfa diversidade da MI foi feita por meio do teste U de Mann-Whitney. Modelos de regressão linear com efeitos mistos foram utilizados para a análise longitudinal da associação entre a diversidade da MI com o crescimento e desenvolvimento infantil. O ganho de peso rápido foi analisado empregando-se a regressão logística. A análise de Variância Multivariada Permutacional pelo método de Freedman-Lane (PERMANOVA FL) foi utilizada para avaliar diferenças na beta-diversidade da MI infantil entre os OLH, crescimento e desenvolvimento infantil.

A análise discriminante linear pelo tamanho de efeito (LEfSe) foi utilizada para avaliar a composição da microbiota de acordo com os *clusters* de OLH (SEGATA *et al.*, 2011). Modelos lineares multivariados para associação do microbioma (*MaAsLin* 2 1.0.0

R package) foram utilizados para estimar a associação entre a abundância relativa de níveis taxonômicos bacterianos da MI infantil e os OLH, crescimento e desenvolvimento infantil.

Para as análises de associação com múltiplos testes, foi utilizado o método *False Discovery Rate* (FDR) proposto por Benjamini e Hochberg para ajuste dos valores de p encontrados (q-valor). Um q-valor menor que 0,25 foi considerado significativo para múltiplas comparações. Para as demais análises foi considerado estatisticamente significativos valores de p-valor < 0,05. Todas as análises foram realizadas no *software* estatístico STATA, versão 15.0, e R, versão 4.0.2.

7. RESULTADOS

A seção de resultados será apresentada no formato de dois artigos científicos elaborados para a tese de doutorado. O primeiro artigo intitula-se "*Associations between human milk oligosaccharides and infant gut microbiota in healthy Brazilian infants at one month of age"*/ "Associação entre oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil em crianças brasileiras saudáveis com 1 mês de idade" e será submetido na revista científica mBio. O segundo artigo intitula-se "*Association between infant gut microbiota and infant growth and development: Brazilian cohort throughout the first year"*/ "Associação entre a microbiota intestinal infantil com crescimento e o desenvolvimento infantil: Coorte brasileira ao longo do primeiro ano de vida" e será submetido após a defesa da tese.

.

7.1 Artigo 1

Associação entre oligossacarídeos do leite humano e a microbiota intestinal infantil em crianças brasileiras saudáveis com 1 mês de idade.

Associations between human milk oligosaccharides and infant gut microbiota in healthy Brazilian infants at one month of age.

Abstract

Human milk oligosaccharides (HMO) can promote the growth of beneficial bacteria in the infant gut microbiota. However, few clinical studies have investigated the associations between HMOs and infant microbiota composition, which may vary across geographic populations. In this study, we evaluated the association between HMOs and infant gut microbiota in a cross-sectional study consisting of 44 healthy Brazilian mother-infant dyads at approximately 1 month postpartum. The concentrations of 19 HMOs were quantified by high-performance liquid chromatography fluorescence detection. Infant gut microbiota was evaluated using high-throughput 16S rRNA gene sequencing. The most abundant bacterial taxa found in the infant gut microbiota were *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Clostridium*, and unclassified genera of *Enterobacteriaceae*. Using unsupervised hierarchical clustering based on the concentrations of HMOs, we identified three clusters: cluster 1 (n=5), which consisted of non-secretor women, and clusters 2 (n=16) and 3 (n=23), both based on secretor women. The secretor status was associated with infant microbiota beta-diversity based on the generalized UniFrac metric, and the individual concentrations of some HMOs (2' FL, LNnT, 3'SL, LSTb and LNH) were associated with microbiota beta-diversity among secretor women. Compared to secretor women, infants born to non-secretor women had lower relative abundance of *Bacteroides* and *Bifidobacterium* genera and higher relative abundance of the family *Enterobacteriaceae*, including the genus *Proteus*, in their microbiota. HMO cluster 3 had higher relative abundance of *Prevotella* genus compared to cluster 2. The concentrations of LNnT and DFLac were positively associated with infant *Bifidobacterium*, and LNH and FLNH were positively associated with infant *Akkermansia*. Additionally, we identified both positive (3'SL) and negative (LNFPI and LSTb) associations of HMOs with *Enterococcus*, and FLNH was negatively associated with *Clostridium*. Our findings suggest that maternal secretor status has a substantial impact on the composition of the infant microbiota, affecting the relative abundance of important bacterial taxa associated with infant health. The HMO cluster with two groups of secretors women had few associations with the infant microbiota, rather variation in individual HMO concentrations may be more important effectors of beneficial infant gut microbes among secretor women.

Keywords: gut microbiota, human milk oligosaccharides, secretor status, infant.

Introduction

Human milk is considered the best source for infant nutrition, and exclusive breastfeeding is recommended for the first 6-month of life for optimal infant growth and development (WHO, 2001; Fehr *et al*., 2020; Goldman *et al*., 2020). Human milk is a complex fluid that contains macronutrients, micronutrients, microorganisms, and several bioactive compounds, including the human milk oligosaccharides (HMOs) (Moore; Townsend, 2019; Fehr *et* al., 2020; Goldman *et al*., 2020). HMOs are complex glycans and have been investigated for their health benefits and influence on the infant's gut microbiota (Bode, 2012; Thomson; Medina; Garrido, 2017; Walsh *et al*., 2020).

Maternal genetics is considered one of the main factors that drive variation in HMO composition (Bode, 2012; Bode; Jantscher-Krenn, 2012). Indeed, the ability to express the fucosyltransferase2 (FUT2) enzyme is directly related to the quantity of alpha 1-2 fucosylated HMOs, which determines women's secretor status. Additionally, the Lewis gene encodes the enzyme fucosyltransferase-3 (FUT3), increasing alpha 1-4 fucosylated HMOs (Bode; Jantscher-Krenn, 2012). Other maternal factors, including gestational age at delivery, and time of lactation, in addition to environmental and modifiable factors, such as maternal nutritional status, can influence HMO composition (Bode, 2012; Thurl *et al*., 2017; McGuire *et al*., 2017; Tonon *et al*., 2019; Ferreira *et a*l., 2020; Han *et al*., 2021).

HMOs have a prebiotic effect in the gut as they are substrates for the growth of specific bacteria, modulating the infant's gut microbiota and providing health benefits (Bode, 2012; Thomson; Medina; Garrido, 2017; Walsh *et al*., 2020). For example, the most abundant HMO in the breast milk of secretor women, 2′-Fucosyllactose (2′FL), has been shown to selectively promote the growth of *Bifidobacteria* and *Bacteroides* species in *in vitro* studies (Ashida *et al*., 2009; Marcobal et al., 2010; Sakanaka *et al*., 2019). In contrast, pathogenic species belonging to the *Clostridium* genus do not seem to metabolize HMOs (Walsh *et al*., 2020). Therefore, HMOs provide a growth advantage to beneficial microbes over pathogens (Walsh *et al*., 2020). HMOs may also limit pathogen binding to host cells by directly binding to pathogens or host cell surface receptors (Walsh *et al*., 2020; Orczyk-Pawiłowicz; Lis-Kuberka, 2020).

The infant gut microbiota plays an essential role in neonatal programming, immune maturation, nutrient absorption, and overall health both short and long term (Jandhyala *et al*., 2015; Rowland et al., 2018; Robertson *et al*., 2019). During the first months of life, the infant's gut microbiota is highly dynamic and unstable. From two to three years, it becomes similar to that of an adult microbiota (Moore; Townsend, 2019). Early life is an essential period for the development of the gut microbiota, and understanding the factors that shape the microbiota during this period, especially the role of HMOs, is important for ensuring infant health (Moore; Townsend, 2019; Walsh *et al*., 2020)

Few clinical studies have addressed the relationship between HMOs and infant gut microbiota (Wang et al., 2015; Bai et al., 2018; Borewicz *et al*., 2019; Borewicz *et al*., 2020; Laursen *et al*. 2021). Furthermore, the findings across studies are inconsistent and vary according to HMO structure evaluated, methods used, and the study population profiled. To the best of our knowledge, no previous studies have investigated associations between HMOs and the infant gut microbiota with Brazilian participants, which may provide additional insights toward understanding variation in the microbiota and HMO composition by geography (McGuire *et al*., 2017; Thum *et al*., 2021). Therefore, this study aimed to evaluate the relationships between maternal HMO profiles, individual HMO concentrations, and infant gut microbiota composition in healthy Brazilian breastfed infants at approximately one month postpartum.

Methods

Study design, participants, and ethics

A cross-sectional study was conducted in a Public Health Care clinic in Rio de Janeiro, Brazil. Participant eligibility criteria included women: 18 to 40 years, singleton pregnancy, gestation of 28 to 35 weeks at recruitment, live in the programmatic area of clinic, and free of infectious and chronic diseases [except body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m²].

This study is part of a prospective birth cohort with a non-probabilistic sample of 147 participants recruited at the baseline (3rd trimester of pregnancy), from January 2017

to April 2019, and followed at five visits: 2–8 days (visit 1), 28–50 days (visit 2), three (visit 3), six (visit 4) and 12 months postpartum (visit 5). Women were excluded if they developed gestational diabetes or pre-eclampsia, delivered a stillborn, had a premature birth or neonates with pathology (e.g., hypoxia), or if infants received antibiotics from delivery. For this study, a subset of 44 mother-infant pairs were included, that met eligibility and exclusion criteria and with data for both HMOs and sequencing of the infant microbiota at visit 2 (**Figure 1**).

Research Ethics Committees of Municipal Secretariat of Health and Civil Defense of the State of Rio de Janeiro (Protocol number: 49218115.0.0000.5275) and the Maternity School of Rio de Janeiro Federal University (Protocol number: 49218115.0.0000.5275) approved this study. Written consent forms of all participants were obtained freely and spontaneously at baseline, after all necessary clarifications were provided following the Declaration of Helsinki's principles.

Breast milk collection and HMO analysis

Breast milk was collected at the study site between 28-50 days postpartum (visit 2), preferably in the morning and after breakfast, according to the Brazilian Network of Human Milk Banks protocol (ANVISA, 2007). The mother performed manual expression directly in a 50 mL sterile, ribonuclease (RNAse), and deoxyribonuclease (DNAse)-free and non-pyrogenic tube. Approximately 17 mL of milk was collected, aliquoted, and immediately frozen at -20ºC at the study site. Subsequently, the milk samples were transferred to the Federal University of Rio de Janeiro in a temperature-controlled box (-1ºC to -5ºC) and stored at -80°C.

The milk samples were shipped to the University of California San Diego (UCSD) on dry ice in a thermal box to ensure that temperatures were kept close to −80ºC. The HMOs were determined at UCSD by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL), according to the laboratory protocol described by Seferovic *et al*. (2020).

Absolute quantification of the following 19 HMOs was performed based on individual standard response curves and the internal raffinose standard: : 2′-fucosyllactose (2'FL), 3-fucosyllactose (3FL), 3'-sialyllactose (3'SL), 6'-sialyllactose (6'SL), difucosyllactose (DFLac), difucosyllacto-N-hexaose (DFLNH), difucosyllacto-N-tetrose

(DFLNT), disialyllacto-N-hexaose (DSLNH), disialyllacto-N-tetraose (DSLNT), fucodisialyllacto-N-hexaose (FDSLNH), fucosyllacto-N-hexaose (FLNH),lacto-N-fucopentaose (LNFP) I, LNFP II, LNFP III, lacto-N-hexaose (LNH), lacto-N-neotetraose (LNnT), lacto-N-tetrose (LNT), sialyl-lacto-N-tetraose b (LSTb), and sialyl-lacto-N-tetraose c (LSTc) were quantified. The maternal secretor status was determined by phenotype according to the presence or near-absence of 2'FL and LNFPI (McGuire *et al*., 2017; Azad *et al*., 2018).

Infant stool sample collection

Infant parents were counseled to collect at-home stool samples from diapers in a Globe's screw cap container (Globe Scientific, Mahwah, USA) and to immediately store in a sealed bag in the household freezer within 48 hours prior to their scheduled clinic visit (visit 2). The sample was transported to the clinic in a thermal box with reusable ice packs. At the clinic, samples were immediately frozen at -20ºC and subsequently transported to the Federal University of Rio de Janeiro in a temperature-controlled box (-1ºC to -5ºC) where they were stored in a -80 ºC freezer. Subsequently, stool samples were shipped to the Center for Infection and Immunity at Columbia University on dry ice in a thermal box and immediately stored at -80 ºC upon receipt.

Infant stool DNA extraction

The DNA extraction from stool samples was performed at the Center for Infection and Immunity at Columbia University. All materials used in the DNA extraction protocol were UV-irradiated twice at one inch from UV bulbs and at a setting of 3000 X 100 μJ/cm^2 in a spectroLinker XL-1500 UV crosslinker (Spectronics Corporation, NY, USA) to crosslink any contaminating DNA. DNA from infant stool samples was extracted using the QIAgen AllPrep DNA/RNA kit (QIAgen, MD, USA), adding a bead beating step using 0.1 mm and 0.5 mm glass beads (MoBio, CA, USA) in RLT buffer. Subsequent extraction steps were carried out according to the manufacturer's protocol. Negative extraction controls were included to evaluate any contaminating DNA introduced by the extraction. DNA concentration and purity were measured with a NanoDrop ND-100 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE, USA), and DNA was stored at -80ºC.

V4 Illumina MiSeq sequencing of bacterial 16S rDNA

DNA from infant stool samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with composite barcoded primers targeting the V4 region of the bacterial 16S rRNA gene to generate libraries for Illumina MiSeq sequencing according to the Earth Microbiome Project standard protocol (http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/) with minor modifications (Caporaso *et al*., 2012). For PCR of bacterial 16S rDNA from infant stool samples, consumables, and prepared master mix consisting of Accuprime polymerase and Buffer II (Invitrogen) and PCR grade water were UV-irradiated in a SpectroLinker XL-1500 UV crosslinker (3000 x 100 μj/cm^2) before PCR setup.

Once the prepared master mix was UV-treated, primers were added, and a restriction digestion was performed using two units each of Sau3AI and AciI at 37 ^{o}C for 30 minutes, then chilled on ice for 5 minutes before template DNA was added. The following controls were included: ten negative extraction controls, three negative PCR controls (no template), and three positive PCR controls (DNA from human stool). The PCR cycling conditions were as follows: 98^{o}C for 5 min, 35 cycles of 98^{o}C for 20 s, 53^{o}C for 25 s, 68^{o}C for 45 s, and a final extension at 68^{o}C for 10 min. Amplification products (2 μl) were run on a 1% agarose gel stained with GelGreen (Biotium, CA, USA) to verify amplification, and quantity/quality was determined on a BioAnalyzer. Extraction reagent controls and PCR reagent controls did not produce signal on agarose gels or BioAnalyzer. PCR products were further purified using Ampure magnetic purification beads (Beckman Coulter Life Sciences). Purified products were quantified with the Quanti-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen). Equimolar ratios of each sample were combined to create DNA pools of barcoded libraries for sequencing on Illumina MiSeq.

The 16S rRNA sequences obtained from Miseq sequencing were analyzed using QIIME2 (Bolyen *et* a*l*., 2019). All the raw FASTQ files were demultiplexed using the demux plugin within QIIME2 based on the unique barcodes. The demultiplexed sequences were quality filtered and trimmed (--p-trim-left 10, --p-trunc-len 275) to decrease any quality bias and prevent downstream inflation of Resolved Sequence Variants (RSV) counts. The sequences were further denoised to increase accuracy, and any chimeric sequences identified were removed using the dada2 plugin in QIIME2 to obtain a feature table with all resolved sequence variants. These feature sequences

(threshold 255 nucleotides) were aligned to the pre-trained GREENGENES 13_8 99% database (trimmed to the V4 region bound by the 515F/806R primer pair) to generate a taxonomy table using the classifier plugin. Feature table plugin was then utilized to remove any mitochondrial or chloroplast sequences. Finally, the RSV table was collapsed to obtain abundance tables at each taxonomic level for downstream analyses.

Covariates assessment

Socio-demographic and reproductive data were collected and managed using the Research Electronic Data Capture, an online system (REDCap, 2018). The following variables were collected using structured questionnaires: maternal age (years), education (years), parity (nulliparous /multiparous), and mode of delivery (vaginal/caesarian section). Information about breastfeeding practices considered infant's breast milk intake and other beverages or foods. Breastfeeding status was classified into two categories (exclusive/predominant or mixed breastfeeding). Exclusive/predominant breastfeeding categorized infants who received only breast milk as a nutrition source. Mixed feeding considered infants that received breast milk and infant formula. Medicines, water and/or tea, were occasionally consumed in both categories (WHO, 2007).

The gestational age was calculated based on data from the first ultrasonography (USG) examination (n=42), or in cases where the first USG was not performed before the 24^{th} gestational weeks, data of the last menstrual period was used instead (n=2). Birth weight (kg) was collected from the prenatal care booklet.

Self-reported pre-pregnancy weight or the weight retrieved from the prenatal care booklet was used. Maternal height was measured in duplicate at approximately one month using a stadiometer (Altura Exata, Belo Horizonte, Brazil). Pre-pregnancy BMI was calculated using the formula pre-pregnancy weight (kg)/height $(m)^2$ and was used to classify the women as underweight/normal weight (<25 kg/m²) or overweight/obese ($\geq$ 25 kg/m²) (IOM, 2009). Gestational weight gain (GWG) was calculated as the difference between the last weight measured in pregnancy, collected from the prenatal care booklet, and self-reported pre-pregnancy weight (IOM, 2009). All anthropometric measurements were obtained according to standardized procedures and recorded by trained interviewers (Lohman *et al*., 1988).

Potential confounders were selected based on main factors that have been previously described to impact HMO and infant gut microbiota composition: mode of delivery (vaginal/cesarean section), breastfeeding practice (exclusive/predominant or mixed breastfeeding), and pre-pregnancy BMI (kg/m²) (Kapourchali; Cresci, 2020; Han *et al*., 2021).

Statistical analyses

Data distribution was evaluated by histograms, kurtosis measures, and Shapiro–Wilk test. For continuous variables, characteristics of mother-infant pairs were described using mean/median and standard deviation/interquartile range (IQR), according to data distribution. Statistical analysis was performed by ANOVA or Kruskal–Wallis test, according to the data distribution. Absolute value (n) and relative frequency (%) were presented for categorical variables, and Fisher's exact test compared the proportions.

Unsupervised hierarchical clustering based the concentrations of all 19 HMOs measured in each mother was performed to identify groups of women based on their HMO profile. This clustering analysis was based on the squared Euclidean distance of the HMO covariance of each participant. The dendrogram was displayed using Ward's linkage method ("dendextend" and "factoextra" packages in R).

Analysis of microbial communities was performed by *phyloseq*, and graphics were generated by *ggplot2* packages in R (McMurdie; Holmes, 2013; Wickham, 2016). Gut microbiota composition was evaluated by alpha and beta diversity. Alpha diversity was assessed based on Chao1, Phylogenetic Diversity (PD), and Shannon index (*phyloseq* and *btools* R package). Differences in infant microbiota alpha-diversity between categorical variables were assessed by the Mann-Whitney U test. Beta diversity was assessed based on the Bray-Curtis dissimilarity index, unweighted, weighted, and generalized UniFrac distances. Differences in infant microbiota beta diversity and HMO clusters or individual concentrations were evaluated using Freedman-Lane Permutational Analysis of Variance (PERMANOVA-FL, *permanovaFL* function from *LDM* R package).

Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) algorithm was used to identify differentially abundant bacterial taxa (at all taxonomic levels) in the infant gut microbiota according to secretor status and HMO cluster 2 and 3 (Segata et al., 2011). We performed per-feature testing using Microbiome Multivariable Association with Linear Models

(*MaAsLin*2 1.0.0 R package), which uses general linear models, to assess associations between individual HMO concentrations and the relative abundance of bacterial taxa in the infant microbiota. Only taxa with a minimum relative abundance of 0.01% in at least 10% of samples were evaluated in the models. The taxa counts were normalized as Total Sum Scaling (*TSS*), and the bacterial taxa were log-transformed in the model. Differences for individual bacterial taxa were evaluated at phylum, genus, and specie levels. Only secretor women were included for analyses between individual concentrations of HMO and infant gut microbiota due to small sample size of non-secretor women and to reduce the interpretation bias from the women's genotype. *MaAsLin* and PERMANOVA-FL were adjusted for potential confounders (pre-pregnancy BMI, mode of delivery, and breastfeeding practices). Only analyses between secretor status and gut microbiota were not adjusted considering the small sample size.

All analyses were performed using STATA (version 15.0) or R (version 4.0.2) software. High-dimensional tests were corrected for multiple comparisons by controlling the false discovery rate using the Benjamini–Hochberg method with a target rate of 0.25 for *q*-value (Lim *et al*., 2016; Nejman *et al*., 2020) given the exploratory nature of this study. A $p < 0.05$ was considered significant for all other statistical tests.

Results

Study participant characteristics

For the 44 mothers evaluated in this study, the median age was 25.0 (IQR: 21.5-31) years, median schooling was 12 (IQR: 9.5-12) years, 88.6% were secretor women, and 54.5% were categorized as overweight or obese based on pre-pregnancy BMI (**Table 1**). The prevalence of vaginal delivery was 68.2%. The median infant age at sampling was 32 (IQR: 30-35.5) days. The prevalence of infants receiving exclusive/predominant breastfeeding was 79.5% and those receiving mixed breastfeeding was 20.5%. No infant was receiving complementary food, antibiotics, or probiotics from birth to sampling.

Breastmilk HMO profiles at 1 month postpartum

Unsupervised hierarchical clustering based on the concentrations of 19 measured HMOs in breastmilk revealed that the HMO profiles of each mother evaluated in this study clustered into one of three groups: cluster 1 (n=5), cluster 2 (n=16), and cluster 3

(n=23) (**Figure 2A**). Cluster 1 consisted of all non-secretor mothers in the study based on the absence of 2'FL and LNFPI (**Figure 2B** and **2C**). The remaining mothers from clusters 2 and 3 were all secretor mothers, indicating that all secretor mothers had one of two HMO profiles. In addition to the absence of 2'FL and LNFPI, non-secretor mothers (cluster 1) also had lower concentrations of 3'FL, DFLac, DFLNT, and DFLNH and higher concentrations of LNT, LNFPII and FDSLNH compared to secretor mothers (clusters 2 and 3) (**Figure 2B** and **2C**). Among secretor mothers, those with a clusters 2 HMO profile had a lower concentration of LNFPI but higher concentrations of LNFPII, LNFPIII, LNH, FLNH, and FDSLNH compared to secretor mothers with a cluster 3 HMO profile (**Figure 2B** and **2C**).

Given that, in addition to genetic determinants, other maternal factors can influence HMO concentrations, we compared maternal characteristics among the three HMO clusters (**Table 1**). HMO cluster 2 presented women with lower median of pre-pregnancy BMI (22.4 kg/m^2, IQR: 20.9-25.6 kg/m^2) than HMO clusters 1 (35.5 kg/m^2, IQR: 29.2-37.3 kg/m^2) and 3 (25.8 kg/m^2, IQR: 23.8-27.9 kg/m^2), p-value = 0.012. Median of BMI at one month postpartum was lower in HMO cluster 2 (24.8 kg/m2; IQR: 22.0; 26.4 kg/m^2) compared to clusters 1 (36.2 kg/m2, IQR 30.0; 42.4 kg/m^2) and 3 (27.5 kg/m2, IQR 25.2; 28.7 kg/m^2), p-value= 0.006 (**Table 1**).

Brazilian infant gut microbiota at 1 month postpartum

Bacterial 16S rRNA gene sequencing of the stool microbiota of the 44 infants evaluated in this study identified a total of 679 total number of Operational Taxonomic Units (OTUs), 11 bacterial phyla and 100 bacterial genera. Based on the mean percent relative abundance across the entire dataset, the most abundant phyla were *Proteobacteria* (32%), *Firmicutes* (30%), *Actinobacteria* (22%), and *Bacteroidetes* (15%) (**Figure 3**). The five most abundant genera across the entire dataset were *Bifidobacterium* (21%), unclassified genera of the *Enterobacteriaceae* family (15%), *Bacteroides* (14%), *Escherichia* (14%), and *Clostridium* (11%). In individual infants, one of these five genera was dominant (representing the highest relative abundance of any genera in a given infant) in the majority of infants. However, in some infants other dominant genera were observed at low frequency such as *Ruminococcus* (2 infants), *Veillonella* (2 infants), *Streptococcus* (1 infant), *Megasphaera* (1 infant) and *Parabacteroides* (1 infant) (see 'Others' group in **Figure 3**). We also identified a core set of genera present in at least

90% of infants, represented by *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Succinivibrio,* and *Veillonella*.

Influence of maternal secretor status and HMO profiles on the infant gut microbiota alpha and beta diversity

In order to determine whether maternal secretor status or HMO profiles are associated with differences in the infant microbiota, we first assessed differences in alpha and beta diversity of the infant microbiota. Infant microbiota alpha diversity, based on Chao1, Shannon index, and PD did not differ significantly between infants with secretor compared to non-secretor mothers. However, there was a trend for higher median alpha diversity based on the Shannon index in infants fed by secretor mothers (secretor: median 1.64, IQR: 1.08-2.04; non-secretor: median 1.24, IQR: 0.80-1.27, Mann-Whitney U test, p-value = 0.054) (**Figure 4A**). A significant difference in infant microbiota beta diversity based on the Generalized UniFrac metric was observed according to the mothers' secretor status (PERMANOVA-FL, p-value = 0.01) (**Figure 4B**).

As we identified two HMO profiles among secretor women (cluster 2 and cluster 3), we also evaluated whether these HMO profiles were associated with infant alpha and beta diversity. Infant microbiota alpha diversity did not differ significantly between infants with secretor mothers having a cluster 2 profile compared to those with a cluster 3 profile (**Figure 5A**). However, there was a trend for higher median alpha diversity based on the Shannon index in infants with mothers who have a cluster 3 HMO profile (Mann-Whitney U test, p-value = 0.069). No differences in infant microbiota beta diversity were observed comparing infants with HMO cluster 2 mothers compared to infants with HMO cluster 3 mothers (**Figure 5B**).

Influence of maternal secretor status and HMO profiles on the relative abundance of bacterial taxa in the infant gut microbiota

While differences in infant gut microbiota beta diversity were associated with secretor status, differences were not found between HMO clusters 2 and 3, despite substantial differences in HMO composition among the clusters. However, HMO profiles could have substantial influence on the relative abundance of bacterial taxa in the infant microbiota. Therefore, we evaluated differential abundance of bacterial taxa in the infant microbiota based on HMO clusters and secretor status. The relative abundance of

bacterial phyla and genera appeared most distinct among infants with non-secretor mothers (cluster 1) compared to infants with secretor mothers, regardless of whether they had a cluster 2 or 3 HMO profile (**Figure 6A** and **6B**). Differential bacterial abundance analysis using Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis revealed substantial differences in key bacterial taxa in infants with secretor mothers compared to infants with non-secretor mothers (**Figure 6C**). Infants with secretor mothers had higher relative abundance of *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* phyla as well as their corresponding genera, *Bifidobacterium* and *Bacteroides*, respectively. The family *Veillonellaceae* was also higher in infants with secretor mothers. In contrast, infants with non-secretor mothers had higher relative abundance of the family *Enterobacteriaceae*, as well as its corresponding genus *Proteus* and the genus *Coprobacillus* and the species *Lactobacillus salivarius*. While differences in the relative abundance of bacterial taxa were less apparent between infants with secretor mothers with cluster 2 compared to cluster 3 HMO profiles (**Figure 6D**).

Additionally, more infants with a gut microbiota in which *Bifidobacterium* was the dominant genera had mothers with cluster 2 HMO profiles (6/9, 67%), while more infants with a gut microbiota in which *Bacteroides* was the dominant genus had mothers with cluster 3 HMO profiles (7/9, 78%) (**Figure 3**). Differential abundance analysis of bacterial taxa with LEfSe, however, did not provide statistical support for these associations. *Lactobacillus inners*, *Prevotella* genus, as well as *Prevotellaceae* family differed in relative abundance between infants with secretor mothers with cluster 2 compared to cluster 3 HMO profiles were identified with LEfSe (**Figure 6D)**. Thus, these HMO profiles among secretor women appear to have little influence on the relative abundance of individual bacterial taxa.

Influence of individual HMOs on the infant gut microbiota of secretor women

Although HMO clusters among secretor women do not seem to be associated with changes in the infant microbiota, variation in individual HMOs among secretor mothers could influence the infant gut microbiota. In order to assess this possibility, we evaluated the associations of each individual HMO (concentration) with infant microbiota beta diversity among all infants with secretor mothers. We found that 2'FL and LSTb (based on weighted UniFrac), LNnT and 3'SL (based on generalized UniFrac and Bray-Curtis dissimilarity) and LNH (based on unweighted UniFrac) concentrations were significantly

associated with infant microbiota beta diversity, according to the PERMANOVA-FL test (**Table 2**). Thus, variation in the concentration of some HMOs among secretor mothers may influence infant microbiota composition.

Finally, we examined the relationship between individual HMOs (concentrations) among secretor women and the relative abundance of bacterial taxa using MaAsLin **(Figure 7** and **Supplemental Table 1)**. This analysis revealed a wide range of associations between individual HMOs and diverse bacterial taxa. HMO-bacteria associations were found for 15/19 HMOs. LNnT (q-value= 0.180) and DFLac (q-value= 0.180) were positively associated with the genus *Bifidobacterium*, and LNH (q-value= 0.089) and FLNH (q-value= 0.198) were positively associated with the genus *Akkermansia*. The genus *Enterococcus* was negatively associated with LNFPI (q-value= 0.058) and LSTb (q-value= 0.048). In addition, 3'SL also was positively associated with *Enterococcus* (q-value= 0.055) and *Roseburia* (q-value= 0.019). FLNH (q-value= 0.174) was negatively associated with *Clostridium*. These results suggest that variation in individual HMO concentrations among secretor women may exert a wide range of effects on the infant microbiota.

Discussion

This study has several interesting findings. First, the Brazilian infant gut microbiota at 1 month is predominately associated with high relative abundance of either *Bifidobacterium, Escherichia, Bacteroides, Clostridium*, or unclassified *Enterobacteriaceae* in individual infants. Second, we identified three HMO clusters in our sample with clear patterns of non-secretor women (cluster 1), and secretor women (clusters 2 and 3). While secretor status appears to have a large influence on important gut bacteria such as *Bacteroides*, *Bifidobacterium* and *Enterobacteriaceae*, HMO clusters among secretor women don't seem to appreciably influence the infant microbiota. However, we found important associations between individual HMO concentrations and the relative abundance of bacterial taxa present in the infant gut microbiota among secretor women.

We found high relative abundance of *Bacteroides* and *Bifidobacterium* in the infant gut microbiota, a result that has been previously reported by several studies with healthy breastfed infants (Tonon *et al*., 2021; Lackey *et al*., 2019; Talarico *et al*., 2017;

Palmer et al., 2007). Indeed, after establishing aerobic bacteria in the intestine after birth, anaerobic conditions support colonization by strict anaerobes, like *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, and *Clostridium* (Palmer, 2007). The abundance of *Escherichia* in the gut microbiota during the first month is reported to be lower in infants in the United States (California) than in Ethiopia and Peru (Lackey *et al*., 2019). Interestingly, previous studies conducted in Brazil found a high relative abundance of *Escherichia* in the infant gut microbiota during the first month of life (Brandt *et al*., 2012; Talarico *et al*., 2017). These authors suggested that this may be due to environmental factors in developing countries (Brandt *et al*., 2012). It is relevant to consider that the health care center where our study was conducted was localized in a low-income area.

We found a low prevalence of non-secretor women (11.4%) in the mothers evaluated in our study. This result contrasts with the prevalence in European countries such as Sweden and Spain, that reaches 21% and 24%, respectively (Erney *et al*., 2000; McGuire *et al*., 2017). Another Brazilian study with women from São Paulo found a similarly low prevalence of non-secretor women (10.3%) (Tonon *et al*., 2021). Other studies in Latin America countries, like Mexico and Peru, also observed a very low prevalence of non-secretor women, 0% and 2%, respectively. Indeed, the proportion of non-secretor women may vary according to geographic location (Castanys-Muñoz; Martins; Prieto, 2013). McGuire *et al*. (2017) hypothesized that secretor status varies geographically due to evolutionary pressures that have conferred 2'FL-related health benefits in Latin Americans. In our study, the secretor status was the main factor driving the HMO clusters as all non-secretor mothers separated from all secretor mothers in the dendogram. Maternal Lewis blood group antigen status could also influence HMO profiles and might also be a determinant of the HMO clusters. We speculate that cluster 2 may represent Lewis positive women, since this cluster has higher concentrations of LNFP II and III compared to cluster 3 (Bode *et al*., 2012). However, as there is no explicit cutoff for Lewis status, it was not possible to identify this group by phenotype in our study.

In our study, infants fed by secretor mothers have a higher relative abundance of *Bifidobacterium* and *Bacteroides* than infants with non-secretor mothers, which is likely related to a mother's genetically determined capacity to produce specific HMOs. Indeed, fucosylated HMOs, specially 2'FL, can promote the growth of some *Bifidobacterium* and

Bacteroides species, as demonstrated by *in vitro* studies (Ashida *et al.*, 2009; Marcobal *et al*., 2010; Sakanaka *et al*., 2019). In a study with 44 mothers and their breastfed children in the United States, infants fed by non-secretor mothers were delayed in establishing intestinal *Bifidobacterium* (Lewis *et al*., 2015). Bai *et al*. (2018) and Korpela *et al.* (2018) studied 56 Chinese and 91 Finish mother-child pairs, respectively and found a high relative abundance of *Bifidobacterium* in infants fed by secretor mothers compared to those fed by non-secretor mothers. In contrast, a recent cohort including 34 mother-infant dyads from Denmark reported no significant differences in relative abundances of *Bifidobacterium* ASVs or other in feces of infants comparing secretor to non-secretor mothers (Laursen *et al*. 2021). However, these results could be influenced by the recruitment period of the study, within 5–6.5 months postpartum, at which some participants were receiving complementary foods. Although our findings are consistent with prior studies, the small sample size of non-secretor women limits our conclusions regarding the influence of secretor status on the infant gut microbiota.

We also identified specific associations between individual concentrations of HMOs and the infant gut microbiota. LNnT, 2' FL, 3'SL, LSTb and LNH were all associated with infant microbiota beta diversity metrics. The concentrations of LNnT and DFLac were positively associated with *Bifidobacterium*, an important genus in infant health that may play a role in preventing allergic disease and necrotizing enterocolitis (Hidalgo-Cantabrana *et al*., 2017; Jiao *et al*., 2020). Similarly, Bai *et al*. (2018) found a positive correlation between the fucosylated HMOs and *Bifidobacterium* abundance in the infant gut microbiota at 6 and 42 days postpartum. Additionally, Laursen *et al*. (2021) reported significant negative correlations between absolute abundances of *Bifidobacterium* and fucosylactose, sialylactose, and lactoN-(neo)tetraose HMOs in infant's feces, which may reflect the higher consumption of these HMOs by these bacteria. Interestingly, we also found that LNH and FLNH were positively correlated with the genus *Akkermansia* and the species *Akkermansia muciniphila.* This mucin-degrading bacteria is associated with human health, such as protection from colitis, obesity, immune diseases, and cancer (Zhang et al., 2019). Indeed, some studies suggest that *Akkermansia* can grow on human milk and metabolize HMO structures (Geerlings *et al*., 2018; Kostopoulos *et al*., 2020). However, our study is the first to report an association between HMOs and *Akkermansia* in a clinical study.

We also found positive (3'SL) and negative (LNFPI and LSTb) associations of HMOs with *Enterococcus*. Borewicz *et al*. (2020) found a strong positive association between LNFPII, LNFP III, 3FL, and Lacto-N-fucopentaose V (LNFP V) and Lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II) with *Enterococcus* during the period of six and 12 weeks postpartum. The negative association between HMOs and *Enterococcus* may result from the bacteria's inability to metabolize HMOs (Marcobal *et al*., 2010). An explanation for the positive association between HMOs and *Enterococcus* is that these bacteria can cross-feed on HMO fermentation products or HMO breakdown by-products released by HMO degrading bifidobacteria (Borewicz *et al*., 2020).

Although we have found important associations between individual HMOs and bacterial taxa among secretor women, slight differences were found comparing the clusters of secretor women. At genus level, only *Prevotella* was different between the clusters 2 and 3, which was higher in the HMO cluster 3 compared to HMO cluster 2. *Prevotella* is a gram-negative bacterial genus, which have been associated with plant-rich diets, abundant in carbohydrates and fibers (Precup; Vodnar, 2019) Davis *et al*. (2017) found a positive correlation between *Prevotella* and LSTc among 33 Gambian mother/infant pairs at 4, 16, and 20 weeks postpartum. Despite of cluster 3 presented higher concentrations of LSTc, we did not find this association between *Prevotella* and LSTc.

Interestingly, we identified lower pre-pregnancy BMI and BMI at 1st month in women of HMO cluster 2, compared to clusters 1 and 3. Indeed, in a recent review, Han *et al*. (2021) reported that pre-pregnancy BMI could influence the concentrations of HMOs. However, the authors found that 2'FL was increased in mothers with higher pre-pregnancy BMI. According to Han *et al*. (2021), the association between pre-pregnancy BMI and HMOs could be the effect of a proinflammatory status induced by obesity. However, the mechanisms underlining the association between pre-pregnancy BMI and HMOs remain unclear (Han *et al*., 2021).

To the best of our knowledge, this is the first study to consider the analyses of HMO clusters with infant gut microbiota. However, our analysis found that HMO clusters in secretor women have no appreciable influence on the infant microbiota. Although, the HMO profile, represented by the clusters, could describe a broader picture of the HMO infant consumption, and may represent a better predictor of the impact over infant gut

microbiota than individual HMOs. On the other hand, it cannot identify significant associations between specific HMOs and bacterial taxa.

Some limitations and strengths of the present study should be highlighted. The main limitation is the small sample size, especially non-secretor women, and the observational study design. Nevertheless, the aim of the present study is a descriptive analysis and does not reflect causality. This study also demonstrates some significant strengths. Our study's first key strength is the quantification method of HMO concentrations with a rigorous analytical platform. In addition, we consider the HMOs groups in our analyses and the individual concentrations of HMOs. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the association between HMOs concentrations and infant gut microbiota in Brazilian mothers and infants.

In conclusion, our findings suggest that the maternal secretor status was the main factor influencing variation in HMO profiles. Although HMO differences were found in the secretor clusters, those differences did not seem to have an appreciable effect on infant microbiota composition. In addition, important associations were found between individual's HMOs and bacterial taxa, including genera related to human health, such as the relationship between FLNH and LNH with *Akkermansia* or LNnT and DFLac with *Bifidobacterium*. Some mechanisms between specific HMOs and microbiota profiles need to be fully elucidated, and future prospective studies with larger sample sizes are needed to assess causality.

References

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos. Brazil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária: ANVISA.2007; 156 p.
2. Ashida H, Miyake A, Kiyohara M, Wada J, Yoshida E, Kumagai H, *et al.* Two distinct alpha-L-fucosidases from Bifidobacterium bifidum are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. Glycobiology. 2009;19(9):1010-7.
3. Azad MB, Robertson B, Atakora F, Becker AB, Subbarao P, Moraes TJ, *et al.* Human milk oligosaccharide concentrations are associated with multiple fixed and modifiable maternal characteristics, environmental factors, and feeding Practices. J Nutr. 2018;148(11):1733-42.
4. Bai Y, Tao J, Zhou J, Fan Q, Liu M, Hu Y, *et al.* Fucosylated human milk oligosaccharides and n-glycans in the milk of chinese mothers regulate the gut microbiome of their breastfed infants during different lactation stages. msystems. 2018;3(6).
5. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. Glycobiology. 2012;22(9):1147-62.
6. Bode L, Jantscher-Krenn E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. Adv Nutr. 2012;3(3):383S-91S.
7. Bode L, Kuhn L, Kim HY, Hsiao L, Nissan C, Sinkala M, *et al.* Human milk oligosaccharide concentration and risk of postnatal transmission of HIV through breastfeeding. Am J Clin Nutr. 2012;96(4):831-9.
8. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nat Biotechnol. 2019;37(8):852-7.
9. Borewicz K, Gu F, Saccenti E, Arts ICW, Penders J, Thijs C, *et al.* correlating infant faecal microbiota composition and human milk oligosaccharide consumption by microbiota of one-month old breastfed infants. mol nutr food res. 2019:e1801214.
10. Borewicz K, Gu F, Saccenti E, Hechler C, Beijers R, de Weerth C, *et al.* The association between breastmilk oligosaccharides and faecal microbiota in healthy breastfed infants at two, six, and twelve weeks of age. Sci Rep. 2020;10(1):4270.
11. Brandt K, Taddei CR, Takagi EH, Oliveira FF, Duarte RT, Irino I, *et al.*

Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. Clinics (Sao Paulo). 2012;67(2):113-23

12. 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. ISME J. 2012;6(8):1621-4.
13. Castanys-Muñoz E, Martin MJ, Prieto PA. 2'-fucosyllactose: an abundant, genetically determined soluble glycan present in human milk. Nutr Rev. 2013;71(12):773-89.
14. Davis JC, Lewis ZT, Krishnan S, Bernstein RM, Moore SE, Prentice AM, *et al.* Growth and Morbidity of Gambian Infants are Influenced by Maternal Milk Oligosaccharides and Infant Gut Microbiota. Sci Rep. 2017;7:40466.
15. Erney RM, Malone WT, Skelding MB, Marcon AA, Kleman-Leyer KM, O'Ryan ML, *et al.* Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2000;30(2):181-92.
16. Fehr K, Moossavi S, Sbihi H, Boutin RCT, Bode L, Robertson B, *et al.* Breastmilk feeding practices are associated with the co-occurrence of bacteria in mothers' milk and the infant gut: the child cohort study. Cell Host Microbe. 2020;28(2):285-97.e4.
17. Ferreira AL, Alves R, Figueiredo A, Alves-Santos N, Freitas-Costa N, Batalha M, *et al.* human milk oligosaccharide profile variation throughout postpartum in healthy women in a brazilian cohort. nutrients. 2020;12(3).
18. Geerlings SY, Kostopoulos I, de Vos WM, Belzer C. in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How? Microorganisms. 2018;6(3).
19. Han SM, Derraik JGB, Binia A, Sprenger N, Vickers MH, Cutfield WS. Maternal and Infant Factors Influencing Human Milk Oligosaccharide Composition: Beyond Maternal Genetics. J Nutr. 2021;151(6):1383-93.
20. Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. Microbiol Spectr. 2017;5(3).
21. Institute of Medicine (IOM), National Research Council (NRC). Weight gain during pregnancy: reexamining the guidelines.Washington, DC: The National Academies Press; 2009.
22. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol.

2015;21(29):8787-803.

23. Jiao Y, Wu L, Huntington ND, Zhang X. Crosstalk Between Gut Microbiota and Innate Immunity and Its Implication in Autoimmune Diseases. Front Immunol. 2020;11:282.
24. Kapourchali FR, Cresci GAM. Early-Life Gut Microbiome-The Importance of Maternal and Infant Factors in Its Establishment. Nutr Clin Pract. 2020;35(3):386-405.
25. Korpela K, Salonen A, Hickman B, Kunz C, Sprenger N, Kukkonen K, *et al.* Fucosylated oligosaccharides in mother's milk alleviate the effects of cesarean birth on infant gut microbiota. Sci Rep. 2018;8(1):13757.
26. Kostopoulos I, Elzinga J, Ottman N, Klievink JT, Blijenberg B, Aalvink S, *et al.* Akkermansia muciniphila uses human milk oligosaccharides to thrive in the early life conditions in vitro. Sci Rep. 2020;10(1):14330.
27. Lackey KA, Williams JE, Meehan CL, Zachek JA, Benda ED, Price WJ, *et al.* What's normal? microbiomes in human milk and infant feces are related to each other but vary geographically: The INSPIRE study. Front Nutr. 2019;6:45.
28. Laursen, M.F, Pekmez, CT, Larsson, MW. *et al.* Maternal milk microbiota and oligosaccharides contribute to the infant gut microbiota assembly. ISME COMMUN 2021.
29. Lewis ZT, Totten SM, Smilowitz JT, Popovic M, Parker E, Lemay DG, *et al.* Maternal fucosyltransferase two status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. Microbiome. 2015;3:13.
30. Lim MY, Yoon HS, Rho M, Sung J, Song YM, Lee K, *et al.* Analysis of the association between host genetics, smoking, and sputum microbiota in healthy humans. Sci Rep. 2016;6:23745.
31. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Illinois: Human Kinetics Books. 1988.
32. Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB, Lebrilla CB, *et al.* Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. J Agric Food Chem. 2010;58(9):5334-40.
33. McGuire MK, Meehan CL, McGuire MA, Williams JE, Foster J, Sellen DW, *et al.* What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. Am J Clin Nutr. 2017;105(5):1086-100.

34. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS One. 2013;8(4):e61217.
35. Moore RE, Townsend SD. Temporal development of the infant gut microbiome. Open Biol. 2019;9(9):190128.
36. Nejman D, Livyatan I, Fuks G, Gavert N, Zwang Y, Geller LT, *et al.* The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. Science. 2020;368(6494):973-80.
37. Orczyk-Pawiłowicz M, Lis-Kuberka J. The impact of dietary fucosylated oligosaccharides and glycoproteins of human milk on infant well-being. Nutrients. 2020;12(4).
38. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. PLoS Biol. 2007;5(7):e177.
39. Precup G, Vodnar DC. Gut. Br J Nutr. 2019;122(2):131-40.
40. REDCap. [(accessed on 30 August 2018)]; Available online: http://project-redcap.org.
41. Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ. The human microbiome and child growth - first 1000 days and beyond. Trends Microbiol. 2019;27(2):131-47.
42. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, *et al.* Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. Eur J Nutr. 2018;57(1):1-24.
43. Sakanaka M, Gotoh A, Yoshida K, Odamaki T, Koguchi H, Xiao JZ, *et al.* Varied Pathways of Infant Gut-Associated. Nutrients. 2019;12(1).
44. Seferovic MD, Mohammad M, Pace RM, Engevik M, Versalovic J, Bode L, *et al.* Maternal diet alters human milk oligosaccharide composition with implications for the milk metagenome. Sci Rep. 2020;10(1):22092.
45. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol. 2011;12(6):R60.
46. Talarico ST, Santos FE, Brandt KG, Martinez MB, Taddei CR. Anaerobic bacteria in the intestinal microbiota of Brazilian children. Clinics (Sao Paulo). 2017;72(3):154-60.
47. Thomson P, Medina DA, Garrido D. Human milk oligosaccharides and infant gut Bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. Food Microbiol.

2018;75:37-46.

48. Thum C, Wall CR, Weiss GA, Wang W, Szeto IM, Day L. Changes in HMO Concentrations throughout Lactation: Influencing Factors, Health Effects and Opportunities. Nutrients. 2021;13(7).
49. Tonon KM, B de Morais M, F V Abrão AC, Miranda A, B Morais T. Maternal and infant factors associated with human milk oligosaccharides concentrations according to secretor and lewis phenotypes. Nutrients. 2019;11(6).
50. Tonon KM, Morais TB, Taddei CR, Araújo-Filho HB, Abrão ACFV, Miranda A, de Morais MB. Gut microbiota comparison of vaginally and cesarean born infants exclusively breastfed by mothers secreting α1-2 fucosylated oligosaccharides in breast milk. PLoS One. 2021 Feb 8;16(2):e0246839.
51. Thurl S, Munzert M, Boehm G, Matthews C, Stahl B. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. Nutr Rev. 2017;75(11):920-33.
52. Walsh C, Lane JA, van Sinderen D, Hickey RM. Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health. J Funct Foods. 2020;72:104074.
53. Wang M, Li M, Wu S, Lebrilla CB, Chapkin RS, Ivanov I, *et al.* Fecal microbiota composition of breastfed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2015;60(6):825-33.
54. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN. 2016. https://ggplot2.tidyverse.org.
55. World Health Organization. The optimal duration of exclusive breastfeeding. Report of an expert consultation. Geneva. 2001
56. 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.
57. Zhang T, Li Q, Cheng L, Buch H, Zhang F. Akkermansia muciniphila is a promising probiotic. Microb Biotechnol. 2019;12(6):1109-25.

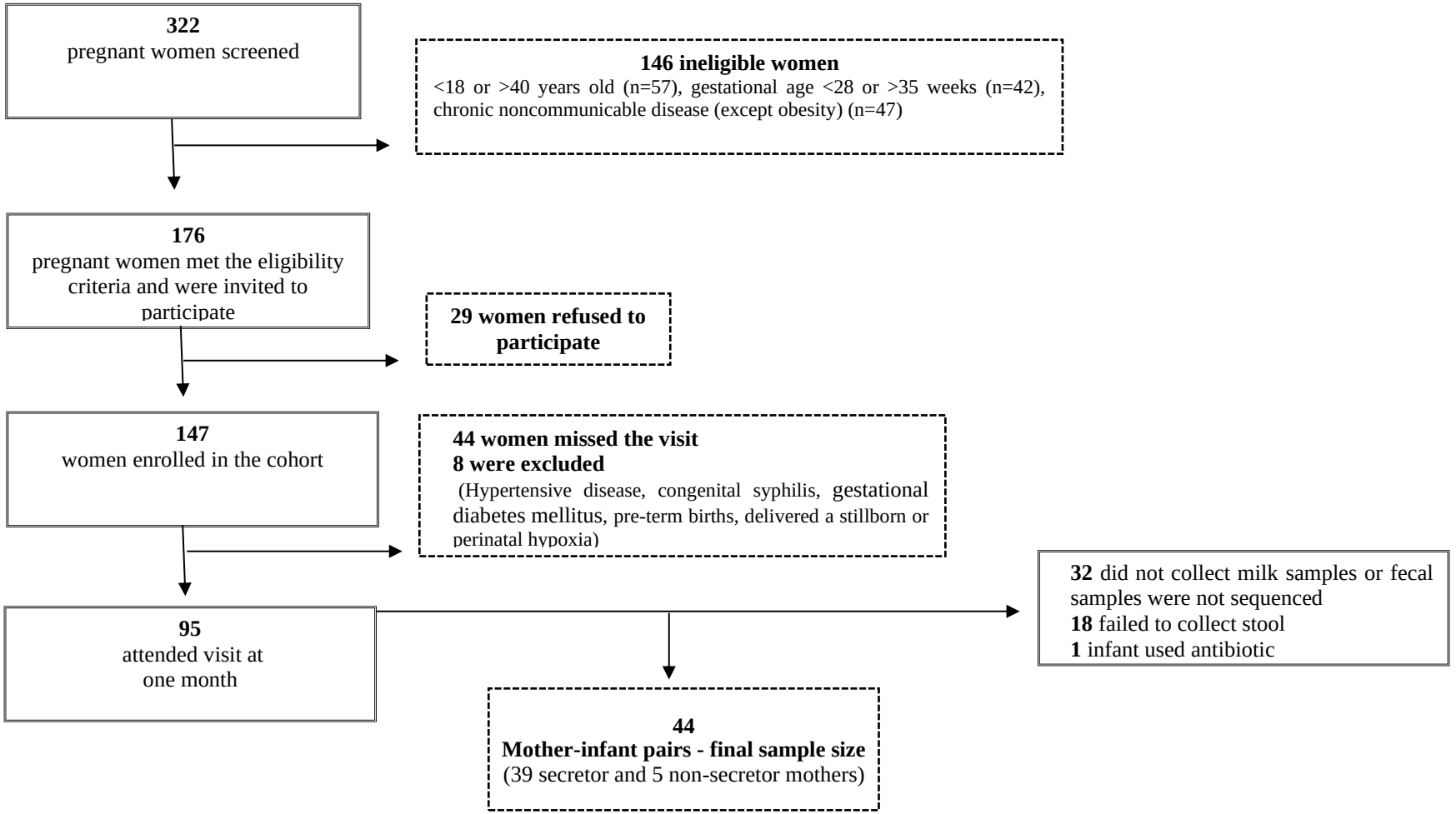

Figure 1. Flowchart of the study.

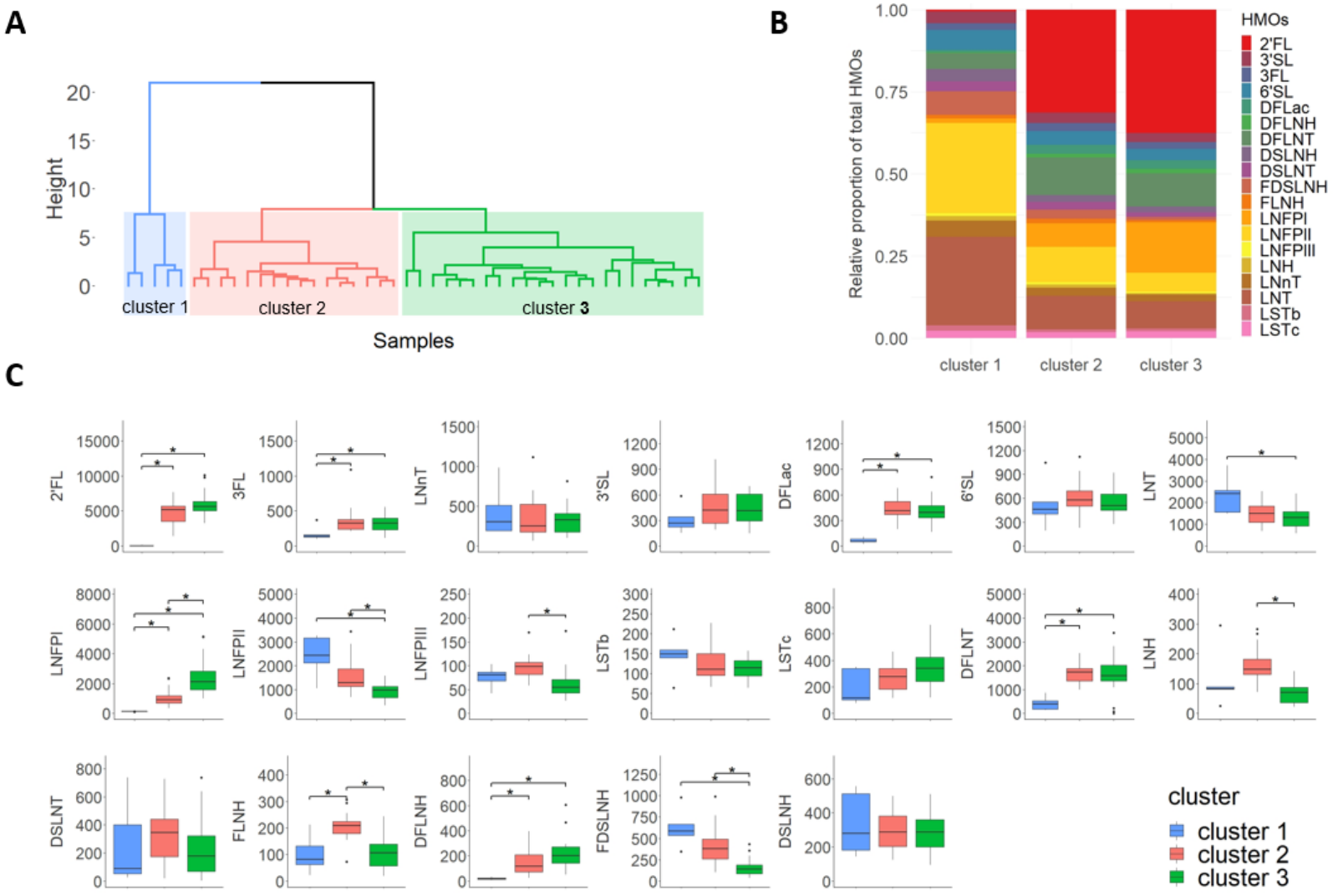
A
Height
20
15
10
5
0
cluster 1
cluster 2
cluster 3
Samples
B
Relative proportion of total HMOs
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
cluster 1
cluster 2
cluster 3
HMOs
2'FL
3'SL
3FL
6'SL
DFLac
DFLNH
DFLNT
DSLNH
DSLNT
FDSLNH
FLNH
LNFPI
LNFPII
LNFPIII
LNH
LNnT
LNT
LSTb
LSTc
C
2'FL
3FL
LNnT
3'SL
DFLac
6'SL
LNT
LNFPI
LNFPII
LNFPIII
LSTb
LSTc
DFLNT
LNH
DSLNT
FLNH
DFLNH
FDSLNH
DSLNH
cluster
cluster 1
cluster 2
cluster 3

Figure 2. HMO profile according to hierarchical clusters**.** (A) Hierarchical clustering dendrogram based on the squared Euclidean distance of the HMOs covariance of each mother (n=44). HMO clusters 1 (n=5); HMO cluster 2 (n=16), HMO cluster 3 (n=23). The height of the dendrogram indicates the order in which the clusters were joined. (B) Bar chart showing the proportion of all 19 HMOs in each of the three identified clusters. (C) Boxplots showing the concentrations of each of the 19 HMOs stratified by HMO clusters. The Mann-Whitney U test was used to evaluate differences between clusters. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. * = $p < 0.05$.

Figure 3. Relative abundance of the most abundant bacterial phyla (top panel) and genera (bottom panel) identified in infant gut microbiota at one month of age. Only taxa with maximal relative abundance > 0.05 across all samples are shown in the heatmap. Each column represents the microbiota of one infant (n=44). The samples are grouped by the most abundant (dominant) phyla (top panel) and genera (bottom panel) in each infant's microbiota. Maternal secretor status and maternal HMO cluster assignment are shown below each panel.

Table 1. Characteristics of mother-infant pairs in all study participants and according to maternal HMO cluster.

	All (n=44)		Non-secretor women (n=5)		Secretor women (n=39)				
			HMO cluster 1 (n=5)		HMO cluster 2 (n=16)		HMO cluster 3 (n=23)		
Continuous variable	**Median**	**IQR**	**Median**	**IQR**	**Median**	**IQR**	**Median**	**IQR**	**P-value [1]**
Maternal age (years)	25	21.5-31.0	33	20-35	23	21.5-28	26	22-33	0.337
Education (years)	12	9.5-12.0	12	9-12	12	10-12.5	12	9-12	0.589
Pre-pregnancy BMI (kg/m²)	25.3	22.4-28.0	35.5 [a]	29.2 – 37.3	22.4 [b]	20.9 – 25.6	25.8 [a]	23.8 – 27.9	**0.012**
Maternal BMI at one month postpartum (kg/m²)	26.64	24.3- 28.7	36.2[a]	30.0-42.4	24.8[b]	22.0- 26.4	27.5 [a]	25.2-28.7	**0.006**
Gestational weight gain (kg)	12.0	9.1-15.1	8.4	4.3-13.5	11.7	9.4-14.8	12.1	10-16.7	0.340
Infant age (days)	32	30.0-35.5	38	31-40	31.1	30-35.5	32	29-35	0.322
Birth weight (g)	3242.5	3037.5- 3520	3.560	3.490-3640	3.200	3.055-3.305	3.250	2.955-3530	0.169
Categorical variable					**Frequency (%)**				**P-value [2]**
Breastfeeding									0.582
Exclusive/Predominant	35 (79.5)		5 (100.0)		13 (81.2)		17 (73.9)		
Mixed feeding	9 (20.5)		0 (0.0)		3 (18.8)		6 (26.1)		
Mode of delivery									0.198
Vaginal	30 (68.2)		2 (40.0)		13 (81.2)		15 (65.2)		

Cesarean section	14 (31.8)	3 (60.0)	´3 (18.8)	8 (34.8)	
Pre-pregnancy BMI (kg/m²)					
Normal (<25.0)	20 (45.5)	1 (20.0)	11 (68.8)	8 (34.8)	0.057
Overweight/obese (≥ 25.0)	24 (54.5)	4 (80.0)	5 (31.2)	15 (65.2)	
Infant sex					
Male	20 (45.5)	4 (80.0)	6 (37.5)	10 (43.5)	0.268
Female	24 (54.5)	1 (20.0)	10 (62.5)	13 (56.5)	
Parity					
1	19 (48.7)	2 (50.0)	9 (56.3)	8 (42.1)	0.805
≥ 2	20 (51.3)	2 (50.0)	7 (43.7)	11 (57.9)	

HMO clusters were determined by unsupervised hierarchical clustering (Figure 2A) using the squared Euclidean distance of the HMOs covariance of each participant.
[1] P-values based on Kruskal–Wallis test, and Dunn's test was employed as the post hoc test.
[2] P-values based on Fisher's exact test.
[a, b] HMO clusters with different superscript letters are statistically different.
[3] Sample reduction due to missing data: parity (n=39); maternal BMI one month postpartum (n=42).
Significant p-values <0.05 are shown in bold.
IQR=Interquartile range, BMI=body mass index.

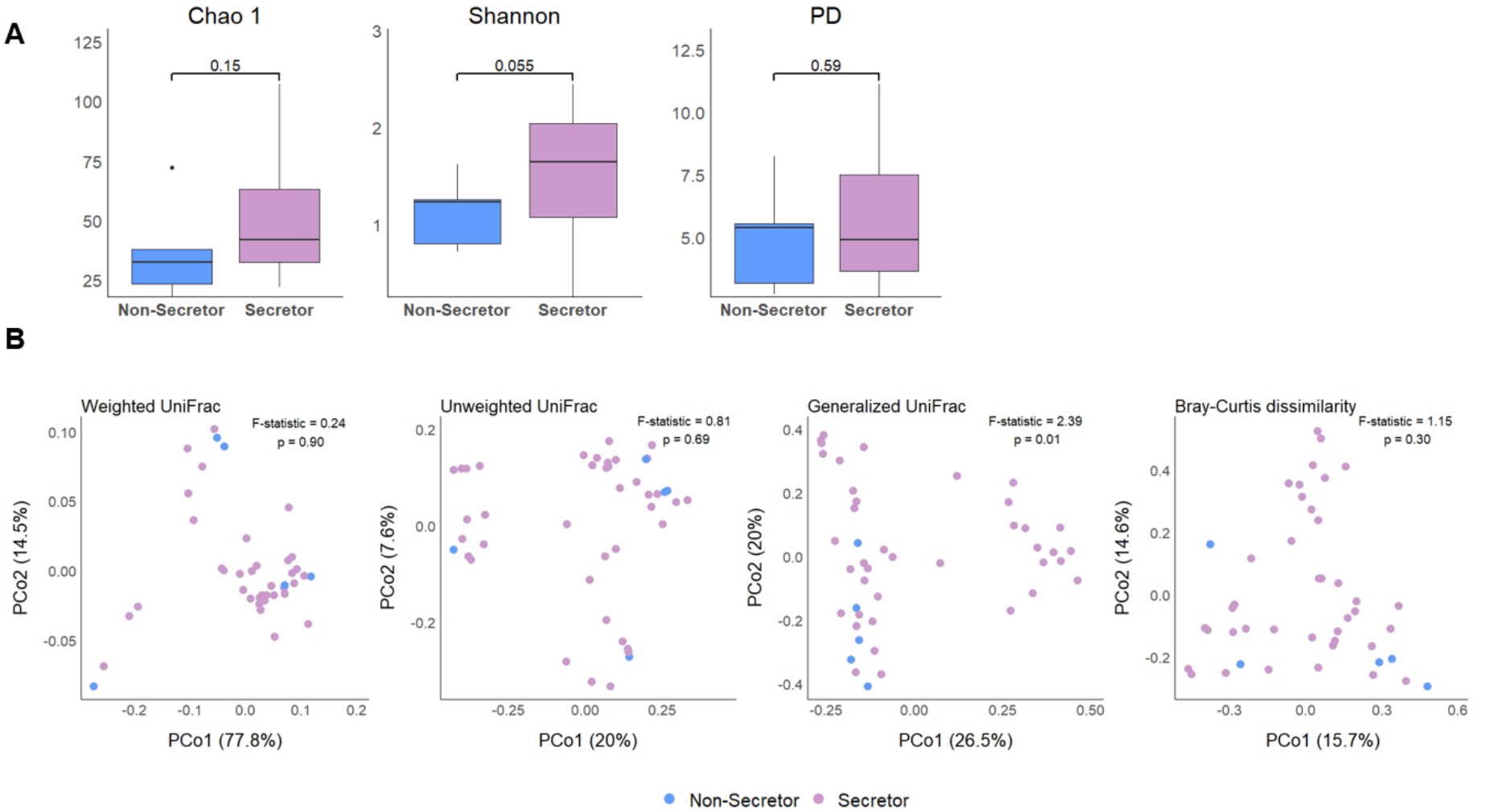

Figure 4. Associations of maternal secretor status with alpha and beta diversity of the infant gut microbiota. (A) Comparison of microbiota alpha diversity metrics Chao1, Shannon index and Phylogenetic Diversity (PD) between infants from secretor mothers (n=39) and non-secretor mothers (n=5). P-values based on the Mann–Whitney U test are shown. (B) Comparison of microbiota beta diversity metrics for weighted UniFrac, unweighted UniFrac, generalized UniFrac,

and Bray-Curtis dissimilarity between infants with secretor mothers (n=39) and non-secretor mothers (n=5). P-values based on the PERMANOVA-FL test are shown. P-value <0.05 was considered statistically significant in A and B.

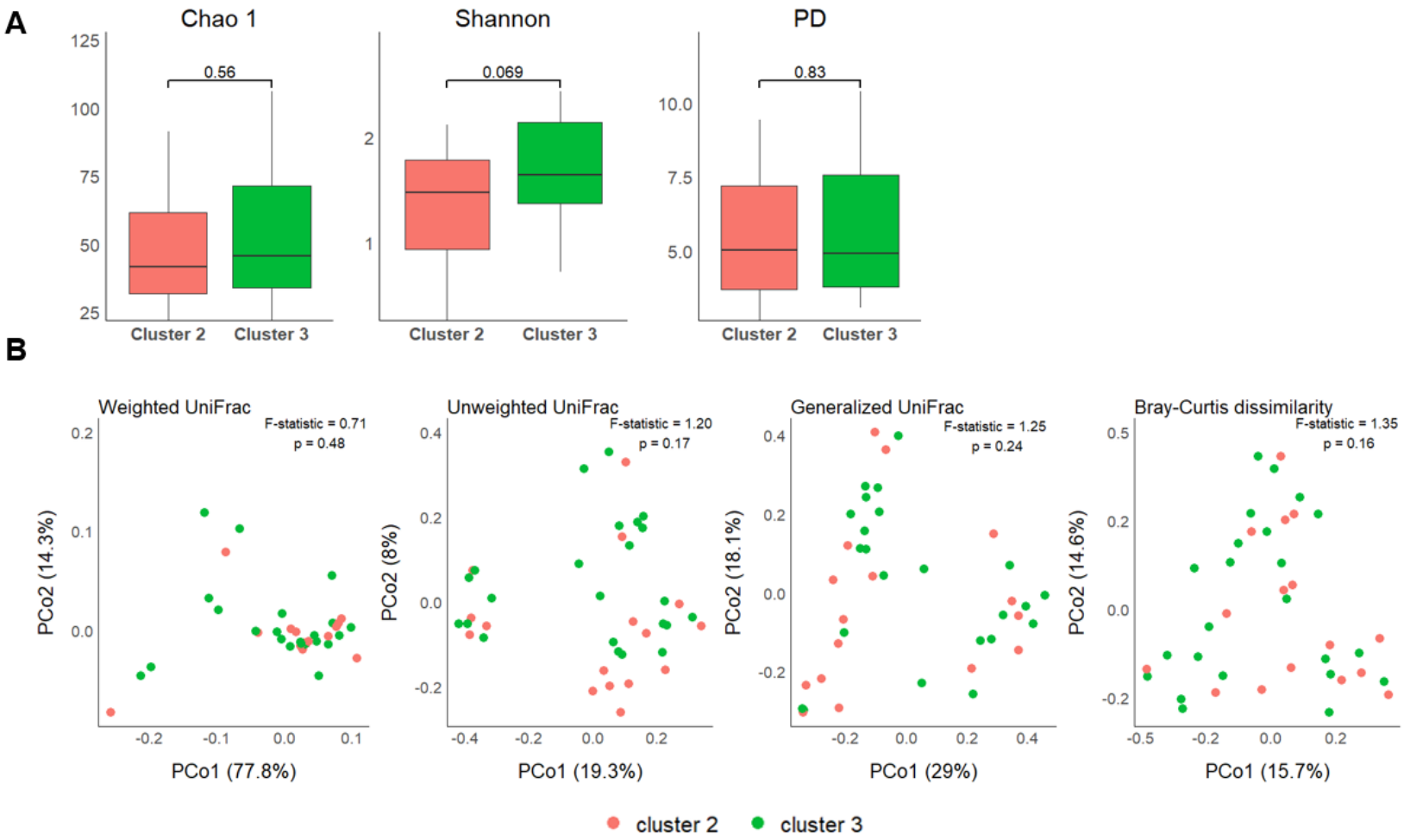

Figure 5. Associations of HMO clusters with alpha and beta diversity of the infant gut microbiota among secretor women. Comparison of microbiota alpha diversity metrics Chao1, Shannon index and Phylogenetic Diversity (PD) between infants from secretor mothers with a Cluster 2 (n=16) and Cluster 3 (n=23) HMO profile. P-values based on the Mann–Whitney U test are shown. (B) Comparison of microbiota beta diversity metrics for weighted UniFrac, unweighted

UniFrac, generalized UniFrac and Bray-Curtis dissimilarity between infants from secretor mothers with a Cluster 2 and Cluster 3 HMO profile. P-values based on the PERMANOVA-FL test are shown. P-value <0.05 was considered statistically significant in A and B.

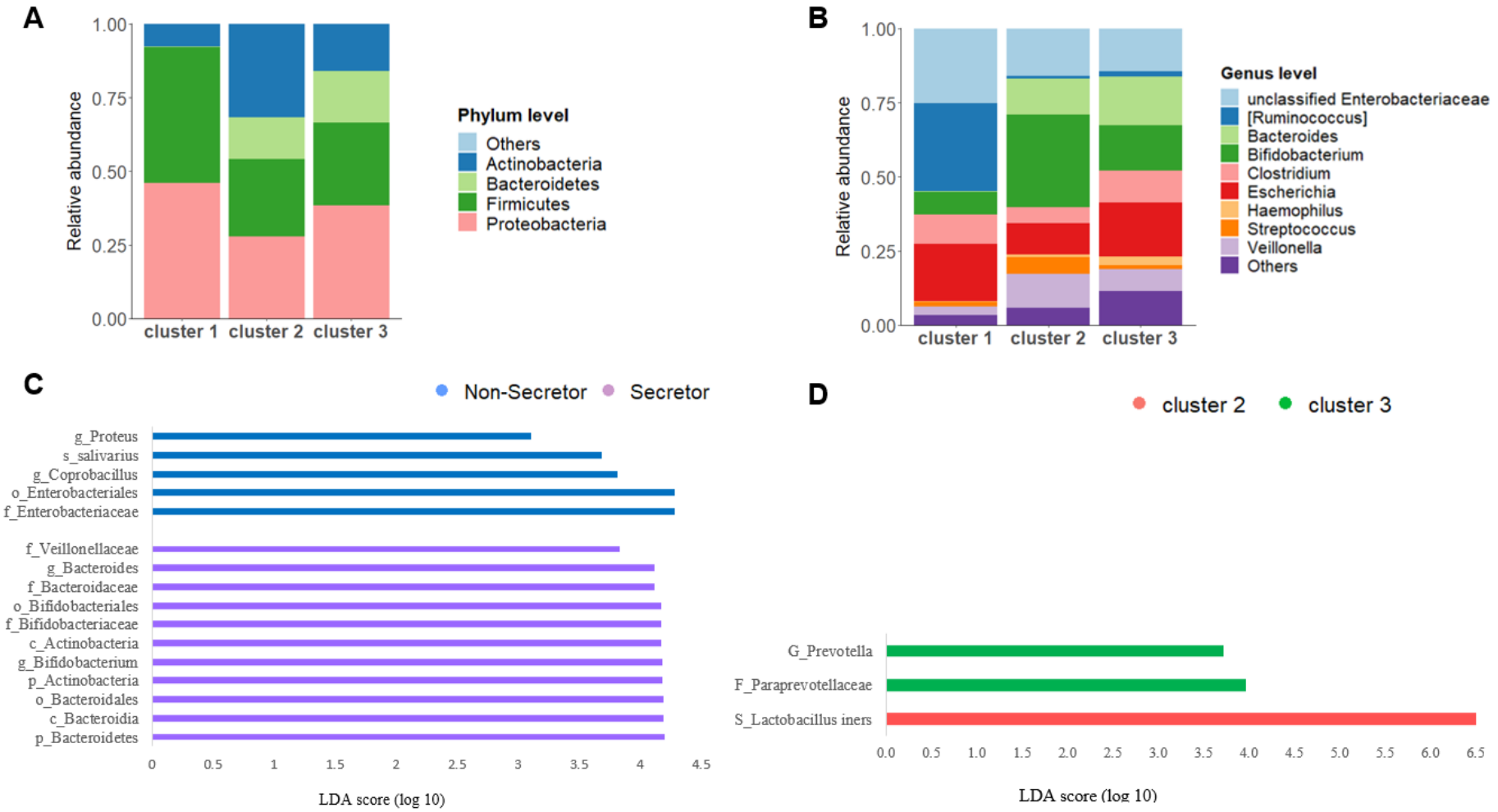

Figure 6. Differential relative abundance of bacterial taxa in the infant gut microbiota among infants from mothers with different HMO profiles and between mothers with secretor and non-secretor status. Bar plots showing the relative abundance of the most abundant phyla (A) and genera (B) in the infant gut

microbiota according to maternal HMO clusters. (C, D) Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis comparing the relative abundance of infant gut bacteria at all taxonomic levels (phylum to species) according to maternal secretor status (C) and HMO cluster among secretor women (D). A p-value <0.05 and LDA score >2 was used to define differentially abundant taxa using LEfSe. LDA: Linear discriminant analysis.

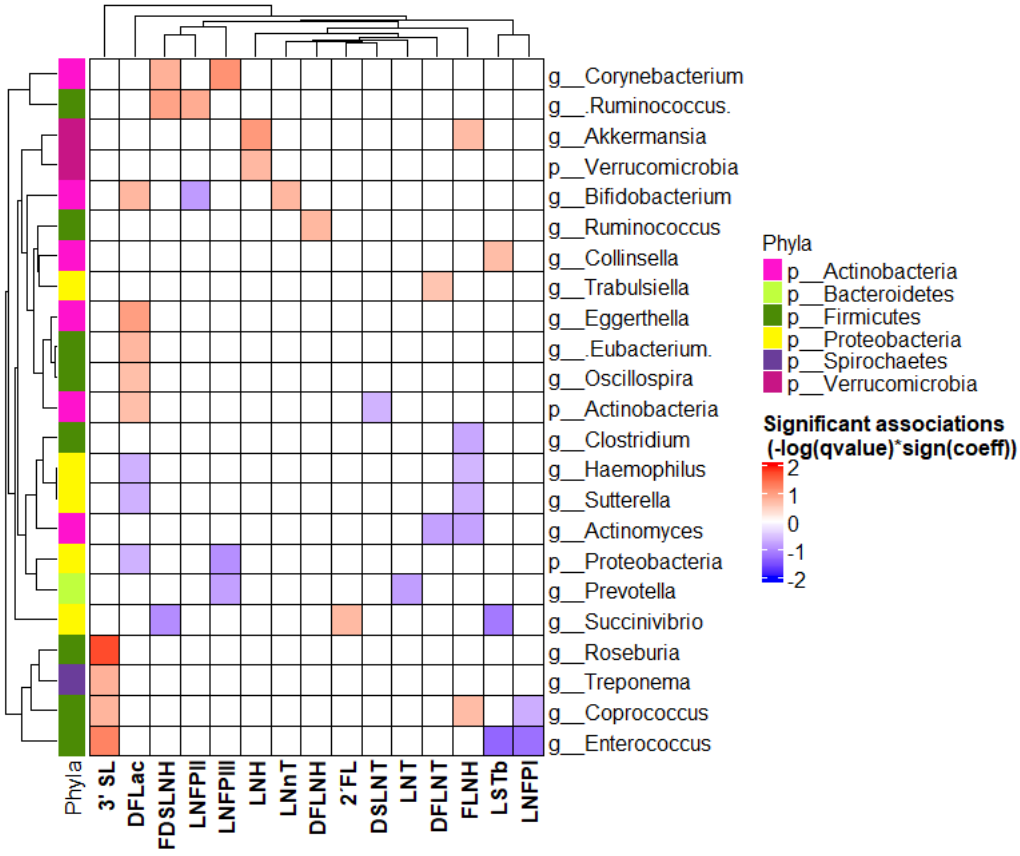

Figure 7. Heatmap summarizing the significant associations between microbial taxa at phylum and genus levels and HMO concentration between secretor women. The analysis was performed by MaAslin2. The models were adjusted for pre pregnancy body mass index (kg/m^2); mode of delivery (vaginal/cesarean section) and breastfeeding practice (exclusive and predominant/mixed feeding). Cells denoting significant associations are colored (red or blue) indicating the direction of association: blue indicates negative association and red indicates a positive association between microbial taxa abundance and HMO concentration. More intense colors denote lower q-values. q-value<0.25 was considered statistically significant.

Table 2. Associations between individual HMO concentrations and beta diversity of infant gut microbiota among secretor women.

HMOs concentrations	Beta diversity	F statistic	p-value
2'FL nmol/mL	Weighted UniFrac	6.649	0.010
LNnT nmol/mL	Generalized UniFrac	1.987	0.049
3'SL nmol/mL	Generalized UniFrac	2.154	0.038
	Bray-Curtis dissimilarity	1.718	0.033
LSTb nmol/mL	Weighted UniFrac	3.387	0.044
LNH nmol/mL	Unweighted UniFrac	2.051	0.005

Results based on PERMANOVA-FL tests. Only significant or trending relationships are shown. All other HMOs were not significant. The models were adjusted for pre-pregnancy Body Mass Index (kg/m^2); mode of delivery (vaginal/cesarean section) and breastfeeding practice (exclusive or predominant breastfeeding/mixed feeding).
P-value <0.05 was considered statistically significant.

Supplemental Table 1. Associations between HMOs concentration and bacterial taxa present in the infant gut microbiota among secretor women.

HMOs	feature (Taxa level)	β	SE	p-value	q-value
DFLac	p__*Actinobacteria*	0.36	0.14	0.016	0.217
	p__*Proteobacteria*	-0.27	0.13	0.046	0.217
	g__*Eggerthella*	0.19	0.07	0.007	0.100
	g__*Eubacterium*	0.28	0.11	0.018	0.180
	g__*Bifidobacterium*	0.38	0.15	0.019	0.180
	g__*Oscillospira*	0.14	0.06	0.030	0.213
	g__*Haemophilus*	-0.37	0.18	0.044	0.215
	g__*Sutterella*	-0.39	0.18	0.042	0.215
	s__*Eggerthella lenta*	0.19	0.07	0.007	0.165
DFLNH	g__*Ruminococcus*	0.19	0.08	0.021	0.181
DFLNT	g__*Actinomyces*	-0.25	0.09	0.010	0.156
	g__*Trabulsiella*	0.13	0.06	0.040	0.246
DSLNT	p__*Actinobacteria*	-0.38	0.15	0.016	0.221
FDSLNH	g__*Succinivibrio*	-0.12	0.04	0.007	0.102
	g__*Ruminococcus*	0.39	0.14	0.010	0.112
	g__*Corynebacterium*	0.18	0.08	0.020	0.154
	s__*Bacteroides uniformis*	0.34	0.15	0.024	0.219
2' FL	g__*Succinivibrio*	0.10	0.04	0.014	0.189
FLNH	g__*Actinomyces*	-0.24	0.10	0.020	0.160
	g__*Clostridium*	-0.50	0.21	0.024	0.174
	g__*Akkermansia*	0.19	0.08	0.030	0.198
	g__*Coprococcus*	0.10	0.05	0.033	0.200
	g__*Sutterella*	-0.40	0.18	0.036	0.215
	g__*Haemophilus*	-0.36	0.18	0.052	0.238
LNFPIII	p__*Proteobacteria*	-0.38	0.12	0.004	0.109
	g__*Corynebacterium*	0.23	0.07	0.002	0.076
	g__*Prevotella*	-0.18	0.07	0.011	0.151
	s__Prevotella copri	-0.20	0.07	0.004	0.135
LNFPII	g__*Ruminococcus*	0.38	0.14	0.010	0.137

	g__*Succinivibrio*	-0.11	0.04	0.012	0.137
	s__*Ruminococcus gnavus*	0.33	0.13	0.019	0.232
LNFPI	g__*Enterococcus*	-0.41	0.13	0.004	0.058
	g__*Coprococcus*	-0.10	0.05	0.034	0.197
LNH	p__*Verrucomicrobia*	0.24	0.08	0.007	0.184
	g__*Akkermansia*	0.23	0.08	0.007	0.089
	s__Akkermansia muciniphila	0.23	0.08	0.007	0.129
LNnT	g__*Bifidobacterium*	0.38	0.15	0.016	0.180
LNT	f__*Prevotellaceae*	-0.20	0.07	0.006	0.160
	g__*Prevotella*	-0.20	0.07	0.006	0.147
	g__*Enterococcus*	-0.42	0.12	0.002	0.048
LSTb	g__*Succinivibrio*	-0.12	0.04	0.003	0.069
	g__*Collinsella*	0.38	0.17	0.030	0.205
	s__*Pseudomonas rhizosphaerae*	-0.18	0.07	0.015	0.187
	g__*Roseburia*	0.18	0.05	0.000	0.019
3' SL	g__*Enterococcus*	0.40	0.13	0.003	0.055
	g__*Treponema*	0.16	0.06	0.020	0.157
	g__*Coprococcus*	0.10	0.04	0.025	0.168
	s__*Roseburia faecis*	0.17	0.05	0.001	0.058
	s__*Clostridium neonatale*	-0.47	0.19	0.018	0.216
HMO clusters	g__*Coprococcus*	-0.21	0.09	0.028	0.200
	g__*Veillonella*	-0.80	0.36	0.030	0.200

The analysis was performed using MaAslin2. The models were adjusted for pre-pregnancy body mass index (kg/m^2); mode of delivery (vaginal/cesarean section) and breastfeeding practice (exclusive and predominant/mixed feeding).
Only secretor women were included in this analysis (n=39).
β= linear mixed coefficient; SE= Standard error; the unadjusted p-value and Benjamini-Hochberg corrected p-value (q-value) are shown.
q-value<0.25 was considered statistically significant.

7.2 Artigo 2

Association between infant gut microbiota and infant growth and development: Brazilian cohort throughout the first year

Associação entre a microbiota intestinal infantil com o crescimento e o desenvolvimento infantil: coorte brasileira ao longo do primeiro ano de vida.

ABSTRACT

Background: Recent studies observed that microbiota composition can play a relevant role in infant growth and development. However, few clinical studies have investigated these associations. **Objectives:** To evaluate the association between early life gut microbiota and infant growth and development throughout the first year of life. **Methods**: Prospective cohort was conducted at Rio de Janeiro, Brazil, with mother-infant dyads with 28-35 gestational weeks (baseline) followed at one, six, and twelve months. Gut microbiota was evaluated using 16S rRNA sequencing (MiSeq) at one month. Anthropometric and infant development were assessed at one, six, and twelve months. Infant growth was evaluated using the weight/age, length/age, and BMI/age z score. Rapid infant growth was defined as a weight/age z score higher than 0.67 between two time points. The infant development was evaluated using the Age and Stages Questionnaire (ASQ-BR). Statistical analyses included linear mixed-effects regression, logistic regression, PERMANOVA-FL, and Maaslin2. Models were adjusted by mode of delivery, breastfeeding practices, pre-pregnancy BMI, and maternal schooling. **Results**. Infants with rapid growth (1-6 months) had a higher relative abundance of *Enterococcus* and *Proteus* than adequate growth. Positive associations were found between the abundance of *Eubacterium* and *Coprococcus* with the fine motor skills score at one month. This same domain at six months was also associated with a higher abundance of *Sutterella.* Alpha-diversity (Chao1 index) was positively associated with fine motor skills scores throughout the first year of life. Beta-diversity (*Unweighted UniFrac*) was associated with this same domain at one month. **Conclusion**. The early life microbiota was associated with rapid infant growth and development, especially for fine motor skills score.

Keywords: microbiota; Infant development; Infant growth, early life

Introduction

The gut harbors a variety of microorganisms, which constitute a complex ecosystem known as gut microbiota (Marchesi *et al*., 2016; Turroni *et al*., 2020). Multiple factors have been shown to affect the initial colonization of the gut microbiota, especially mode of delivery, feeding patterns, antibiotic use, host genetics, and geographical localization (Stewart *et al*., 2018; Lackey *et al*., 2019; Kapourchali; Cresci, 2020). The early life microbiota is essential for shaping the immune system, digesting food, regulating gut endocrine function and neurological signaling (Rowland *et al*., 2018; Yao *et al*., 2021). In fact, during the first months of life, the gut microbiome is a crucial regulator of infant short- and long-term health, and emerging evidence indicate that it can be associated with infant growth and development (Moore; Townsend, 2019; Kapourchali; Cresci., 2020; Qi *et al*., 2021).

Indeed, there is a greater interest in interventions on modifiable factors that can affect rapid infant growth, childhood obesity risk, and delay in infant development (Kapourchali; Cresci., 2020; Qi *et al*., 2021). According to Black *et al*. (2017), more than 200 million children under five years of age in developing countries do not reach their developmental potential, and 38 million have been classified as overweight worldwide. Moreover, investing in infant adequate growth and development is the key to improving health, economic, and social outcomes (SILVER; SINGER, 2014).

The role of altered microbiota composition on obesity and neuropsychological conditions has been suggested by experimental and clinical studies with adults (Järbrink-Sehgal; Andreasson, 2020; Crovesy *et al*., 2020; Qi *et al*., 2021). However, few clinical studies have evaluated the association between the early life microbiota and infant growth and development, especially considering longitudinal data with full-term infants (Carlson *et al*., 2018; Kamng'ona *et al*., 2019; Loughman *et al*., 2020; González *et al*., 2021; Alderete *et al*., 2021). In addition, to the best of our knowledge, no previous study has evaluated the association between early gut microbiota on infant growth and development in the Latin American population. Thus, we aimed to investigate if the gut microbiota at one month could influence the infant growth or development trajectories throughout the first year of life in a prospective cohort including full-term Brazilian infants.

Methods

Study design, eligibility criteria, and ethics

The present study comprises a prospective cohort conducted at a public health care center in Rio de Janeiro, Brazil. The study data collection occurred between January 2017 and January 2020. Eligibility criteria were pregnancy between 28 and 35 gestational weeks and age between 18 to 40 years, with no known infectious or chronic noncommunicable diseases (except obesity), singleton pregnancy, and residence in the catchment area of the public health center.

Data from the baseline (between 28 and 35 gestational weeks), one (28-50 days), six (180-223 days), and twelve (365-404 days) months were used for the current analysis. For the infant growth outcome, a subset of 54, 41, and 37 mother-infant pairs were included at one, six, and twelve months, respectively. For the infant development outcome, 53, 40, and 35 were included at one, six, and twelve months, respectively (**Figure 1**).

The Research Ethics Committees of the Municipal Secretariat of Health and Civil Defense of the State of Rio de Janeiro (Protocol number: 49218115.0.3001.5279) and the Maternity School of Rio de Janeiro Federal University (Protocol number: 49218115.0.0000.5275) approved this study. All participants' written consent was obtained freely and spontaneously at baseline, after all necessary clarifications were provided, following the Declaration of Helsinki's principles.

Infant stool sample collection

Infant parents were counseled to collect at-home stool samples from diapers in a Globe's screw cap container (Globe Scientific, Mahwah, USA) and immediately store it in a sealed bag in the household freezer within 48 hours before their scheduled clinic visit (visit 2). The sample was transported to the clinic in a thermal box with reusable ice packs. The samples were immediately frozen at the clinic at -20ºC and subsequently transported to the Federal University of Rio de Janeiro in a temperature-controlled box (-1ºC to -5ºC). They were stored in a -80 ºC freezer. Subsequently, stool samples were shipped to the Center for Infection and Immunity at Columbia University on dry ice in a thermal box and immediately stored at -80 ºC upon receipt.

Infant stool DNA extraction

The DNA extraction from the stool samples was performed at the Center for Infection and Immunity at Columbia University. All the materials used in the DNA extraction protocol were UV-irradiated twice at one inch from UV bulbs and at a setting of 3000 X 100 μJ/cm^2 in a spectroLinker XL-1500 UV crosslinker (Spectronics Corporation, NY, USA) to crosslink any contaminating DNA. DNA from infant stool samples was extracted using the QIAgen AllPrep DNA/RNA kit (QIAgen, MD, USA), adding a bead beating step using 0.1 mm and 0.5 mm glass beads (MoBio, CA, USA) in RLT buffer. Subsequent extraction steps were carried out according to the manufacturer's protocol. Negative extraction controls were included to evaluate any contaminating DNA introduced by the extraction. DNA concentration and purity were measured with a NanoDrop ND-100 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE, USA), and DNA was stored at -80^{o}C.

V4 Illumina MiSeq sequencing of bacterial 16S rDNA

DNA from infant stool samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with composite barcoded primers targeting the V4 region of the bacterial 16S rRNA gene to generate libraries for Illumina MiSeq sequencing according to the Earth Microbiome Project standard protocol (http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/) with minor modifications (Caporaso *et al*., 2012). For PCR of bacterial 16S rDNA from infant stool samples, consumables, and prepared master mix consisting of Accuprime polymerase and Buffer II (Invitrogen) and PCR grade water were UV-irradiated in a SpectroLinker XL-1500 UV crosslinker (3000 x 100 μj/cm^2) before PCR setup.

Once the prepared master mix was UV-treated, primers were added, and restriction digestion was performed using two units each of Sau3AI and AciI at 37^o C for 30 minutes, then chilled on ice for 5 minutes before template DNA was added. The following controls were included: ten negative extraction controls, three negative PCR controls (no template), and three positive PCR controls (DNA from human stool). The PCR cycling conditions were as follows: 98^{o}C for 5 min, 35 cycles of 98^{o}C for 20 s, 53^{o}C for 25 s, 68^{o}C for 45 s, and a final extension at 68^{o}C for 10 min. Amplification products (2 μl) were run on a 1% agarose gel stained with GelGreen (Biotium, CA, USA) to verify

amplification, and quantity/quality was determined on a BioAnalyzer. None of the extraction reagent controls or PCR reagent controls produced any signal on agarose gels or BioAnalyzer. PCR products were further purified using Ampure magnetic purification beads (Beckman Coulter Life Sciences). Purified products were quantified with the Quanti-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen). Equimolar ratios of each sample were combined to create DNA pools of barcoded libraries for sequencing on an Illumina MiSeq.

The 16S rRNA sequences obtained from Miseq sequencing were analyzed using QIIME2 (Bolyen *et al*., 2019). All the raw FASTQ files were demultiplexed using the demux plugin within QIIME2 based on the unique barcodes. The demultiplexed sequences were quality filtered and trimmed (--p-trim-left 10, --p-trunc-len 275) to decrease quality bias and prevent downstream inflation of Amplicon Sequence Variants (ASV) counts. The sequences were further denoised to increase accuracy, and any chimeric sequences identified were removed using the dada2 plugin in QIIME2 to obtain a feature table with all resolved sequence variants. These feature sequences (threshold 255 nucleotides) were aligned to the pre-trained GREENGENES 13_8 99% database (trimmed to the V4 region bound by the 515F/806R primer pair) to generate a taxonomy table using the classifier plugin. Feature table plugin was then utilized to remove any mitochondrial or chloroplast sequences. Finally, the ASV table was collapsed to obtain abundance tables at each taxonomic level for downstream analyses.

Infant growth

Infant anthropometric measurements in all follow-up points were standardized according to the International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century Study (Intergrowth-21st) Anthropometric Manual recommendations (INTERGROWTH-21st, 2012). For infant anthropometric measurements, weight, and length at one, six, and twelve months 12 of age were measured using standard World Health Organization procedures. Infant weight was measured using a digital scale Seca model 336 (Seca, Hamburg, Germany) and was performed with the infant without clothes and accessories. Infant length was measured using an infantometer Seca model (Seca, Hamburg, Germany). The length was measured in duplicate. The arithmetic mean was used to estimate (assuming a maximum difference of 0.5 cm between measurements). We calculated age- and sex-standardized anthropometric indices: length-for-age z-score

(LAZ), weight-for-age z-score (WAZ), and BMI for age z-score (BAZ) using the WHO Child Growth Standards (WHO, 2006). Rapid infant growth, defined as a weight-for-age z score higher than 0.67, was calculated during two periods: from one to six months and from one to 12 months (Monteiro; Victora, 2005).

Infant development

Infant development at one, six, and twelve months was evaluated using the Brazilian version of the Age & Stages Questionnaires (ASQ-BR). This screening scale was translated to Portuguese and adapted for Brazilian infants and had good psychometric characteristics (Eickmann *et al*., 2016; Silva *et al*., 2018; Filgueiras *et al*., 2013). The ASQ-3 assesses five developmental domains: gross motor skills, fine motor skills, problem-solving ability, communication, and personal and social skills. Each domain is assessed by six questions ascertaining achievement of relevant skills and answered as yes (10 points), sometimes (5 points), or not yet (0 points). Scores for individual items are summed to give an overall continuous score for each of the five domains. The infant scores results can vary between 0 and 60 points per domain.

Covariates

A structured questionnaire was administered at baseline to collect socio-demographic and reproductive data such as maternal age (years), education (years), parity (nulliparous /multiparous), smoking (yes/no), alcohol intake during pregnancy (yes/no), marital status (with a partner/without a partner). Data on the mode of delivery (vaginal/caesarian section) was self-reported during the first month. We also collected data on breastfeeding practices, considered the infant's breast milk intake and other beverages or foods in this period. Breastfeeding status was classified into two categories (exclusive/predominant or mixed breastfeeding). Exclusive/predominant breastfeeding considered infants who received only breast milk as a nutrition source. Mixed feeding considered infants that received breast milk and infant formula. Medicines, water and/or tea, were occasionally consumed in both categories (WHO, 2007).

The gestational age was calculated based on data from the first ultrasonography (USG) examination. Data on the last menstrual period was used instead in cases where the first USG was not performed before the 24^{th} gestational week. Birth weight (kg) and height (cm) was collected from the prenatal care booklet. Maternal antibiotic use (yes/no) was reported and collected according to medical records.

Self-reported pre-pregnancy weight or the weight retrieved from the prenatal care booklet was used. Maternal height was measured in duplicate at one month using a stadiometer (Altura Exata, Belo Horizonte, Brazil). Pre-pregnancy BMI was calculated using the formula pre-pregnancy weight (kg)/height $(m)^2$.

Statistical analyses

The distribution of continuous variables was assessed using histograms, kurtosis, and skewness measurements. We used absolute (n) and relative frequencies (%) for categorical variables and median and interquartile ranges for continuous variables to describe maternal characteristics

Global gut microbiota composition was evaluated by alpha and beta-diversity. Alpha-diversity (richness and evenness) was estimated by Chao1, Phylogenetic Diversity (PD), and Shannon index (phyloseq and btools R package). Linear mixed-effects (LME) regression was used to identify associations between infant gut microbiota alpha-diversity and continuous infants' outcomes with repeated measures (infant development and growth), and logistic regressions to alpha-diversity and categorized outcomes without repeated measures (rapid infant growth). The microbiota beta-diversity was measured by the Bray-Curtis dissimilarity index and unweighted/weighted/generalized UniFrac distances. The beta-diversity was evaluated using the Freedman-Lane Permutational Analysis of Variance (PERMANOVA-FL, permanovaFL function from LDM R package).

Differences for individual bacterial taxa were evaluated at phylum and genus level. We performed per-feature testing in the Microbiome Multivariable Association with Linear Models (MaAsLin2 1.4.0 R package), which uses general linear models to identify the associations between the bacterial taxa relative abundances and the continuous outcomes. To be accounted for in the models, a taxa feature needed to be detected at a minimum relative abundance of 0.01% in at least 10% of the samples. The taxa counts were normalized as Total Sum Scaling (TSS), and the bacterial taxa were log-transformed in the model.

All the models were adjusted for confounders selected according to biological plausibility and previous knowledge: maternal schooling, mode of delivery, breastfeeding practice, and pre-pregnancy BMI. In addition, length and weight at birth were included as adjustments for the models having LAZ or WAZ as outcomes, respectively.

The linear regression and MaAsLin2 were corrected for multiple comparisons by controlling the false discovery rate using the Benjamini–Hochberg method (q-values). A q-value <0.250 was considered significant (Lim et al. 2016; Nejman et al. 2020). A p-value < 0.05 was considered significant for further comparisons. All analyses were performed using STATA (version 15.0) or R (version 4.0.2) software.

Results

The maternal median age was 27.7 years, and they had 12 years of education at baseline and a pre-pregnancy BMI median of 25.3 kg/m². The maternal alcohol intake was reported by 45.3%, and 3.7% were smokers. A total of 70.4% of infants were born by vaginal delivery, and 66.7% received exclusive or predominant breastfeeding at one month (**Table 1**).

The *Bifidobacterium* genus and *Enterobacteriaceae* family were the most abundant taxa in the infant gut microbiota, with a mean relative abundance of 19 and 17%, respectively. These taxa, followed by *Bacteroides* (mean relative abundance 14%), *Escherichia* (14%), *Clostridium* (9%), *Veillonella* (9%), *Streptococcus* (2%), *Prevotella* (0.2%), *Staphylococcus* (0.1%) and *Succinivibrio* (0.01%), represent the core of genera found in at least 90% of our samples (**Figure 2)**.

The median (IQR) of Chao1, PD, and Shannon diversity index of the infant gut microbiome was 39.7 (33.6-53.4), 4.7 (3.7-6.4), and 1.6 (1.1-1.9), respectively. We found that for each one-unit increase in Chao1 index of infant gut microbiota, a longitudinal increase of 0.084 was observed in the fine motor skills score throughout the first year of life (p-value=0.044). The infant gut microbiota alpha-diversity did not differ significantly according to the other domains of infant development or infant growth parameters (**Table 2 and 3**)

No significant results were found for infant growth beta-diversity (**Table 4**). We found significant results for fine motor skills (unweighted UniFrac, p-value= 0.025) and personal-social scores (weighted UniFrac, p-value= 0.03 and generalized UniFrac, p-value= 0.04) at one month (**Table 5**). We observed significant results at 12 months for problem-solving (weighted UniFrac, p-value= 0.009) and personal-social scores (weighted UniFrac, p-value= 0.029) (**Table 5**). Positive associations were found between *Eubacterium* (β= 0.290; q-value= 0.186) and *Coprococcus* (β= 0.217; q-value= 0.087) with the fine motor skills score at 1 month. In this period, we also found that *Lactococcus* (β= -0.151; q-value= 0.197) and *Bilophila* (β= 0.314; q-value= 0.195) were associated

with personal-social score. At six months, *Sutterella* (β= 0.443; q-value= 0.166) and *Succinivibrio* (β= -0.103; q-value= 0.222) were associated with fine motor skills score. The *Protebacteria* phylum (β= 0.395; q-value= 0.248), *Acinetobacter* (β= -0.280; q-value= 0.218) and *Prevotella* genera (β= -0.152; q-value= 0.110) were associated with communication, problem-solving and personal-social, respectively (**Figure 3)**.

The prevalence of rapid infant growth was 29.2% (n=15), and 32.4% (n=12) between 1-6 months and 1-12 months, respectively. We found that infants with rapid growth from 1 to 6 months of age had higher abundance of *Enterococcus* (β= 1.04; q-value= 0.18) and *Proteus* (β= 0.83; q-value= 0.19) genera and lower abundance of *Ruminobacter* (β= - 0.36; q-value= 0.19) in their gut microbiota. In addition, positive associations were found between *Eubacterium* (β= 0.443; q-value= 0.009), *Blautia* (β= 0.356; q-value= 0.015), and *Lactococcus* (β= 0.192; q-value= 0.071) genera with LAZ. *Coprococcus* (β= -0.297; q-value= 0.237) was negatively associated with WAZ at one month. At six months, the *Megasphaera* genus was negatively associated with both LAZ (β= -0.4348; q-value= 0.181) and WAZ (β= -0.424; q-value= 0.230) (**Figure 4**).

Discussion

We found several interesting results regarding the association between bacterial taxa and infant growth and development in this prospective cohort study. We found that the alpha and beta-diversity of infant gut microbiota at one month was associated with the fine motor skills domain of infant development during the first year of life. *Coprococcus*, *Eubacterium,* and *Sutterella* were positively associated with fine motor skills scores at the taxa level. Moreover, we observed that infants with rapid growth from 1 to 6-months of age had higher relative abundances of *Enterococcus* genera in their gut microbiota.

Although the underlying mechanism of the association between the early microbiota and the infant growth and development is not yet fully understood, it seems to include the role of the microbiota in the immune system development and the nutrient absorption and metabolism, besides the modulation of host signaling pathways involved in lipogenesis and energy storage (Robertson *et al*., 2019; Paliy *et al*., 2014). In addition, the interaction between gut microbiota and the brain is bidirectional via the microbiota–gut-brain axis, which involves the tryptophan metabolism, vagus nerve, enteric nervous

system, and production of metabolites such as short-chain fatty acids (SCFAs) (Cryan *et al*., 2019; Robertson *et al*. 2019).

The abundance of the infant gut microbiota in our study was in line with those previously described infants in early life among Brazilian infants (Talarico *et al*., 2017; Tonon *et al*., 2021). According to our results, the alpha-diversity of infant gut microbiota was positively associated with the fine motor skills domain. Curiously, a high alpha-diversity in earlier life implies a more mature microbiota, which used to be associated with adverse health outcomes (Turroni *et al*., 2020). However, alpha-diversity does not capture other aspects of taxonomic composition and functional products of specific taxa that may be most relevant to infant outcomes (Sordillo *et al*., 2019; Turroni *et al*., 2020). In addition, we found that beta-diversity was associated with fine motor skills and personal-social scores at one month and problem-solving and personal-social scores at 12 months. Our finding is consistent with recent evidence, which found an association between microbiota beta-diversity and fine motor skills domain in 71 full-term infants from Spain at 18 months of age (Acuña *et al*., 2021).

The fine motor skills domain is a key for children's early development and involves using smaller muscles, such as object manipulation with the help of hands and fingers. This domain is also a predictor of language development (Gonzalez *et al*., 2019). In our study, *Coprococcus*, *Eubacterium*, and *Sutterella* were positively associated with fine motor skills scores. Indeed, *Coprococcus* and *Eubacterium* are butyrate-producers (Pryde *et al*., 2002; Mukherjee *et al*., 2020), which is a SCFAs, and could be related to brain health. In addition, *Sutterella* is a tryptophan-metabolizing bacteria (Zhang *et al*., 2020), which plays a role in the microbiota-gut-brain axis (Cryan *et al*., 2019; Robertson et al., 2019). *Coprococcus* and *Sutterella* were associated with infant development in previous studies (Loughman *et al*., 2020; Rothenberg *et al*., 2020; Acuña *et al*., 2021). According to Acuña *et al*. (2021), a positive association was found between the abundance of *Coprococcus* and fine motor activity evaluated by the Bayley Scales of Infant Development III. Rothenberg *et al*. (2020) found that microbiota cluster with captured coabundances of *Sutterella* was positively associated with Mental Developmental Index (MDI) and Psychomotor Developmental Index (PDI) in a study enrolling 46 children from rural China at 36 months of age. Loughman *et al*. (2020) found that the abundance of the genus *Sutterella* at six months appeared to be lower in an infant with elevated behavioral problems between 201 children from Australia.

In this study, we identified a higher prevalence of rapid infant growth, associated with a higher risk for overweight and obesity later in the life course (Monteiro; Victora, 2005). Additionally, we observed that infants with rapid infant growth from 1 to 6-months of age had higher relative abundances of *Enterococcus* genera in their gut microbiota. This genus comprises gram-positive bacteria of the phylum *Firmicutes* that have been associated with infections (García-Solache, Rice, 2019). Indeed, recent evidence demonstrated that intestinal *Firmicutes* phylum was associated with rapid growth, overweight, and obesity in childhood (Alderete *et al*., 2021; McLean et al., 2019; González *et al*., 2021; Tun *et al*., 2018; Hou *et al*., 2017). Similarly, Alderete *et al*. (2021) found that infants with rapid growth from birth to 12-months of age had their gut microbiota enriched with *Enterococcus* at one month in a study enrolling 132 Hispanic infants from Southern California. On the other hand, an inverse association between *Enterococcus* at five months and the excessive weight gain from birth to 12 months were identified by Laursen *et al*. (2021), considering 30 infants from Denmark. Differences in the time point when the gut microbiota was assessed, or geographic location may explain the difference between these results.

There are several strengths of this study. First, to the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the association between gut microbiota on infant growth and development in the Latin American population. Second, the longitudinal design allowed us to determine directionality. Moreover, the robust statistical analysis of the present study that was adjusted for important confounders based on biologic plausibility is an additional strength. In addition, some limitations of the present study should be highlighted. The first is the use of ASQ-BR, which is a screening scale and not a diagnostic tool. Nevertheless, the data collection procedures were standardized, and this instrument has been widely used during this period in Brazil and around the world. Another limitation was that the analyses of ASQ-3 scores as categorical data were not possible considering our small sample size. However, there was no cut-off point of this instrument validated for use in Brazilian children. Moreover, our sample size was limited. Nevertheless, this study was exploratory and did not assess causality.

In conclusion, the data show the association between infant gut microbiota composition and infant growth and development throughout the first year of life among healthy Brazilian infants. Our findings highlight the positive association between the Enterococcus genus and rapid growth infants from 1-6 months. In addition, we found that the infant gut microbiota at one month, such as *Coprococcus*, *Eubacterium*, and *Sutterella*

genus, were positively associated with fine motor skills score. However, future prospective studies with a large sample size are needed to assess causality between infant microbiota, growth, and development.

References

1. Acuña I, Cerdó T, Ruiz A, Torres-Espínola FJ, López-Moreno A, Aguilera M, et al. Infant Gut Microbiota Associated with Fine Motor Skills. Nutrients. 2021;13(5).

2. Alderete TL, Jones RB, Shaffer JP, Holzhausen EA, Patterson WB, Kazemian E, et al. Early life gut microbiota is associated with rapid infant growth in Hispanics from Southern California. Gut Microbes. 2021;13(1):1961203.

3. Black MM, Walker SP, Fernald LCH, Andersen CT, DiGirolamo AM, Lu C, et al. Early childhood development coming of age: science through the life course. Lancet. 2017;389(10064):77-90.

4. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nat Biotechnol. 2019;37(8):852-7.

5. 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. ISME J. 2012;6(8):1621-4.

6. Carlson AL, Xia K, Azcarate-Peril MA, Goldman BD, Ahn M, Styner MA, et al. Infant Gut Microbiome Associated With Cognitive Development. Biol Psychiatry. 2018;83(2):148-59.

7. Crovesy L, Masterson D, Rosado EL. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. Eur J Clin Nutr. 2020;74(9):1251-62.

8. Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. Physiol Rev. 2019;99(4):1877-2013.

9. Eickmann SH, Emond AM, Lima M. Evaluation of child development: beyond the neuromotor aspect. J Pediatr (Rio J). 2016;92(3 Suppl 1):S71-83.

10. Filgueiras A, Pires P, Maissonette S, Landeira-Fernandez J. Psychometric properties of the Brazilian-adapted version of the Ages and Stages Questionnaire in public child daycare centers. Early Hum Dev. 2013;89(8):561-76.

11. García-Solache M, Rice LB. The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. Clin Microbiol Rev. 2019;32(2).

12. Gonzalez SL, Alvarez V, Nelson EL. Do Gross and Fine Motor Skills Differentially Contribute to Language Outcomes? A Systematic Review. Front Psychol. 2019;10:2670.

13. González S, Selma-Royo M, Arboleya S, Martínez-Costa C, Solís G, Suárez M, et al. Levels of Predominant Intestinal Microorganisms in 1 Month-Old Full-Term Babies

and Weight Gain during the First Year of Life. Nutrients. 2021;13(7).

14. Hou YP, He QQ, Ouyang HM, Peng HS, Wang Q, Li J, et al. Human Gut Microbiota Associated with Obesity in Chinese Children and Adolescents. Biomed Res Int. 2017;2017:7585989.

15. INTERGROWTH-21st AG. ANTHROPOMETRY HANDBOOK. The International Fetal and Newborn Growth Consortium., 2012.

16. Järbrink-Sehgal E, Andreasson A. The gut microbiota and mental health in adults. Curr Opin Neurobiol. 2020;62:102-14.

17. Kamng'ona AW, Young R, Arnold CD, Kortekangas E, Patson N, Jorgensen JM, et al. The association of gut microbiota characteristics in Malawian infants with growth and inflammation. Sci Rep. 2019;9(1):12893.

18. Kapourchali FR, Cresci GAM. Early-Life Gut Microbiome-The Importance of Maternal and Infant Factors in Its Establishment. Nutr Clin Pract. 2020;35(3):386-405.

19. Lackey KA, Williams JE, Meehan CL, Zachek JA, Benda ED, Price WJ, et al. What's Normal? Microbiomes in Human Milk and Infant Feces Are Related to Each Other but Vary Geographically: The INSPIRE Study. Front Nutr. 2019;6:45.

20. Laursen MF, Larsson MW, Lind MV, Larnkjær A, Mølgaard C, Michaelsen KF, et al. Intestinal Enterococcus abundance correlates inversely with excessive weight gain and increased plasma leptin in breastfed infants. FEMS Microbiol Ecol. 2020;96(5).

21. Lim MY, Yoon HS, Rho M, Sung J, Song YM, Lee K, et al. Analysis of the association between host genetics, smoking, and sputum microbiota in healthy humans. Sci Rep. 2016;6:23745.

22. Loughman A, Ponsonby AL, O'Hely M, Symeonides C, Collier F, Tang MLK, et al. Gut microbiota composition during infancy and subsequent behavioural outcomes. EBioMedicine. 2020;52:102640.

23. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. Gut. 2016;65(2):330-9.

24. McLean C, Jun S, Kozyrskyj A. Impact of maternal smoking on the infant gut microbiota and its association with child overweight: a scoping review. World J Pediatr. 2019;15(4):341-9.

25. Monteiro PO, Victora CG. Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life--a systematic review. Obes Rev. 2005;6(2):143-54.

26. Moore RE, Townsend SD. Temporal development of the infant gut microbiome. Open Biol. 2019;9(9):190128.

27. Mukherjee A, Lordan C, Ross RP, Cotter PD. Gut microbes from the phylogenetically diverse genus. Gut Microbes. 2020;12(1):1802866.

28. Nejman D, Livyatan I, Fuks G, Gavert N, Zwang Y, Geller LT, et al. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. Science. 2020;368(6494):973-80.

29. Paliy O, Piyathilake CJ, Kozyrskyj A, Celep G, Marotta F, Rastmanesh R. Excess body weight during pregnancy and offspring obesity: potential mechanisms. Nutrition. 2014;30(3):245-51.

30. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. FEMS Microbiol Lett. 2002;217(2):133-9.

31. Qi M, Tan B, Wang J, Liao S, Deng Y, Ji P, et al. The microbiota-gut-brain axis: A novel nutritional therapeutic target for growth retardation. Crit Rev Food Sci Nutr. 2021:1-26.

32. Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ. The Human Microbiome and Child Growth - First 1000 Days and Beyond. Trends Microbiol. 2019;27(2):131-47.

33. Rothenberg SE, Chen Q, Shen J, Nong Y, Nong H, Trinh EP, et al. Neurodevelopment correlates with gut microbiota in a cross-sectional analysis of children at 3 years of age in rural China. Sci Rep. 2021;11(1):7384.

34. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. Eur J Nutr. 2018;57(1):1-24.

35. Silva MAD, Mendonça Filho EJD, Mônego BG, Bandeira DR. Instruments for multidimensional assessment of child development: a systematic review. Early Child Development and Care. 2018

36. Silver KL, Singer PA. A focus on child development. Science. 2014;345(6193):121.

37. Sordillo JE, Korrick S, Laranjo N, Carey V, Weinstock GM, Gold DR, et al. Association of the Infant Gut Microbiome With Early Childhood Neurodevelopmental Outcomes: An Ancillary Study to the VDAART Randomized Clinical Trial. JAMA Netw Open. 2019;2(3):e190905.

38. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. Nature. 2018;562(7728):583-8.

39. Talarico ST, Santos FE, Brandt KG, Martinez MB, Taddei CR. Anaerobic bacteria

in the intestinal microbiota of Brazilian children. Clinics (Sao Paulo). 2017;72(3):154-60.

40. Tonon KM, Morais TB, Taddei CR, Araújo-Filho HB, Abrão ACFV, Miranda A, et al. Gut microbiota comparison of vaginally and cesarean born infants exclusively breastfed by mothers secreting α1-2 fucosylated oligosaccharides in breast milk. PLoS One. 2021;16(2):e0246839.

41. Tun HM, Bridgman SL, Chari R, Field CJ, Guttman DS, Becker AB, et al. Roles of Birth Mode and Infant Gut Microbiota in Intergenerational Transmission of Overweight and Obesity From Mother to Offspring. JAMA Pediatr. 2018;172(4):368-77.

42. Turroni F, Milani C, Duranti S, Lugli GA, Bernasconi S, Margolles A, et al. The infant gut microbiome as a microbial organ influencing host well-being. Ital J Pediatr. 2020;46(1):16.

43. World Health Organization, WHO. WHO child growth standards : length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for height and body mass index-for-age: methods and development. In: Onis Md, ed. Switzerland: WHO Press, 2006.

44. World Health Organization, WHO. Indicators for assessing infant and young child feeding practices. Washington D.C., USA: Conclusions of a consensus meeting held 6-8 November 2007, 2007.

45. Zhang C, Shao H, Li D, Xiao N, Tan Z. Role of tryptophan-metabolizing microbiota in mice diarrhea caused by Folium sennae extracts. BMC Microbiol. 2020;20(1):185.

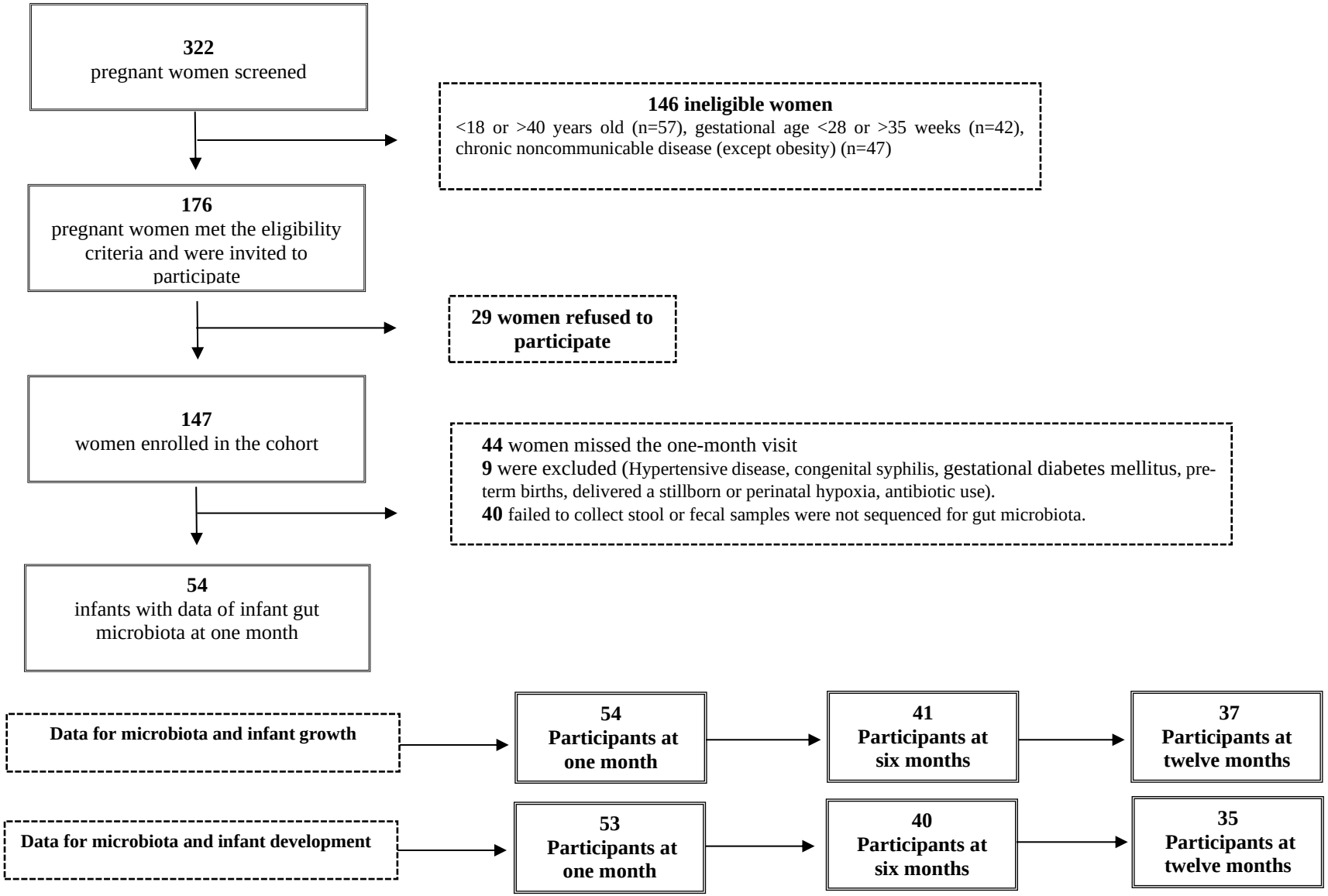

Figure 1. Flow diagram of Study.

Table 1. Characteristics of mother-child pairs included in the study.

Characteristics	Participants (n=54)	
Continuous variable	**Median**	**IQR**
Maternal age (years)	27.7	23.1-32.2
Education (years)	12.0	9-12
Pre-pregnancy BMI (kg/m²)	25.3	22.2-28.7
Birth weight (g)	3,275.0	3030-3530
Birth height (cm)	50.0	49-51
Gestational age at birth (weeks)	39.2	38.6-40.6
Categorical variable	**Frequency (%)**	
*Smoking during pregnancy		
Yes	2 (3.7)	
No	51 (96.3)	
*Alcohol intake during pregnancy		
Yes	24 (45.3)	
No	29 (54.7)	
Breastfeeding at one month		
Exclusive/Predominant breastfeeding	36 (66.7)	
Mixed feeding	18 (33.3)	
Mode of delivery		
Vaginal	38 (70.4)	
Cesarean section	16 (29.6)	
Child sex		
Male	28 (51.8)	
Female	26 (48.2)	
Parity		
1	28 (51.8)	
≥ 2	26 (48.2)	
Marital status		
With a partner	47 (88.7)	
Without a partner	6 (11.3)	

Note: Breastfeeding categories: Exclusive breastfeeding/predominant (the infant received only breast milk, medicines, and other liquids, eventually (water and/or tea); mixed feeding (the infant received in addition to breast milk, other beverages, or foods). * Sample reduction due to missing data: Smoking (n=53) and alcohol intake during pregnancy (n=53). IQR: Interquartile range; BMI: body mass index.

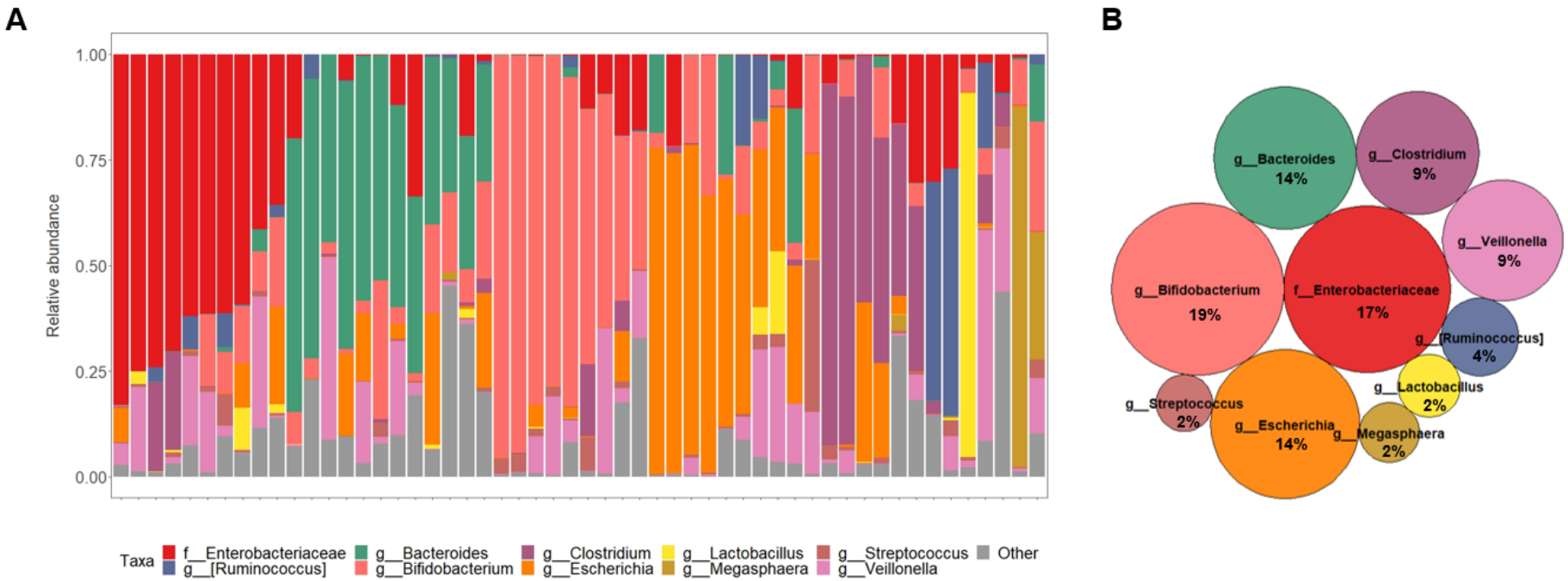

Figure 2. Relative abundance of the top 10 bacterial taxa identified in the infant gut microbiota at one month of age.

Note: Each vertically stacked bar plot represents one infant (A) and the mean relative abundance of the bacterial taxa (B). Higher circles represent the most abundant taxa found in the infant gut microbiota at one month of age. The percentages are the mean of relative abundance for each taxa.

Table 2. Association between alpha-diversity of infant gut microbiota and infant growth throughout the first year of life.

Alpha-diversity of infant gut microbiota									
	Chao1			**Phylogenetic Diversity**			**Shannon index**		
Infant growth	β	95%CI	P-value [1]	β	95%CI	P-value [1]	β	95%CI	P-value [1]
LAZ	-0.002	-0.013; 0.009	0.694	-0.037	-0.150; 0.075	0.513	0.041	-0.410; 0.492	0.859
WAZ	0.003	-0.004; 0.010	0.357	0.013	-0.054; 0.081	0.705	0.117	-0.150; 0.386	0.388
BAZ	-0.003	-0.013; 0.006	0.468	-0.055	-0.150; 0.039	0.256	0.149	-0.230; 0.528	0.440
Rapid infant growth	OR	95%CI	P-value [2]	OR	95%CI	P-value [2]	OR	95%CI	P-value [2]
1- 6 months	0.993	0.963; 1.023	0.658	0.947	0.707; 1.270	0.721	1.325	0.408; 4.300	0.640
1-12 months	0.981	0.948; 1.015	0.269	0.894	0.652; 1.224	0.485	0.835	0.245; 2.846	0.774

Notes: [1] P-value refers to linear mixed-effects regression; [2] p-value refers to logistic regression. β =longitudinal linear regression coefficient; OR: random intercept logistic regression model. All models were adjusted for maternal schooling, mode of delivery, breastfeeding practice, pre-pregnancy body mass index and length at birth for LAZ, and weight at birth for WAZ. P-value<0.05 was considered statistically significant. BAZ: BMI-for-age z score; LAZ: length-for-age z score; WAZ: weight-for-age z score; CI = Confidence Intervals; Infant growth: n=54 groups; n=132 observations. Rapid infant growth, defined as a weight-for-age z score higher than 0.67, was calculated during two periods: one to six months (n=41) and one to 12 months (n=37).

Table 3. Association between alpha-diversity of infant gut microbiota and infant development throughout the first year of life.

	Alpha-diversity of infant gut microbiota								
	Chao1			Phylogenetic Diversity			Shannon index		
	β	95%CI	P-value	β	95%CI	P-value	β	95%CI	P-value
Infant development									
Communication	0.019	-0.072; 0.110	0.682	-0.088	-0.993; 0.817	0.849	-1.887	-5.515; 1.741	0.308
Gross motor skills	-0.012	-0.092; 0.066	0.750	-0.081	-0.867; 0.704	0.839	-1.131	-4.268; 2.005	0.480
Fine motor skills	0.084	0.002; 0.167	**0.044**	0.564	-0.255; 1.384	0.177	-0.611	-3.931; 2.708	0.718
Problem-solving	0.015	-0.100; 0.130	0.799	-0.156	-1.293; 0.980	0.787	-0.079	-5.372; 3.797	0.736
Personal-social	-0.002	-0.102; 0.098	0.969	-0.034	-1.012; 0.945	0.946	1.028	-2.912; 4.969	0.609

Notes: P-value refers to linear mixed-effects regression; β = longitudinal linear regression coefficient. All models were adjusted for maternal schooling, mode of delivery, breastfeeding practice, pre-pregnancy body mass index. P-value <0.05 was considered statistically significant. Infant development was evaluated by Ages & Stages Questionnaires (ASQ-BR). CI = Confidence Intervals. Infant development: n=53 groups; n=128 observations

Table 4. Association between beta-diversity of infant gut microbiota and infant growth.

	Beta-diversity of infant gut microbiota							
	Weighted UniFrac		Unweighted UniFrac		Generalized UniFrac		Bray-Curtis	
	F-statistic	P-value	F-statistic	P-value	F-statistic	P-value	F-statistic	P-value
Infant growth								
1 month (n=54)								
LAZ	0.381	0.685	1.057	0.347	0.753	0.666	0.628	0.893
WAZ	0.940	0.360	0.802	0.775	0.364	1.000	0.839	0.595
BAZ	0.701	0.430	1.052	0.317	0.527	0.926	0.590	0.893
6 months (n=41)								
LAZ	0.467	0.610	0.782	0.775	0.458	0.943	0.390	0.990
WAZ	0.699	0.442	1.033	0.370	0.496	0.901	1.041	0.361
BAZ	1.393	0.265	0.759	0.847	0.505	0.917	1.037	0.391
12 months (n=37)								
LAZ	0.889	0.379	0.919	0.568	1.326	0.198	1.074	0.361
WAZ	0.370	0.758	0.919	0.568	0.763	0.694	0.975	0.526
BAZ	1.055	0.328	0.906	0.543	0.369	0.980	0.688	0.800
Rapid infant growth								
1 -6 months (n=41)	0.874	0.393	0.766	0.833	1.150	0.313	0.821	0.676
1-12 months (n-37)	1.413	0.223	0.974	0.405	1.009	0.435	1.081	0.331

Notes: P-value refers to PERMANOVA tests adjusted for maternal schooling, mode of delivery, breastfeeding practice, pre-pregnancy body mass index and length at birth for LAZ, and weight at birth for WAZ. P-value<0.05 was considered statistically significant. BAZ: BMI-for-age z score; LAZ: length-for-age z score; WAZ: weight-for-age z score; CI= Confidence Intervals; Infant growth: n=54 groups; n=132 observations. Rapid infant growth, defined as a weight-for-age z score higher than 0.67, was calculated during two periods: one to six months and one to 12 months.

Table 5. Association between beta-diversity of infant gut microbiota and infant development.

	Beta-diversity of infant gut microbiota							
	Weighted UniFrac		Unweighted UniFrac		Generalized UniFrac		Bray-Curtis	
	F-statistic	P-value	F-statistic	P-value	F-statistic	P-value	F-statistic	P-value
1 month (n=53)								
Communication	0.103	0.935	0.833	0.694	0.555	0.926	1.192	0.258
Gross motor skills	0.699	0.474	0.922	0.549	0.393	0.980	0.730	0.820
Fine motor skills	2.537	0.109	1.688	**0.025**	0.412	0.990	1.253	0.196
Problem-solving	1.976	0.137	0.822	0.714	0.430	0.962	1.158	0.266
Personal-social	4.054	**0.033**	0.967	0.524	2.055	**0.040**	1.649	0.054
6 months (n=40)								
Communication	0.460	0.552	1.186	0.223	0.801	0.641	1.214	0.242
Gross motor skills	0.088	0.885	1.500	0.089	0.614	0.769	0.363	1.00
Fine motor skills	1.447	0.251	0.857	0.699	0.876	0.568	0.758	0.769
Problem-solving	0.141	0.862	0.987	0.5	0.593	0.833	0.709	0.730
Personal-social	1.362	0.270	0.779	0.806	0.438	0.943	0.691	0.820
12 months (n=35)								
Communication	1.461	0.201	0.944	0.465	1.181	0.244	1.181	0.244
Gross motor skills	0.317	0.758	0.737	0.794	0.392	0.980	0.392	0.980
Fine motor skills	1.086	0.292	0.906	0.588	1.153	0.251	1.153	0.251
Problem-solving	6.486	**0.009**	0.952	0.500	1.153	0.293	1.153	0.293
Personal-social	4.294	**0.029**	1.163	0.260	1.310	0.157	1.310	0.157

Notes: P-value refers to PERMANOVA tests adjusted for maternal schooling, mode of delivery, breastfeeding practice, pre-pregnancy body mass index. P-value <0.05 was considered statistically significant. Infant development was evaluated by Ages & Stages Questionnaires (ASQ-BR)

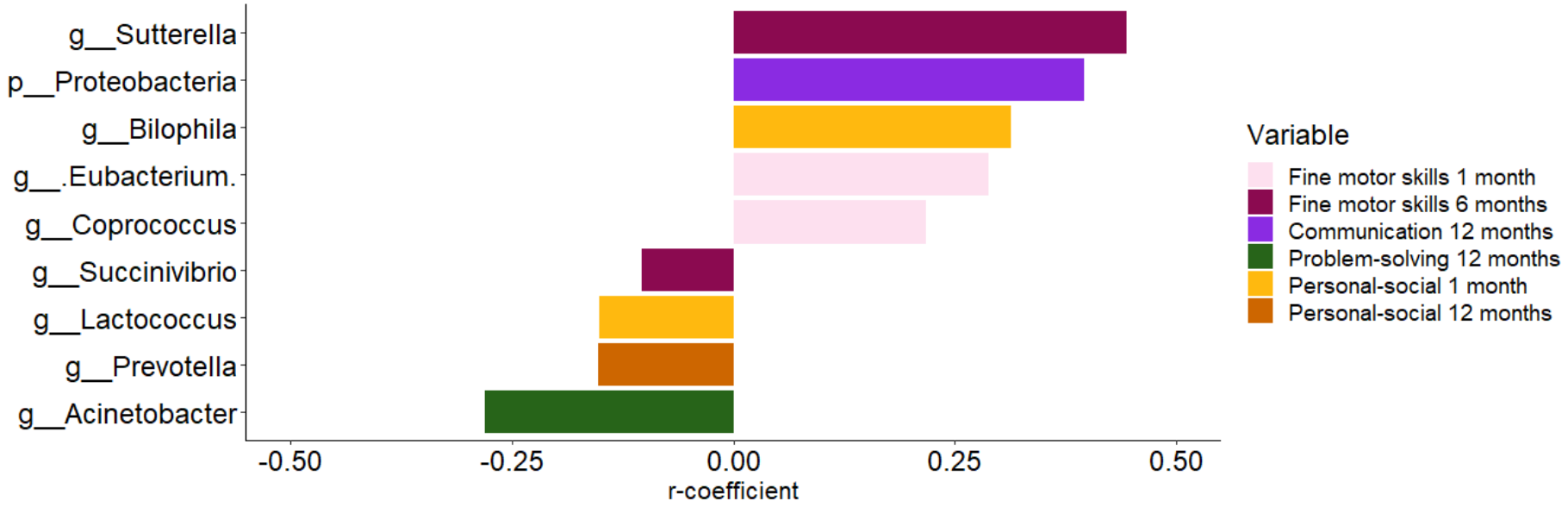

Figure 3. Significant associations between microbial taxa at genus level and infant development at one, six, and twelve months.

Note: Barplots show the effect sizes (r-coefficients) obtained from Microbiome Multivariable Association with Linear Models (MaAsLin2). The models were adjusted for maternal schooling, mode of delivery, breastfeeding practice, pre-pregnancy body mass index. Q-value<0.25 was considered statistically significant. First (n=53), six (n=40) and twelve (n=35) months. Infant development was evaluated by Ages & Stages Questionnaires (ASQ-BR).

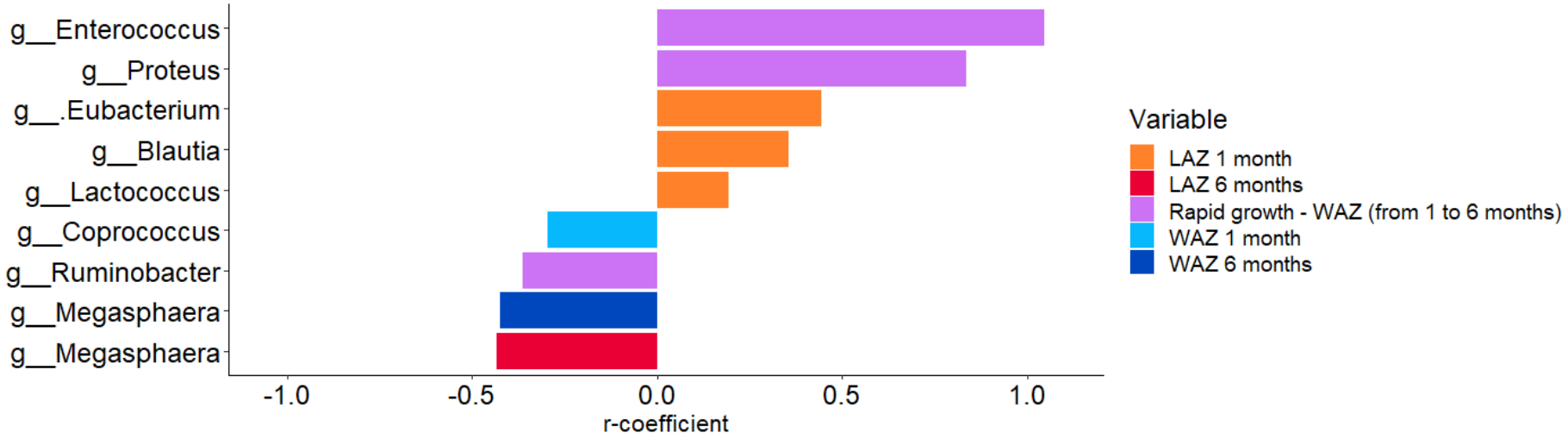

Figure 4. Significant associations between microbial taxa at genus level and infant growth at one, six, and twelve months.

Note: Barplot graphs show effect sizes (r-coefficients) obtained from Microbiome Multivariable Association with Linear Models (MaAsLin2). The models were adjusted for maternal schooling, mode of delivery, breastfeeding practice, pre-pregnancy body mass index, and length at birth for LAZ and weight at birth for WAZ. Q-value<0.25 was considered statistically significant. Infant growth: First (n=54), six (n=41) months, rapid growth from one – six months (n=41) (no significant associations were found for twelve months or rapid growth from one and twelve months). Rapid infant growth, defined as a weight-for-age z score higher than 0.67. BAZ: BMI-for-age z score; LAZ: length-for-age z score; WAZ: weight-for-age z score.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese investigou a associação entre as concentrações de OLH e a MI no primeiro mês de vida do lactente, e a relação da MI com o crescimento e desenvolvimento ao longo do primeiro ano de vida.

As análises do primeiro artigo documentaram a formação de três *clusters* de acordo com a composição de OLH. No primeiro *cluster* foram incluídas mulheres não secretoras, e nos *clusters* 2 e 3, mulheres secretoras. Observou-se no presente estudo que a prevalência de mulheres não-secretoras foi de apenas 11,4%. Esse resultado é corroborado por outros estudos realizados na América Latina e são menores quando comparados com resultados da população de países da América do Norte, África e Ásia.

Houve maior abundância de *Bacteroides* e *Bifidobacterium* e *Escherichia* na MI no período do primeiro mês de vida do lactente. Em geral, os gêneros encontrados na MI infantil assemelham-se àqueles comumente observados em estudos prévios realizados com lactentes saudáveis. Porém, estudos no Brasil evidenciam maior abundância relativa de *Escherichia,* o que tem sido atribuído às condições ambientais de países em desenvolvimento, às quais as populações de baixa renda estão expostas. Dessa forma, os resultados do primeiro artigo reforçam a importância de estudos nacionais que considerem as variações do polimorfismo do gene secretor e da MI infantil de acordo com a localização geográfica.

Os filhos de mulheres secretoras apresentaram maior abundância de *Bacteroides* e *Bifidobacterium,* e menor abundância da família *Enterobacteriaceae* em relação aos filhos de mulheres não secretoras. Apesar desse resultado ser esperado, o pequeno tamanho da amostra de mulheres não secretoras limita a sua interpretação. Houve menor influência dos *clusters* 2 e 3 de OLH na composição da MI infantil. Em contrapartida, foram observadas importantes associações entre a concentração individual de OLH e a MI entre as mães secretoras, que ratificam a hipótese do presente estudo. Observou-se uma associação direta entre LNnT e DFLac e a abundância de *Bifidobacterium* e, também, de LNH e FLNH com *Akkermansia,* gêneros considerados importantes para a saúde da criança. A confirmação da associação entre OLH e a abundância dessas bactérias pode contribuir no fortalecimento da promoção do aleitamento materno exclusivo, devido ao adequado fornecimento destes compostos bioativos pelo leite humano.

Os resultados do segundo artigo revelaram uma associação entre alfa, beta diversidade e a abundância de *Coprococcus*, *Eubacterium* e *Sutterella* com o escore de coordenação motora fina. Além disso, observou-se que crianças classificadas com ganho de peso rápido entre o primeiro e o sexto mês de vida, apresentaram maior abundância de *Enterococcus* e *Proteus,* gêneros potencialmente patogênicos, em comparação com as crianças com ganho de peso adequado. A associação entre a MI e o crescimento e o desenvolvimento infantil ainda não está consolidada na literatura, apesar de apresentar plausibilidade biológica, por meio da regulação de hormônios de crescimento, metabolismo de nutrientes e, também ligações neurais pelo eixo intestino-cérebro.

O emprego de análise estatística robusta, como modelos de regressão ajustados por importantes fatores de confusão foi um diferencial desta tese, que minimiza o risco de viés. Ademais, também houve a avaliação de três medidas repetidas do crescimento e desenvolvimento infantil ao longo do primeiro ano de vida. Como pontos negativos pode-se destacar a avaliação da MI em apenas uma onda de seguimento e a utilização de uma escala de rastreamento para avaliação do desenvolvimento infantil, o que limita a interpretação desses resultados.

Destaca-se que existe grande interesse em estudos que avaliam a associação entre OLH, MI, crescimento e desenvolvimento infantil devido às lacunas na literatura, principalmente porque os primeiros meses de vida representam uma janela de oportunidades para a modulação da MI e para o crescimento e desenvolvimento infantil. Esta tese contribui para gerar evidências científicas, considerando que esse foi o primeiro estudo com dados da população brasileira, e que o perfil de OLH e a abundância da MI podem variar de acordo com a localização geográfica. Diante deste contexto, os resultados dessa tese podem servir como ponto de partida para novos estudos longitudinais com maior tamanho amostral e que considerem a análise da MI por metagenômica, e instrumentos de diagnóstico para avaliação do desenvolvimento infantil.

9. REFERÊNCIAS

ACUÑA, I.; CERDÓ, T.; RUIZ, A.; TORRES-ESPÍNOLA, F. J. et al. Infant Gut Microbiota Associated with Fine Motor Skills. Nutrients, 13, n. 5, May 2021.

ALDERETE, T. L.; JONES, R. B.; SHAFFER, J. P.; HOLZHAUSEN, E. A. *et al.* Early life gut microbiota is associated with rapid infant growth in Hispanics from Southern California. Gut Microbes, 13, n. 1, p. 1961203, 2021 Jan-Dec 2021.

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, p. 427, Sep 2014.

ASHIDA, H.; MIYAKE, A.; KIYOHARA, M.; WADA, J. et al. Two distinct alpha-L-fucosidases from Bifidobacterium bifidum are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. Glycobiology, 19, n. 9, p. 1010-1017, Sep 2009.

AZAD, M. B.; KONYA, T.; PERSAUD, R. R.; GUTTMAN, D. S. 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, 123, n. 6, p. 983-993, May 2016.

AZAD, M. B.; ROBERTSON, B.; ATAKORA, F.; BECKER, A. B. et al. Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. J Nutr, 148, n. 11, p. 1733-1742, Nov 2018.

BAI, Y.; TAO, J.; ZHOU, J.; FAN, Q. et al. Fucosylated Human Milk Oligosaccharides and N-Glycans in the Milk of Chinese Mothers Regulate the Gut Microbiome of Their Breast-Fed Infants during Different Lactation Stages. mSystems, 3, n. 6, Nov-Dec 2018a.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. Pediatr Clin North Am, 60, n. 1, p. 49-74, Feb 2013.

BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. J Intern Med, 261, n. 5, p. 412-417, May 2007.

BELUSKA-TURKAN, K.; KORCZAK, R.; HARTELL, B.; MOSKAL, K. et al. Nutritional Gaps and Supplementation in the First 1000 Days. Nutrients, 11, n. 12, Nov 2019.

BERG, G.; RYBAKOVA, D.; FISCHER, D.; CERNAVA, T. *et al.* Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. Microbiome, 8, n. 1, p. 103, Jun 2020.

BERGER, B.; PORTA, N.; FOATA, F.; GRATHWOHL, D. et al. Linking Human Milk Oligosaccharides, Infant Fecal Community Types, and Later Risk to Require Antibiotics. mBio, 11, n. 2, Mar 2020.

BLACK, M. M.; PÉREZ-ESCAMILLA, R.; RAO, S. F. Integrating nutrition and child development interventions: scientific basis, evidence of impact, and implementation considerations. Adv Nutr, 6, n. 6, p. 852-859, Nov 2015.

BLACK, M. M.; WALKER, S. P.; FERNALD, L. C. H.; ANDERSEN, C. T. et al. Early childhood development coming of age: science through the life course. Lancet, 389, n. 10064, p. 77-90, Jan 2017.

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

BODE, L.; JANTSCHER-KRENN, E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. Adv Nutr, 3, n. 3, p. 383S-391S, May 2012a.

BODE, L. Human Milk Oligosaccharides in the Prevention of Necrotizing Enterocolitis: A Journey From. Front Pediatr, 6, p. 385, Dec 2018.

BODE, L. Human Milk Oligosaccharides: Next-Generation Functions and Questions. Nestle Nutr Inst Workshop Ser, 90, p. 191-201, Mar 2019.

BOREWICZ, K.; GU, F.; SACCENTI, E.; ARTS, I. C. W. et al. Correlating Infant Faecal Microbiota Composition and Human Milk Oligosaccharide Consumption by Microbiota of One-Month Old Breastfed Infants. Mol Nutr Food Res, p. e1801214, Apr 2019.

BOREWICZ, K.; GU, F.; SACCENTI, E.; HECHLER, C. et al. The association between breastmilk oligosaccharides and faecal microbiota in healthy breastfed infants at two, six, and twelve weeks of age. Sci Rep, 10, n. 1, p. 4270, Mar 2020.

BOUDRY, G.; CHARTON, E.; LE HUEROU-LURON, I.; FERRET-BERNARD, S. et al. The Relationship Between Breast Milk Components and the Infant Gut Microbiota. Front Nutr, 8, p. 629740, Mar 2021.

BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. Ecological Monographs, 27, n. 4, p. 325-349, Oct 1957.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno – PNIAM. Brasília, 1991.

BRASIL, Ministério da Saúde. Saúde da criança: acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil. Brasília, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Brasília, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Saúde da criança: Nutrição Infantil Aleitamento Materno e Alimentação Complementar. Ministério da Saúde. Brasília, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional. Ministério da Saúde. Brasília, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde da criança: crescimento e desenvolvimento. Ministério da Saúde. Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Atenção ao pré-natal de baixo risco [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – 1. ed. rev. Brasília, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Diretrizes de atenção à gestante: a operação cesariana. Brasília: Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Brasília, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Bases para a discussão da Política Nacional de Promoção, Proteção e Apoio ao Aleitamento Materno. Ministério da Saúde. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019. Ministério da Saúde, Brasília, 2020.

BÄCKHED, 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 2015.

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.

CARABOTTI, M.; SCIROCCO, A.; MASELLI, M. A.; SEVERI, C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. Ann Gastroenterol, 28, n. 2, p. 203-209, 2015 Apr-Jun 2015.

CARLSON, A. L.; XIA, K.; AZCARATE-PERIL, M. A.; GOLDMAN, B. D. et al. Infant Gut Microbiome Associated With Cognitive Development. Biol Psychiatry, 83, n. 2, p. 148-159, Jan 2018.

CASTANYS-MUÑOZ, E.; MARTIN, M. J.; PRIETO, P. A. 2'-fucosyllactose: an abundant, genetically determined soluble glycan present in human milk. Nutr Rev, 71, n. 12, p. 773-789, Dec 2013.

CHEN, X. Human Milk Oligosaccharides (HMOS): Structure, Function, and Enzyme-Catalyzed Synthesis. Adv Carbohydr Chem Biochem, 72, p. 113-190, 2015.

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, 01 2018.

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.

CORONA-CERVANTES, K.; GARCÍA-GONZÁLEZ, I.; VILLALOBOS-FLORES, L. E.; HERNÁNDEZ-QUIROZ, F. et al. Human milk microbiota associated with early colonization of the neonatal gut in Mexican newborns. PeerJ, 8, p. e9205, May 2020.

CROVESY, L.; MASTERSON, D.; ROSADO, E. L. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. Eur J Clin Nutr, 74, n. 9, p. 1251-1262, Sep 2020.

DARLING, J. C.; BAMIDIS, P. D.; BURBERRY, J.; RUDOLF, M. C. J. The First Thousand Days: early, integrated and evidence-based approaches to improving child health: coming to a population near you? Arch Dis Child, 105, n. 9, p. 837-841, Sep 2020.

DIETERICH, C. M.; FELICE, J. P.; O'SULLIVAN, E.; RASMUSSEN, K. M. Breastfeeding and health outcomes for the mother-infant dyad. Pediatr Clin North Am, 60, n. 1, p. 31-48, Feb 2013.

DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. Gastroenterol Clin North Am, 46, n. 1, p. 77-89, Mar 2017.

DOHERTY, A. M.; LODGE, C. J.; DHARMAGE, S. C.; DAI, X. et al. Human Milk

Oligosaccharides and Associations with Immune-Mediated Disease and Infection in Childhood: A Systematic Review. Front Pediatr, 6, p. 91, Apr 2018.

DOSMAN, C. F.; ANDREWS, D.; GOULDEN, K. J. Evidence-based milestone ages as a framework for developmental surveillance. Paediatr Child Health, 17, n. 10, p. 561-568, Dec 2012.

ECK, A.; RUTTEN, N. B. M. M.; SINGENDONK, M. M. J.; RIJKERS, G. T. et al. Neonatal microbiota development and the effect of early life antibiotics are determined by two distinct settler types. PLoS One, 15, n. 2, p. e0228133, Feb 2020.

FERREIRA, A. L.; ALVES, R.; FIGUEIREDO, A.; ALVES-SANTOS, N. et al. Human Milk Oligosaccharide Profile Variation Throughout Postpartum in Healthy Women in a Brazilian Cohort. Nutrients, 12, n. 3, Mar 2020.

FILGUEIRAS, A.; PIRES, P.; MAISSONETTE, S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Psychometric properties of the Brazilian-adapted version of the Ages and Stages. Questionnaire in public child daycare centers. Early Hum Dev, 89, n. 8, p. 561-576, Aug 2013.

GALAZZO, G.; VAN BEST, N.; BERVOETS, L.; DAPAAH, I. O. et al. Development of the Microbiota and Associations with Birth Mode, Diet, and Atopic Disorders in a Longitudinal Analysis of Stool Samples, Collected From Infancy Through Early Childhood. Gastroenterology, 158, n. 6, p. 1584-1596, May 2020.

GIBIINO, G.; LOPETUSO, L. R.; SCALDAFERRI, F.; RIZZATTI, G. et al. Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. Dig Liver Dis, 50, n. 7, p. 635-639, Jul 2018.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 14, n. 8, p. 491-502, Aug 2017.

GILA-DIAZ, A.; ARRIBAS, S. M.; ALGARA, A.; MARTÍN-CABREJAS, M. A. et al. A

Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk: A Focus on Prematurity. Nutrients, 11, n. 6, Jun 2019.

GOFFAU, M. C.; LAGER, S.; SOVIO, U.; GACCIOLI, F. et al. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. Nature, 572, n. 7769, p. 329-334, Aug 2019.

GONZÁLEZ, S.; SELMA-ROYO, M.; ARBOLEYA, S.; MARTÍNEZ-COSTA, C. *et al.* Levels of Predominant Intestinal Microorganisms in 1 Month-Old Full-Term Babies and Weight Gain during the First Year of Life. Nutrients, 13, n. 7, Jul 2021.

GOULET, O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. Nutr Rev, 73 Suppl 1, p. 32-40, Aug 2015.

GROTH, D.; HARTMANN, S.; KLIE, S.; SELBIG, J. Principal components analysis. Methods Mol Biol, 930, p. 527-547, 2013.

HAN, S. M.; DERRAIK, J. G. B.; BINIA, A.; SPRENGER, N. et al. Maternal and Infant Factors Influencing Human Milk Oligosaccharide Composition: Beyond Maternal Genetics. J Nutr, 151, n. 6, p. 1383-1393, Jun 2021.

HEINDEL, J. J.; VANDENBERG, L. N. Developmental origins of health and disease: a paradigm for understanding disease cause and prevention. Curr Opin Pediatr, 27, n. 2, p. 248-253, Apr 2015.

HENDERICKX, J. G. E.; ZWITTINK, R. D.; VAN LINGEN, R. A.; KNOL, J. et al. The Preterm Gut Microbiota: An Inconspicuous Challenge in Nutritional Neonatal Care. Front Cell Infect Microbiol, 9, p. 85, Apr 2019.

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. Nat Commun, 9, n. 1, p. 4169, 10 2018.

HUEY, S. L.; JIANG, L.; FEDARKO, M. W.; MCDONALD, D. et al. Nutrition and the Gut Microbiota in 10- to 18-Month-Old Children Living in Urban Slums of Mumbai, India.

mSphere, 5, n. 5, Sep 2020.

IGNACIO, A.; FERNANDES, M. R.; RODRIGUES, V. A.; GROPPO, F. C. et al. Correlation between body mass index and faecal microbiota from children. Clin Microbiol Infect, 22, n. 3, p. 258.e251-258, Mar 2016.

INTERGROWTH-21ST, A. G. Anthropometry Handbook. The International Fetal and Newborn Growth Consortium. 2012.

INSTITUTE OF MEDICINE. Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines. In: RASMUSSEN, K. M.; YAKTINE, A. L. (Ed.). Technical Guidelines. Washington (DC): Institute of Medicine and National Research Council, The National Academies Press; 2009

JANDHYALA, S. M.; TALUKDAR, R.; SUBRAMANYAM, C.; VUYYURU, H. et al. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol, 21, n. 29, p. 8787-8803, Aug 2015.

JOST, T.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C.; CHASSARD, C. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. Nutr Rev, 73, n. 7, p. 426-437, Jul 2015.

KAMNG'ONA, A. W.; YOUNG, R.; ARNOLD, C. D.; KORTEKANGAS, E. et al. The association of gut microbiota characteristics in Malawian infants with growth and inflammation. Sci Rep, 9, n. 1, p. 12893, Sep 2019.

KAPOURCHALI, F. R.; CRESCI, G. A. M. Early-Life Gut Microbiome-The Importance of Maternal and Infant Factors in Its Establishment. Nutr Clin Pract, 35, n. 3, p. 386-405, Jun 2020.

KORPELA, K.; SALONEN, A.; HICKMAN, B. *et al.* Fucosylated oligosaccharides in mother’s milk alleviate the effects of caesarean birth on infant gut microbiota. Sci Rep n.8, p. 13757, Sep 2018.

KOZYRSKYJ, A. L.; KALU, R.; KOLEVA, P. T.; BRIDGMAN, S. L. Fetal programming of overweight through the microbiome: boys are disproportionately affected. J Dev Orig Health

Dis, 7, n. 1, p. 25-34, Feb 2016.

KUPERMAN, A. A.; KOREN, O. Antibiotic use during pregnancy: how bad is it? BMC Med, 14, n. 1, p. 91, Jun 2016.

LACKEY, K. A.; WILLIAMS, J. E.; MEEHAN, C. L.; ZACHEK, J. A. et al. What's Normal? Microbiomes in Human Milk and Infant Feces Are Related to Each Other but Vary Geographically: The INSPIRE Study. Front Nutr, 6, p. 45, Apr 2019.

LAURSEN, M. F.; LARSSON, M. W.; LIND, M. V.; LARNKJÆR, A. et al. Intestinal Enterococcus abundance correlates inversely with excessive weight gain and increased plasma leptin in breastfed infants. FEMS Microbiol Ecol, 96, n. 5, May 2020.

LAURSEN, M.F.; PEKMEZ, C.T.; LARSSON, M.W. et al. Maternal milk microbiota and oligosaccharides contribute to the infant gut microbiota assembly. ISME commun. 1, p.21, Jun 2021.

LEWIS, Z. T.; TOTTEN, S. M.; SMILOWITZ, J. T.; POPOVIC, M. et al. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. Microbiome, 3, p. 13, Apr 2015.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F.; MARTORELL, R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, IL: Human Kinetics Books, 1988.

LOUGHMAN, A.; PONSONBY, A. L.; O'HELY, M.; SYMEONIDES, C. et al. Gut microbiota composition during infancy and subsequent behavioural outcomes. EBioMedicine, 52, p. 102640, Feb 2020.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol. 71, n.12, p. 8228-35, Dec 2005.

MAGGI, S.; IRWIN, L. J.; SIDDIQI, A.; HERTZMAN, C. The social determinants of early child development: an overview. J Paediatr Child Health, 46, n. 11, p. 627-635, Nov 2010.

MAHER, S. E.; O'BRIEN, E. C.; MOORE, R. L.; BYRNE, D. F. et al. The association between the maternal diet and the maternal and infant gut microbiome: a systematic review. Br J Nutr, p. 1-29, Mar 2020.

MAJTA, J.; ODRZYWOLEK, K.; MILANOVIC, B.; HUBAR, V. et al. Identification of Differentiating Metabolic Pathways between Infant Gut Microbiome Populations Reveals Depletion of Function-Level Adaptation to Human Milk in the Finnish Population. mSphere, 4, n. 2, Mar 2019.

MARCHESI, J. R.; ADAMS, D. H.; FAVA, F.; HERMES, G. D. et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. Gut, 65, n. 2, p. 330-339, Feb 2016.

MARCOBAL, A.; BARBOZA, M.; FROEHLICH, J. W.; BLOCK, D. E. et al. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. J Agric Food Chem, 58, n. 9, p. 5334-5340, May 2010.

MCGUIRE, M. K.; MEEHAN, C. L.; MCGUIRE, M. A.; WILLIAMS, J. E. et al. What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. Am J Clin Nutr, 105, n. 5, p. 1086-1100, May 2017.

MESA, M. D.; LOUREIRO, B.; IGLESIA, I.; FERNANDEZ GONZALEZ, S. et al. The Evolving Microbiome from Pregnancy to Early Infancy: A Comprehensive Review. Nutrients, 12, n. 1, Jan 2020.

MONTEIRO, P. O.; VICTORA, C. G. Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life--a systematic review. Obes Rev, 6, n. 2, p. 143-154, May 2005.

MOORE, R. E.; TOWNSEND, S. D. Temporal development of the infant gut microbiome. Open Biol, 9, n. 9, p. 190128, Sep 2019.

MOOSSAVI, S.; ATAKORA, F.; MILIKU, K.; SEPEHRI, S. et al. Integrated Analysis of Human Milk Microbiota With Oligosaccharides and Fatty Acids in the CHILD Cohort. Front Nutr, 6, p. 58, May 2019.

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, p. 23133, Apr 2016.

NEVES, P. A. R.; VAZ, J. S.; MAIA, F. S.; BAKER, P. et al. Rates and time trends in the consumption of breastmilk, formula, and animal milk by children younger than 2 years from 2000 to 2019: analysis of 113 countries. Lancet Child Adolesc Health, 5, n. 9, p. 619-630, Sep. 2021.

NINONUEVO, M. R.; PARK, Y.; YIN, H.; ZHANG, J. et al. A strategy for annotating the human milk glycome. J Agric Food Chem, 54, n. 20, p. 7471-7480, Oct 2006.

OLIVEIRA, M. Estimativa dos custos da obesidade para o Sistema Único de Saúde do Brasil. Tese Doutorado. Faculdade de Ciências da Saúde, 109f. Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Child growth standards: lenght/heigth-for-age, weight-for-age, weight-for-lenght, weight-for-heigth and body mass index-for-age. Methods and development. WHO (nonserial publication, Geneva: World Health Organization,, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Comprehensive Implementation Plan on Maternal, Infant, and Young Child Nutrition, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Implementation guidance: protecting, promoting and supporting breastfeeding in facilities providing maternity and newborn services – the revised Baby-friendly Hospital Initiative. Geneva: World Health Organization, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Improving Early Childhood Development: WHO Guideline [Internet]. Geneva: World Health Organization, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Obesity and overweight. Geneva: World Health Organization, 2020.

ORCZYK-PAWIŁOWICZ, M.; LIS-KUBERKA, J. The Impact of Dietary Fucosylated Oligosaccharides and Glycoproteins of Human Milk on Infant Well-Being. Nutrients, 12, n. 4, Apr 2020.

PALIY, O.; PIYATHILAKE, C. J.; KOZYRSKYJ, A.; CELEP, G. et al. Excess body weight during pregnancy and offspring obesity: potential mechanisms. Nutrition, 30, n. 3, p. 245-251, Mar 2014.

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. e177, Jul 2007.

PERRELLA, S.; GRIDNEVA, Z.; LAI, C. T.; STINSON, L. et al. Human milk composition promotes optimal infant growth, development and health. Semin Perinatol, 45, n. 2, p. 151380, Mar 2021.

RICHTER, L. M.; CAPPA, C.; ISSA, G.; LU, C. et al. Data for action on early childhood development. Lancet, 396, n. 10265, p. 1784-1786, Dec 2020.

RINNINELLA, E.; RAOUL, P.; CINTONI, M.; FRANCESCHI, F. et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. Microorganisms, 7, n. 1, Jan 2019.

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

RODRÍGUEZ, J. M.; MURPHY, K.; STANTON, C.; ROSS, R. P. et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. Microb Ecol Health Dis, 26, p. 26050, Feb 2015.

ROWLAND, I.; GIBSON, G.; HEINKEN, A.; SCOTT, K. et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. Eur J Nutr, 57, n. 1, p. 1-24, Feb 2018.

ROTHENBERG, S. E.; CHEN, Q.; SHEN, J.; NONG, Y. et al. Neurodevelopment correlates with gut microbiota in a cross-sectional analysis of children at 3 years of age in rural China. Sci Rep, 11, n. 1, p. 7384, Jan. 2021.

RUTAYISIRE, E.; HUANG, K.; LIU, Y.; TAO, F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. BMC Gastroenterol, 16, n. 1, p. 86, Jul 2016.

SAKANAKA, M.; GOTOH, A.; YOSHIDA, K.; ODAMAKI, T. et al. Varied Pathways of Infant Gut-Associated. Nutrients, 12, n. 1, Dec 2019.

SAMUEL, T. M.; BINIA, A.; DE CASTRO, C. A.; THAKKAR, S. K. et al. Impact of maternal characteristics on human milk oligosaccharide composition over the first 4 months of lactation in a cohort of healthy European mothers. Sci Rep, 9, n. 1, p. 11767, Aug. 2019.

SCHEEPERS, L. E.; PENDERS, J.; MBAKWA, C. A.; THIJS, C. et al. The intestinal microbiota composition and weight development in children: the KOALA Birth Cohort Study. Int J Obes (Lond), 39, n. 1, p. 16-25, Jan 2015.

SCHWARZER, M.; MAKKI, K.; STORELLI, G.; MACHUCA-GAYET, I. et al. Lactobacillus plantarum strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. Science, 351, n. 6275, p. 854-857, Feb 2016.

SEFEROVIC, M. D.; MOHAMMAD, M.; PACE, R. M.; ENGEVIK, M. *et al.* Maternal diet alters human milk oligosaccharide composition with implications for the milk metagenome. Sci Rep, 10, n. 1, p. 22092, Dec 2020.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biol, 14, n. 8, p. e1002533, Aug 2016.

SHARON, G.; SAMPSON, T. R.; GESCHWIND, D. H.; MAZMANIAN, S. K. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. Cell, 167, n. 4, p. 915-932, Nov 2016.

SHIN, N. R.; WHON, T. W.; BAE, J. W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in

gut microbiota. Trends Biotechnol, 33, n. 9, p. 496-503, Sep 2015.

SHONKOFF, J. P.; GARNER, A. S.; HEALTH, C. O. P. A. O. C. A. F.; COMMITTEE ON EARLY CHILDHOOD, A. O., AND DEPENDENT CARE et al. The lifelong effects of early childhood adversity and toxic stress. Pediatrics, 129, n. 1, p. e232-246, Jan 2012.

SILVA, M. A. D.; MENDONÇA FILHO, E. J. D.; MÔNEGO, B. G.; BANDEIRA, D. R. Instruments for multidimensional assessment of child development: a systematic review. Early Child Development and Care, Oct 2018.

SILVER, K. L.; SINGER, P. A. A focus on child development. Science, 345, n. 6193, p. 121, Jul 2014.

SINGH, A.; YEH, C. J.; BLANCHARD, S. B. Ages and Stages Questionnaire: a global screening scale. Boletin Medico Del Hospital Infantil De Mexico, 74, n. 1, p. 5-12, Jan-Feb 2017.

SORDILLO, J. E.; KORRICK, S.; LARANJO, N.; CAREY, V. et al. Association of the Infant Gut Microbiome With Early Childhood Neurodevelopmental Outcomes: An Ancillary Study to the VDAART Randomized Clinical Trial. JAMA Netw Open, 2, n. 3, p. e190905, Mar 2019.

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, Apr 2003.

SPRENGER, G. A.; BAUMGÄRTNER, F.; ALBERMANN, C. Production of human milk oligosaccharides by enzymatic and whole-cell microbial biotransformations. J Biotechnol, 258, p. 79-91, Sep 2017.

SQUIRES, J.; TWOMBLY, E.; BRICKER, D.; POTTER, L. ASQ-3™ User's Guide, 2009.

STANISLAWSKI, M. A.; DABELEA, D.; WAGNER, B. D.; ISZATT, N. et al. Gut Microbiota in the First 2 Years of Life and the Association with Body Mass Index at Age 12 in a Norwegian Birth Cohort. mBio, 9, n. 5, Oct 2018.

STEWART, C. J.; AJAMI, N. J.; O'BRIEN, J. L.; HUTCHINSON, D. S. et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. Nature, 562, n. 7728, p. 583-588, Oct 2018.

TALARICO, S. T.; SANTOS, F. E.; BRANDT, K. G.; MARTINEZ, M. B. et al. Anaerobic bacteria in the intestinal microbiota of Brazilian children. Clinics (São Paulo), 72, n. 3, p. 154-160, Mar 2017.

TAMANA, S. K.; TUN, H. M.; KONYA, T.; CHARI, R. S. et al. Bacteroides-dominant gut microbiome of late infancy is associated with enhanced neurodevelopment. Gut Microbes, 13, n. 1, p. 1-17, Jan-Dec 2021.

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 2016.

THOMSON, P.; MEDINA, D. A.; GARRIDO, D. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. Food Microbiol, 75, p. 37-46, Oct 2018.

THURL, S.; MUNZERT, M.; BOEHM, G.; MATTHEWS, C. et al. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. Nutr Rev, 75, n. 11, p. 920-933, Nov 2017.

TIERNEY, A. L.; NELSON, C. A. Brain Development and the Role of Experience in the Early Years. Zero Three, 30, n. 2, p. 9-13, Nov 2009.

TOJO, R.; SUÁREZ, A.; CLEMENTE, M. G.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C. G. et al. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. World J Gastroenterol, 20, n. 41, p. 15163-15176, Nov 2014.

TONON, K.; B DE MORAIS, M.; F V ABRÃO, A. C.; MIRANDA, A. et al. Maternal and Infant Factors Associated with Human Milk Oligosaccharides Concentrations According to Secretor and Lewis Phenotypes. Nutrients, 11, n. 6, Jun 2019.

TURUNEN, J.; TEJESVI, M. V.; PAALANNE, N.; HEKKALA, J. *et al.* Presence of distinctive microbiome in the first-pass meconium of newborn infants. Sci Rep, 11, n. 1, p. 19449, Sep 30 2021.

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil – ENANI-2019: Resultados preliminares – Indicadores de aleitamento materno no Brasil. UFRJ: Rio de Janeiro, 2020.

VICTORA, C. G.; BAHL, R.; BARROS, A. J.; FRANÇA, G. V. et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. Lancet, 387, n. 10017, p. 475-490, Jan 2016.

WALTERS, D. D; PHAN. T. H; MATHISEN, R. The cost of not breastfeeding: global results from a new tool. Health Policy and Planning, 34, p. 407–417, July 2019.

WALSH, C.; LANE, J. A.; VAN SINDEREN, D.; HICKEY, R. M. Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health. J Funct Foods, 72, p. 104074, Sep 2020.

WANG, M.; LI, M.; WU, S.; LEBRILLA, C. B. et al. Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 60, n. 6, p. 825-833, Jun 2015.

WICIŃSKI, M.; SAWICKA, E.; GĘBALSKI, J.; KUBIAK, K. et al. Human Milk Oligosaccharides: Health Benefits, Potential Applications in Infant Formulas, and Pharmacology. Nutrients, 12, n. 1, Jan 2020.

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Physical status: the use and interpretation of

anthropometry. Geneve: Who library cataloguing-in-publication data, 1995.

ZEPPONE, S. C.; VOLPON, L. C.; DEL CIAMPO, L. A. Monitoring of child development held in Brazil. Rev. paul. Pediatr, 30, n.4, Dec 2012.

10. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO/SMS/ RJ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Composição do leite humano e o estado nutricional materno

Pesquisador: Gilberto Kac

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49218115.0.3001.5279

Instituição Proponente: Maternidade-Escola da UFRJ

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.407.247

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa apresentado a CEP Co-participante sobre um estudo longitudinal prospectivo em três etapas de seguimento: pré-natal, puerpério imediato (até sete dias após o parto) e no primeiro mês de pós-parto, que tem como objetivo avaliar a composição imunológica do leite humano e sua associação com o estado nutricional e transtornos mentais entre o terceiro trimestre de gravidez e o primeiro mês de amamentação.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a composição imunológica do leite humano, e sua associação com o estado nutricional e transtornos mentais entre o terceiro trimestre de gravidez e o primeiro mês de amamentação.

Objetivo Secundário:

- Estudar a magnitude da associação entre o IMC pré-gestacional, o ganho de peso gestacional e a composição imunológica do leite humano;
- Estudar a associação entre a idade gestacional e o peso no nascimento do lactente e da composição imunológica do leite humano;
- Estudar a associação entre o estado nutricional (antropometria, fatores clínico/sociais,

Endereço: Rua Evaristo da Veiga, 16, Sobreloja
Bairro: Centro **CEP:** 20.031-040
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2215-1485 **E-mail:** cepsms@rio.rj.gov.br

Anexo 2. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MATERNIDADE ESCOLA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO/ ME-UFRJ

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Composição do leite humano e o estado nutricional materno

Pesquisador: Gilberto Kac

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49218115.0.0000.5275

Instituição Proponente: Maternidade-Escola da UFRJ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.326.011

Apresentação do Projeto:

É um estudo longitudinal prospectivo em três etapas de seguimento: pré-natal, puerpério imediato (até sete dias de pós-parto) e no 1º mês de pós-parto.

Tem como objetivo avaliar a composição imunológica do leite humano, e sua associação com o estado nutricional e transtornos mentais entre o terceiro trimestre de gravidez e o primeiro mês de amamentação. Incluirá 80 mães e seus neonatos com as seguintes ondas de seguimento: 30-35 semanas gestacionais, entre 0-7 dias pós-parto e no primeiro mês após o nascimento. Em todos os momentos serão coletadas informações sobre o estado nutricional, a saúde mental, parâmetros clínicos (idade, pressão arterial, doenças prévias), bioquímicos (exames laboratoriais de rotina) e atividade física. As mães serão entrevistadas em 3 pontos: entre 30 e 35 semanas gestacionais, entre 0-7 dias pós-parto e no primeiro mês após o nascimento. Amostras de sangue materno serão coletadas nas três ondas de seguimento. O leite materno será coletado em dois diferentes pontos: 0-7 dias (pós-parto, colostro) e no primeiro mês (leite maduro); com determinações de alguns hormônios, citocinas, leptina, adiponectina, imunoglobulinas, complemento, moléculas de adesão e oligossacarídeos. As fezes do neonato serão coletadas na primeira semana e primeiro mês após o nascimento para a determinação da microbiota. O período de seguimento com as

Endereço: Rua das Laranjeiras, 180
Bairro: Laranjeiras **CEP:** 22.240-003
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2556-9747 **Fax:** (21)2205-9064 **E-mail:** cep@me.ufrj.br

Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 18. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Observatório de Epidemiologia Nutricional
Amamentação: Saúde para a mãe e o bebê

INJC

Você está sendo convidada a fazer parte da pesquisa **"Composição imunológica do leite humano e sua relação com o estado nutricional materno"** desenvolvida por pesquisadores do Observatório de Epidemiologia Nutricional, do Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro (INJC/UFRJ). Este estudo tem por objetivo principal avaliar a composição imunológica do leite materno e sua relação com o peso, altura, hábitos alimentares, saúde mental e desenvolvimento infantil.

Você não é obrigada a participar e mesmo aceitando fazer parte do estudo, poderá desistir e retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem nenhum problema. Sua recusa em participar do estudo não trará nenhum problema em sua relação com o pesquisador, com o seu médico ou com o centro de saúde ou maternidade, ou seja, você poderá seguir normalmente com o seu atendimento nesta unidade de saúde.

Como irei participar?

Você passará por avaliações do seu estado nutricional (peso e altura) e de saúde geral, totalizando **6 encontros** com nossa equipe:

- Primeiro: durante o pré-natal (entre 30 e 35 semanas de gestação);
- Segundo: até 7 dias após o parto;
- Terceiro: entre 28 e 45 dias após o parto;
- Quarto: entre 89 e 119 dias após o parto;
- Quinto: 6 meses após o parto;
- Sexto: 12 meses após o parto;

Todas estas avaliações serão preferencialmente agendadas em dias em que você já tenha que vir a Clínica da Família Assis Valente, a fim de evitar despesas extras com transporte. Os encontros terão duração aproximada de 60 minutos.

Durante os encontros, você irá responder algumas perguntas e preencher questionários com informações sobre sua identificação e localização (endereço e telefone); dados demográficos (estado civil, idade); situação socioeconômica (escolaridade, renda); hábitos de vida (uso de álcool, fumo, prática de atividade física e alimentação), uso de medicamentos; saúde mental (perguntas sobre depressão e ansiedade) e desenvolvimento do seu bebê. Você poderá receber ligações telefônicas da equipe de pesquisa para resgatar informações, bem como para o agendamento dos encontros.

Em todos os encontros iremos avaliar seu peso e altura. Amostras de sangue serão coletadas 3 vezes (no primeiro, segundo e terceiro encontros) e serão armazenadas e utilizadas para a realização de exames como, por exemplo, hemograma, dosagem de açúcares, gorduras e hormônios. Você deverá coletar 2 vezes (no segundo e terceiro encontros) cerca de 20 ml do seu leite, de forma manual, para que possamos analisar sua composição. Você também irá coletar suas fezes 3 vezes (primeiro, segundo e terceiro encontros) e de seu bebê 2 vezes (segundo e terceiro encontros) para que possamos realizar análises laboratoriais. Para isto, forneceremos o recipiente adequado e um isopor para armazenamento durante o transporte, o qual deverá ser trazido nos dias solicitados. As fezes deverão ser coletadas no mesmo dia da avaliação e deverão ser mantidas refrigeradas até a entrega à equipe de pesquisa. Seu bebê também será avaliado, sendo realizadas medidas de peso e comprimento e a partir do quarto até o sétimo encontro você irá responder perguntas relacionadas ao desenvolvimento cognitivo e motor do seu bebê.

As amostras de sangue, leite e fezes serão armazenadas no INJC/UFRJ, por um prazo de até 10 anos e ficarão sob responsabilidade institucional e gerenciamento do pesquisador responsável pela pesquisa, sem fins comerciais, em um sistema seguro de identificação, garantindo o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos dados para fornecimento de informações de interesse da pesquisa. As amostras poderão ser utilizadas em pesquisas futuras, as quais serão avaliadas por Comitês de Ética em Pesquisa (CEP´s) e outras análises não previstas neste estudo poderão ser realizadas mediante sua autorização por meio de um novo termo de consentimento livre e esclarecido.

Todos os exames laboratoriais, bem como a avaliação nutricional e do estado de saúde serão realizados sem custos para o participante da pesquisa.

Quais os benefícios?

Rubrica do participante: _____

Ao participar deste estudo, você terá a opor
estado de saúde, que poderá auxiliar na saúde do Rubrica do pesquisador: _____
resultados se assim desejar. Os resultados desta pesquisa poderão trazer benefícios para futuras mães e seus bebês. Além disso, você será informada caso seja detectado algum problema de saúde e aconselhada a procurar o profissional adequado para o acompanhamento.

Quais os riscos?

A avaliação do estado nutricional, entrevista sobre saúde mental, coleta e utilização de amostras de sangue, leite e fezes serão realizados com todos os esforços para evitar possíveis danos, sejam de dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual decorrentes deste projeto de pesquisa, durante o período de gravidez ou no pós-parto para a mãe e/ou para a criança. Todas as coletas de sangue serão realizadas com **material descartável, a fim de evitar contaminação.** Em algumas pessoas pode aparecer um hematoma (mancha arroxeada) no local de retirada do sangue, que desaparecerá em poucos dias e não tem necessidade de atenção ou cuidado especial.

O pesquisador se compromete a proporcionar de forma gratuita assistência imediata e integral ao participante da pesquisa (mãe ou criança durante e após a gestação) por qualquer dano decorrente imediato ou posterior, direto ou indireto do projeto de pesquisa pelo tempo que for necessário. O pesquisador responsável por este projeto se compromete a suspender a pesquisa imediatamente ao perceber que ocorreu qualquer risco ou dano, previsto ou não neste termo. O problema será comunicado ao médico responsável pelo seu acompanhamento e as devidas providências serão tomadas em caráter imediato, sendo comunicado ao Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, ao Comitê de Ética da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Responsabilidades do pesquisador

Todas as informações que você fornecer serão mantidas em sigilo e utilizadas apenas para fins de pesquisa. Nenhuma outra pessoa ou profissional terá acesso a suas informações, somente os pesquisadores. Quando divulgarmos os resultados deste trabalho, seu nome e localização **NÃO serão revelados.**

Este termo de consentimento é um documento importante e você irá receber uma via na qual consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, **podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.**

Uma via deste consentimento informado será arquivada no Observatório de Epidemiologia Nutricional, do INJC/UFRJ.

Meu consentimento

Li e concordo em participar desta pesquisa.

Rio de Janeiro, _____/_____/_____

_____

Nome e assinatura do pesquisador

_____

Nome e assinatura do participante da pesquisa

Contato do coordenador da pesquisa
Professor Dr. Gilberto Kac
Observatório de Epidemiologia Nutricional
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro (INJC/UFRJ)
Telefones: 39386595 / **993152301**
E-mail: gilberto.kac@gmail.com

Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil / Comitê de Ética em Pesquisa
Rua Evaristo da Veiga, 16 – Sobreloja - Centro
Cep – 20031-040
Telefone: 22151485
E-mail: cepsms@rio.rj.gov.br

Anexo 4. Questionários, protocolo de coleta de leite humano e de fezes da criança (online).

Disponível em:
https://drive.google.com/drive/u/0/folders/1ul8g9AKAEjpNORB0GGlVLpoUvhCP-f0Z