UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

EFEITO DO CONSUMO DE FÓRMULAS INFANTIS SUPLEMENTADAS COM PREBIÓTICOS NA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE ENSAIOS CLÍNICOS RANDOMIZADOS

TARSIS MARINE DA SILVA FERREIRA

RIO DE JANEIRO

2021

EFEITO DO CONSUMO DE FÓRMULAS INFANTIS SUPLEMENTADAS COM PREBIÓTICOS NA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE ENSAIOS CLÍNICOS RANDOMIZADOS

Tarsis Marine da Silva Ferreira

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

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Marcia Soares da Mota e Silva Lopes

Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Patrícia Coelho de Velasco

Rio de Janeiro
Dezembro/2021

EFEITO DO CONSUMO DE FÓRMULAS INFANTIS SUPLEMENTADAS COM PREBIÓTICOS NA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE ENSAIOS CLÍNICOS RANDOMIZADOS

Tarsis Marine da Silva Ferreira

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

Banca Examinadora

_____

Prof$^{a.}$ Dr$^{a.}$ Marcia Soares da Mota e Silva Lopes
(Orientadora e Presidente)
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

_____

Prof$^{a.}$ Dr$^{a.}$ Elisa Lacerda (Revisora)
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

_____

Prof$^{a.}$ Dr$^{a.}$ Patricia de Carvalho Padilha
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

_____

Prof$^{a.}$ Dr$^{a.}$ Cláudia dos Santos Cople Rodrigues
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Dezembro/2021

Ficha catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

FF383e

Ferreira, Tarsis Marine da Silva
EFEITO DO CONSUMO DE FÓRMULAS INFANTIS SUPLEMENTADAS COM PREBIÓTICOS NA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL: UMA REVISA?O SISTEMA?TICA DE ENSAIOS CLÍNICOS RANDOMIZADOS / Tarsis Marine da Silva Ferreira. -- Rio de Janeiro, 2021.
86 f.

Orientadora: Marcia Soares da Mota e Silva Lopes .
Coorientadora: Patrícia Coelho de Velasco.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2021.

1. Fórmula infantil. 2. Prebióticos. 3. Microbiota intestinal. I. Lopes , Marcia Soares da Mota e Silva , orient. II. de Velasco, Patrícia Coelho , coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Dedicatória

Dedico essa dissertação a minha filha
Lucie, que mamãe possa ser uma
inspiração nos estudos para você, e que
sempre tenha uma mente criativa e
questionadora.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela vida.

Aos meus pais Márcia e Dalcinei por serem um exemplo nos estudos e na vida. Se cheguei até aqui academicamente foi causa por vocês.

Agradeço ao meu esposo Fernando, por todo incentivo com o mestrado, sempre me incentivando a continuar. Por toda ajuda com a Lucie, de madrugada, quando precisava ir assistir aulas ou durante as reuniões. Sem você seria impossível.

À minha sogra Rose por toda vez que me ajudou com a Lucie pra que pudesse continuar estudando e tendo reuniões.

À Katia por ser outro exemplo de que sem estudar não chegamos a lugar nenhum, obrigada por sempre perguntar como estava o desenvolvimento da dissertação.

À Natalia por embarcar nesse louco processo que é desenvolver uma revisão sistemática.

À Patrícia por sua coorientação, mesmo com toda mudança do que seria o mestrado inicialmente. Suas contribuições foram essenciais para o desenvolvimento desta dissertação. Além de ser um exemplo de profissional que desejo ser.

E finalmente à Márcia, muito obrigada por aceitar essa orientação no meio do caminho, certamente sem você esse trabalho não seria desenvolvido. Obrigada pelo carinho e toda compreensão.

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês', diz o Senhor, 'planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro.”
Jeremias 29:11

“Great things are done by a series of small things brought together.”
Vincent Van Gogh.

“I was taught that the way of progress was neither swift nor easy.”
Marie Curie

Resumo da dissertação apresentada ao PPGN/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **mestre em Nutrição Humana**.

EFEITO DO CONSUMO DE FÓRMULAS INFANTIS SUPLEMENTADAS COM PREBIÓTICOS NA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE ENSAIOS CLÍNICOS RANDOMIZADOS

Tarsis Marine da Silva Ferreira

Dezembro/2021

Orientadores: Marcia Soares da Mota e Silva Lopes
Patrícia Coelho de Velasco

RESUMO

O desenvolvimento da microbiota gastrointestinal nas primeiras fases da vida está relacionado com a saúde do indivíduo em longo prazo. O tipo de leite (leite materno ou fórmula infantil) recebido por recém-nascidos e lactentes pode influenciar a composição rda microbiota. Este estudo, por meio de revisão sistemática, tem por objetivo revisar sistematicamente a literatura para avaliar se o consumo de fórmulas infantis suplementadas com prebióticos é capaz de modular a composição da microbiota gastrointestinal infantil até pelo menos um ano de vida. O protocolo do estudo foi registrado no PROSPERO - *International Prospective Register of Systematic Reviews*. Utilizou-se sete bases de dados (*Pubmed*, *Web of Science*, *Scopus*, *Embase*, FSTA, CINAHAL e *Open Grey*) para buscar ensaios clínicos randomizados que atendessem a determinados critérios de inclusão e exclusão. O risco de viés foi avaliado com a ferramenta *Risk of Bias 2* (RoB 2). Um total de 3164 resumos foram identificados e 14 estudos foram elegíveis e submetidos à extração de dados, por meio de um formulário específico para este estudo. As fórmulas suplementadas com galacto-oligossacarídeos (GOS) foram capazes de estimular a colonização do gênero *Bifidobacterium*. Para as fórmulas com fruto-oligossacarídeos (FOS) quatro ensaios observaram aumento do gênero e um não encontrou diferença entre os grupos avaliados. Os que analisaram suplementação de GOS/FOS, dois ensaios não observaram o aumento do gênero *Bifidobacterium*, enquanto três trabalhos encontraram diferenças. O uso de polidextrose e GOS, e oligofrutose e inulina também foram capazes de aumentar a colonização do gênero. Para o filo Bacteroidetes, apenas um ensaio com oligofrutose e inulina foi capaz

de aumentar a colonização. Um único ensaio com GOS foi capaz de aumenar as contagens de *Lactobacillus*. Para o gênero *Clostridium* a redução de colonização foi observada nas fórmulas infantis com GOS (dois estudos), polidextrose e GOS e scGOS/lcFOS (um estudo). E para a família *Enterobacteriaceae*, um estudo com oligofrutose e inulina apresentou redução no grupo prebiótico. O efeito na microbiota depende do tipo de prebiótico utilizado, do tempo de intervenção e quantidade de prebiótico suplementado nas fórmulas. O método de análise também variou, o que pode ter interferido nos desfechos. Mais estudos clínicos randomizados com qualidade e sem patrocínio são importantes para definir os efeitos e a resposta do uso de fórmulas com prebióticos no desenvolvimento da microbiota de lactentes

Palavras chave: fórmula infantil; prebióticos; oligossacarídeo; fibra dietética; microbiota; composição da microbiota; *Bifidobacterium; Lactobacillus.*

EFFECT OF THE CONSUMPTION OF INFANT FORMULA SUPPLEMENTED WITH PREBIOTICS ON THE GASTROINTESTINAL MICROBIOTA: A SYSTEMATIC REVIEW OF RANDOMIZED CLINICAL TRIALS

Tarsis Marine da Silva Ferreira

December/2021

Advisors: Marcia Soares da Mota e Silva Lopes
· Patrícia Coelho de Velasco

ABSTRACT

The development of the gastrointestinal microbiota in the early stages of life is related to the individual's long-term health. The type of milk (breast milk or infant formula) provided to newborn and infants can influence the composition of the intestinal microbiota. This study, through a systematic review, aims to describe the relationship between the consumption of infant formula supplemented with prebiotics and a composition of the intestinal microbiota. The protocol of this study has been registered at the PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews). Seven databases (Pubmed, Web of Science, Scopus, Embase, FSTA, CINAHAL and Open Grey) were used to search for randomized controlled trials (RCT) that met some inclusion and exclusion criteria. Risk of bias was assessed through the tool RoB 2 (Risk of Bias 2). A total of 3164 abstracts were retrieved, of which 14 were submitted to data extraction, through a form designed specifically for this study. The formulas supplemented with galactooligosaccharides (GOS) were able to stimulate the colonization of the genus Bifidobacterium. For formulas with fructo-oligosaccharides (FOS) four trials observed an increase in gender and one found no difference between the evaluated groups. Of those that analyzed GOS/FOS supplementation, two trials did not observe an increase in the Bifidobacterium genus, while three studies found differences. The use of polydextrose and GOS, and oligofructose and inulin were also able to increase colonization of the genus. For the phylum Bacteroidetes, only one assay with oligofructose and inulin was able to increase colonization. A single GOS assay was able to increase Lactobacillus counts. Infant formulas with GOS (two studies), polydextrose and GOS and scGOS/lcFOS (one study) reduces Clostridium colonization. And for the Enterobacteriaceae family, a study with oligofructose showed a reduction in the prebiotic group. The effect on the microbiota depends on the type of prebiotic used, the intervention time and the amount of prebiotic supplemented in the formulas. The method of analysis

also varied, which may have interfered with the outcomes. More randomized clinical trials with quality are important to define the effects and response of the use of formulas with prebiotics on the development of infants' microbiota.

Keywords: infant formula; prebiotics; oligossacharide; dietetic fiber; microbiota composition; *Bifidobacterium; Lactobacillus*.

Sumário

Lista de tabelas 13
Lista de quadros 14
Lista de figuras 15
Lista de anexo 16
Lista de abreviações e siglas 17
1. Introdução 18
2. Revisão da literatura 21
2.1. Composição do leite 21
2.1.1. Macronutrientes, micronutrientes e outros componente 21
2.2. Leite humano e a microbiota intestinal infantil 24
2.2.1. Colonização da microbiota e sua composição 26
2.3. Definição, função e classificação de prebióticos 29
2.3.1. Tipos de prebióticos 30
2.3.2. Frutanos, galactooligossacarídeos, oligossacarídeos derivados de amido e glicose, outros oligossacarídeos e oligossacarídeos não carboidratos 31
2.4. História das fórmulas infantis 33
2.5. Diretrizes para produção e composição de fórmulas infantis 36
2.6. Fórmulas prebióticas 38
2.7. Legislação brasileira 39
3. Justificativa 41
4. Objetivos 42
4.1. Objetivo geral 42
4.2. Objetivos específicos 42
5. Métodos 43
5.1. Registro do protocolo 43
5.2. Desenho de estudo 43
5.3. Critérios de inclusão e exclusão 43
5.4. Estratégia de busca 44
5.5. Gerenciamento em softwares de referências 46
5.6. Risco de viés 46
5.7. Extração de dados 48
6. Resultados 49
6.1. Manuscrito 49
Abstract 49
Background 49
Methods 50
Results 51
Table 1: Summary of the findings of included trials 54
Effects on gastrointestinal microbiota composition 58
Bifidobacterium genus 58
Bacteroidetes phyla 59
Firmicutes phyla (Clostridium spp. and Lactobacillus spp.) 60
Enterobacteriaceae family (Escherichia coli) 61
Discussion 61
Conclusion 64
Abbreviations 64
References 65
Supplementary figure 1: PRISMA flow diagram. 71

Supplementary table 1 72
Supplementary table 2 74
7. Conclusão 76
Referências 77
Anexo1 86

Lista de tabelas

Table List

Table 1*: Summary findings of included trials* 54

Lista de quadros

Quadro 1: Composição do leite humano - macronutrientes (g/dL) e energia (kcal/dL) 22
Quadro 2: Composição nutricional de fórmulas infantis (quantidade por 100 kcal da fórmula) 37
Quadro 3: Bases de dados utilizadas e estratégias de busca 44
Quadro 4: Descrição dos tipos de viés existentes e as questões abordadas em cada.... 47

Lista de figuras

Figura 1: Principais funções desempenhadas por oligossacarídeos do leite humano no organismo humano 25
Figura 2: Representação do mecanismo pelo qual os oligossacaródeos do leite humano inibem infecção de bactérias patogênicas..... 26
Figura 3: Exemplo da taxonomia da microbiota gastrointestinal. Nos balões são citadas algumas bactérias pertencentes aos determinados táxons. 28
Figura 4: Representação do mecanismo de ação e benefícios potenciais à saúde desempenhados pelos prebióticos..... 30
Figura 5: Estrutura simplificada dos principais prebióticos encontrados em fórmulas infantis.. 32

Lista de anexo

Anexo 1 87

Lista de abreviações e siglas

16S rRNA	*16S ribosomal RNA* – RNA ribossomal 16S
a.C.	antes de Cristo
AGCC	ácidos graxos de cadeia curta
AME	aleitamento materno exclusivo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BF	*breastfed* - amamentado
CINHAL	*Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature*
COS	carboidratos oligossacarídeos
DP	desvio padrão
EMBASE	*Electronic database of publisher Elsevier*
FI	fórmula infantil ou fórmulas infantis
FOS	frutooligossacarídeos
FP	fórmula prebiótica
FSTA	*Food Science and Technology Abstracts*
GOS	galactooligossacarídeos
GUL	*guidance upper levels*
HMO	*Human milk oligossascharide* – oligossacarídeos do leite humano
ISAPP	*International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics* - Associação Internacional Científica de Probióticos e Prebióticos
lcFOS	*long chain FOS* – Fruto-oligossacarídeos de cadeia longa
MO	*months of age* – meses de idade
NE	não especificado
NI	*not informed* – não informado
NS	*not significant* – não significativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	oligossacarídeos ou *oligossacharide*
PCR	*Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase
PDX	polidextrose
POS	P*ectic oligosaccharide*
PPGN	Programa de Pós-Graduação em Nutrição
PROSPERO	*International Prospective Register of Systematic Reviews*
PUBMED	*US Natural library of medicine*
qPCR	*quantative Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase quantitativa
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RN	recém-nascido
RoB2	*Risk of Bias 2*– Risco de viés 2
rt-PCR	*real time polymerase chain reaction*– reação em cadeia da polimerase em tempo real
scGOS	*short chain GOS* – galactooligossacarídeos de cadeia curta
SCOPUS	*Elsevier's scientific abstracts and citations database*
SD	*standard deviation* – desvio padrão
SF	*standard formula* – fórmula padrão
SMA	*synthetic milk adapted* – leite sintético adaptado
TGI	trato gatrointestinal
USA	*United States of America* – Estados Unidos da América

1. Introdução

A composição da microbiota intestinal corresponde a 90% de bactérias, além de fungos, arqueas e vírus, e são designados como microbiota gastrointestinal (TURNBAUGH et al., 2007). As bactérias presentes na microbiota do TGI podem ser patogênicas ou oportunistas, além das benéficas que são comensais e mutualistas ao organismo humano (THURSBY; JUGE, 2017). De maneira geral, a microbiota atua em em funções fisiológicas de seu hospedeiro, como no fortalecimento da integridade intestinal (NATIVIDAD, 2013), na proteção contra patógenos (BÄUMLER, 2016) e na regulação do sistema imunológico (GENSOLLEN et al., 2016). A disbiose é o quadro de desequilibrio na relação de simbiose entre hospedeiro e sua microbiota. A microbiota está intimamente associada à manutenção da saúde. Estudos aindam não tem consenso se a disbiose e a perda de funcionalidade podem favorecer o desenvolvimento doenças, ou se são as doenças que geram a disbiose (como de obesidade, esteatose hepática, colite ulcerativa, síndrome do intestino irritável, alergias, asma) (CHANG, 2016; WILKINS; MONGA; MILLER, 2019; BRÜSSOW, 2020; DUAR et al., 2020).

Fatores ambientais e genéticos são capazes de alterar a composição, a diversidade e a funcionalidade das bactérias intestinais. Em crianças, por exemplo, o tipo de parto, o uso de antibióticos, a amamentação, o uso de fórmulas infantis e a introdução alimentar precoce são alguns dos fatores conhecidos que atuam na formação da microbiota (BOKULICH, 2016; RINNIELLA et al., 2019). Uma microbiota saudável terá influência em longo prazo em infecções gastrointestinais, alergias alimentares, risco de desenvolver doenças crônicas não transmissíveis, aquisição de habilidades, cognição, entre outros (TAMBURINI et al., 2016). A colonização intestinal infantil ocorre na primeira infância (COLLADO et al., 2016) e atua como mecanismo de proteção à saúde (defesa contra microrganismos patogênicos) e na digestão e metabolização de compostos do leite materno e/ou fórmula infantil (KAO; YOUNG, 2015). A quantidade exata de microrganismos que compõe a microbiota ainda é desconhecida, no entanto sabe-se que nos primeiros meses de vida os filos mais encontrados são *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (KOENIG et al., 2011; SPOR et al., 2011; OTTMAN et al., 2012; LANDMAN et al., 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a introdução de alimentação sólida complementar, além do leite materno, a partir dos 6 meses de idade. Dado que crianças amamentadas exclusivamente por um maior período de tempo apresentam menor

prevalência de infecções gastrointestinais (WHO, 2001). Ademais observa-se a redução de infecções respiratórias, redução da Síndrome da Morte Súbita Infantil e enterocolite necrosante (em crianças prematuras) (IP et al., 2007). A amamentação prolongada até os 2 anos de idade ou mais pode oferecer a menor chance de desenvolver excesso de peso infantil, diabetes mellitus do tipo 2, leucemia aguda linfoblástica e mieloblástica durante a infância, e com aumento no quociente de inteligência da criança (IP et al., 2007; AMITAY; KEINAN-BOKER, 2015; HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015; TAMBURINI et al., 2016). O estímulo ao aleitamento materno é fundamental para promoção da saúde do lactente, pois nenhuma fórmula infantil é capaz de substituir os benefícios oferecidos pela amamentação. No Brasil, o Guia Alimentar para Crianças Brasileiras Menores de 2 anos também recomenda a amamentação exclusiva por 6 meses. A amamentação promove um vínculo afetivo entre mãe e filho e apresenta componentes nutricionais imunológicos. A oferta de alimentação complementar antes desde período pode reduzir a absorção de nutrientes presentes no leite como ferro e zinco, e aumenta o risco de engasgo em decorrência da imaturidade motora e dos órgãos infantis (BRASIL, 2021).

Existem algumas condições à qual o aleitamento materno é contraindicado, pois podem levar a prejuízos à saúde materna e/ou lactente. As contraindicações maternas permanentes são câncer de mama, mulheres portadoras do vírus da imunodeficiência humana e do vírus linfotrópico da célula T humana 1 e 2 (CARDOSO; FERNANDES, 2013). Enquanto as condições neonatais são galactosemia, e intolerância a glicose, malformações oro faciais e de orofaringe, esôfago e traqueia, intolerância a algum componente do leite. As condições temporárias que podem afetar o aleitamento são infecções dos herpes vírus e varicela, doença de Chagas, utilização de narcóticos, tratamentos quimioterápicos e/ou radioterápicos (BRASIL, 2015). Nestes casos específicos a utilização de fórmula infantil pode oferecer maior benefício aos lactentes comparado ao uso de leite de vaca engrossada. É importante destacar que o uso de FI deve ser apenas em situações de extrema necessidade, quando as tentativas de estabelecer o aleitamento não são bem sucedidas.

O tipo de alimentação é um fator reconhecidamente importante e que irá influenciar o perfil bacteriano do recém-nascido. Diversos estudos relatam que a microbiota de crianças alimentadas com fórmulas infantis (FI) geralmente é colonizada com *Escherichia coli*, *Bacteroides* e *Clostridium difficile*, e lactentes em aleitamento materno

exclusivo (AME) apresentam maior abundância e diversidade de *Bifidobacterium* spp. (ROGER, 2010; BEZIRTZOGLOU et al., 2011; AZAD et al., 2013). As bifidobactérias são responsáveis por fermentar os galactooligossacarídeos (GOS), um dos componentes do leite materno. Os oligossacarídeos do leite humano (LH), mais conhecidos por sua sigla em inglês, HMO (*human milk oligosaccharides*), possuem "efeito prebiótico", visto que são capazes de estimular seletivamente espécies de *Bifidobacterium* (PRATICÒ et al., 2014). Outro componente que possui "efeito prebiótico" é o β-palmitato, presente naturalmente no leite humano e adicionado às FI (YARON et al., 2013).

O leite de vaca, principal fonte para a produção de FI, apresenta pequenas quantidades de prebióticos. Desta maneira, diferentes tipos de prebióticos oligossacarídeos (OS) são adicionados às FI, com o objetivo de assemelhar-se à composição e benefícios do leite materno. Crianças que utilizam fórmulas enriquecidas com prebióticos geralmente apresentam baixo pH das fezes, melhora na consistência e frequência de evacuação (VANDENPLAS, 2015).

Revisões sistenáticas anteriores observaram a segurança e crescimento normal de crianças que utilizaram FI suplementadas com prebióticos. As revisões de Braegger et al. (2011) e Skórka et al. (2018) abordaram sobre os efeitos clínicos do uso de FI suplementadas com prebióticos, como: crescimento, tolerância, frequência e consistência das fezes, infecções gastrointestinais e diarréia, infecções respiratórias, manifestações alergicas e tratamento com antibiótico. Demostraram a seguraça em relação ao uso deste tipo de FI, tendo como beneficio primário, o amolecimento das fezes. A meta-análise de Mugambi et al. (2012) avaliou a suplementação de FI com simbióticos, probióticos ou prebióticos, em relação a última dos estudos que avaliaram a microbiota infantil apenas quatro aumentaram significativamente as concentrações de *Bifidobacterium.* Para o gênero *Lactobacillus* dois ensaios reportaram aumento. Para as bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Bacteroides* e *C. difficile* não houve diferença entre os grupos. Todavia ao avaliar os doze ensaios clínicos incluídos

2. Revisão da literatura

2.1. Composição do leite humano

O leite humano é a melhor fonte de nutrição para recém-nascidos e lactentes, tanto em relação a sua composição nutricional quanto aos seus fatores bioativos não-nutricionais, que auxiliam no desenvolvimento da saúde e promovem a sobrevivência infantil. Existe uma gama de estudos sobre a composição do LH, conduzidos em diferentes populações, com diferentes métodos de coleta, armazenamento e testagem (SAMUEL et al., 2020). O padrão ouro envolve amostras de leite durante 24 horas, visto que sua composição se altera ao longo do dia, com coletas múltiplas do mesmo indivíduo ao longo do tempo (NOMMSEN et al., 1991). Entretanto, esse método é custoso e limitante, a maior parte dos estudos é conduzida com amostras não padronizadas de doadoras de banco de leite. O leite é coletado em diferentes horas do dia, com diferentes intervalos entre amamentação e em diversos estágios da lactação. Desta maneira as diferenças encontradas podem ser explicadas pelo tempo de armazenamento das amostras, quantas vezes foram descongeladas e o processo de pasteurização (BALLARD; MORROW, 2013).

2.1.1. Macronutrientes, micronutrientes e outros componentes

No leite maduro, a média da composição de macronutrientes é de 0,9 - 1,2 g/dL de proteína, 3,2 - 3,6 g/dL de gordura e 6,7 - 7,8 g/dL de carboidratos (lactose); o valor energético varia entre 65 - 70 kcal/dL, estando diretamente relacionada com a concentração de gordura. O leite de criança a termo e de prematuro são diferentes, sendo o último com tendência a apresentar maiores quantidades de proteínas e gordura (**Quadro 1)** (PICCIANO, 2001; BALLARD; MORROW, 2013; KIM; YI, 2020). Algumas características maternas estão associadas com a composição do leite, como peso materno pela estatura, ingestão proteica, gravidez, retorno da menstruação e frequência de amamentação (NOMMSEN et al., 1991).

Quadro 1: Composição do leite humano - macronutrientes (g/dL) e energia (kcal/dL)

	Proteína (±2 DP) (g/dL)	Lipídios (±2 DP) (g/dL)	Carboidratos (±2 DP) (g/dL)	Energia (±2 DP) (kcal/dL)
Crianças a termo (coleta 24h) - leite maduro	1,2 (0,9 -1,5)	3,6 (2,2 – 5,0)	7,4 (7,2 -7,7)	70 (57- 83)
Prematuros				
< 29 semanas	2,2 (1,3 – 3,3)	4,4 (2,6 – 6,2)	7,6 (6,4 – 8,8)	78 (61 - 94)
Entre 32-33 semanas	1,9 (1,3 – 2,5)	4,8 (2,8 – 6,8)	7,5 (6,5 – 8,5)	77 (64 - 89)
Amostras doadas	0,9 – 1.2 (0,9 – 1,7)	3,2 -3,6 (1,2 – 8,9)	7,2-7,8 (6,0 – 9,6)	65- 67 (43-115)
Valores de referência	0,9	3,5	65	65 – 70

DP: desvio padrão. Adaptado: BALLARD; MORROW, 2013

As proteínas do LH são divididas entre proteínas do soro e caseína (complexos ou frações). As mais abundantes são caseína, lactoferrina, alfa-lactoalbumina, imunoglobulina A secretória, albumina sérica e lisozima (LÖNNERDAL, 2004). Compostos contendo nitrogênio não-proteicos, como ureia, ácido úrico, creatina, creatinina, aminoácidos e nucleotídeos representam aproximadamente 25% do nitrogênio do LH. As concentrações de proteína diminuem nas primeiras 4 a 6 semanas de vida e sofrem alterações pela dieta materna (NOMMSEN et al., 1991; BAUER; GERSS, 2011).

Os ácidos graxos são os constituintes mais variáveis do LH, correspondendo de 3% a 5% de sua composição, divididos em triacilgliceróis (98%), fosfolipídios (1%) e esteróis (0,5%) (SEGURA et al., 2016). A síntese da gordura é realizada pelas células mamárias alveolares, sendo estimulada pelo esvaziamento da mama e pela prolactina, secretada no lobo anterior da hipófise. Os lipídios circulantes no sangue materno, os derivados da dieta ou de seus depósitos serão os responsáveis pela maior proporção de gordura no leite. Ácidos graxos saturados (10-14 átomos de carbono) também podem ser produzidos “de novo” a partir da glicose, na glândula mamária (RODRIGUEZ-PALMERO et al., 1999). O perfil de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (n-3 e 6) do LH pode alterar, conforme a dieta materna (VALENTINE et al., 2010; MARTIN et al., 2016).

O principal carboidrato encontrado no LH é a lactose sua concentração entre 6,7 a 7,8 g/L e fornece entre 45% a 50% do conteúdo energético total, apresenta a menor variação dentre os macronutrientes e demonstra uma importante função na síntese láctea, em virtude da síntese de lactose e a fração de água drenada para o leite. A glicose (0,2 g/L) está presente em concentração mais baixa, se comparada à lactose (BALLARD; MORROW, 2013). Outros carboidratos como glicolipídios, glicoproteínas e oligossacarídeos também estão presentes no LH (PICCIANO, 2001).

A concentração dos micronutrientes no LH depende diretamente dos estoques e da dieta materna (isso inclui as vitaminas A, B1, B2, B6, B12, D e iodeto). Durante o período de lactação, o uso de suplementos multivitamínicos pode ser recomendado, visto que a dieta materna nem sempre alcança as recomendações diárias de referência (LEE et al., 2011). A presença de vitamina K no LH é baixa, entretanto a suplementação materna é capaz de aumentar as concentrações séricas nas mães e nos lactentes. A vitamina D também apresenta baixa concentração no leite, desta maneira, recomenda-se a suplementação lactente, bem como a exposição solar. As recomendações de suplementação materna e lactente devem ser consideradas para cada indivíduo conforme suas necessidades específicas (GREER, 2001; DAWODU et al., 2014). Além dos nutrientes presentes no LH, há fatores protetores contra infecções (PALMEIRA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2016), incluindo:

- Imunoglobulinas: principalmente a imunoglobulina A, que reveste a mucosa intestinal e previnem a invasão bacteriana nas células;
- Leucócitos: monócitos, linfócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos são responsáveis por neutralizar infecções de microrganismos;
- Citocinas e quimiocinas: modulam processos inflamatórios;
- Lisozima e lactoferrina: possuem efeito citotóxico em bactérias, fungos e vírus;
- Fatores de crescimento: atuam no crescimento e desenvolvimento do TGI, na vasculatura, no sistema nervoso e no sistema endócrino;
- Oligossacarídeos: previnem a ligação de microrganismos na superfície da mucosa intestinal, participam da maturação do sistema imune e do crescimento de diversas espécies de bifidobactérias no intestino.

2.2. Leite humano e a microbiota intestinal infantil

No momento do nascimento os lactentes se expõem a uma série de microrganismos ambientais e maternos (PEREZ-MUÑOZ et al., 2017; KORPELA et al., 2018). A microbiota gastrointestinal infantil é colonizada, progressivamente, por uma densa população microbiana. A microbiota materna exerce um papel crucial, como é possível observar na diferença entre crianças nascidas via vaginal ou por meio de cesárea (DOGRA, 2015; KORPELA et al., 2018; STEWART et al., 2018; PRINSCIVAL et al., 2021). A nutrição também possui importante papel na composição da microbiota gastrointestinal, que é diferente entre crianças amamentadas, não amamentadas ou que utilizam fórmula infantil (FI) (BÄCKHED et al., 2015; BOKULICH et al., 2016). Outros fatores que podem alterar a composição e desenvolvimento da microbiota são: idade gestacional do recém-nascido, uso de antibióticos, mesmo a curto prazo, e diarreia (DOGRA et al., 2015; TAMBURINI et al., 2016; GRIER, 2017; KIESER et al., 2018). As bactérias GI desempenham papel central na formação do sistema imunológico e do metabolismo do hospedeiro. Os trabalhos especulam que, em recém-nascidos e crianças, a formação da microbiota residente tem um impacto que pode durar até o fim da vida (GENSOLLEN et al., 2016; VATANE et al., 2016; TAMBURINI et al., 2016; CHIU et al., 2017; TURRONI et al., 2020; TURRONI et al., 2022).

Um dos principais componentes do LH são os oligossacarídeos (*human milk oligosaccharides* - HMO). Os HMO são capazes de dar suporte à função imune por meio da modulação da ecologia da microbiota intestinal, gerando resistência à colonização (mecanismo pelo qual a microbiota protege-se contra a invasão de microrganismos) (LAWLEY; WALKER, 2013); e o estabelecimento de uma microbiota resiente. Sua concentração no leite corresponde a aproximadamente 20% do total do conteúdo de carboidratos (THURL et al., 2017).

O conteúdo de HMO varia ao longo do processo de lactação entre 20 a 24 g/dL no colostro e de 10 a 15 g/dL no leite maduro (CHATURVEDI et al., 2001; BODE, 2012; ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015; THURL et al., 2017; XU et al., 2017). Para Nijman et al. (2018) pode variar de 9,15 g/dL, no dia 3 da lactação, a 6,38 g/dL, no dia 42 de lactação. Uma criança a termo que consome 800 mL de leite deve ingerir aproximadamente 10 g/dL de HMO. Variações interpessoais também podem

ocorrer ao longo da lactação, bem como modificações relacionadas à fucosilação[1] (dependente do *background* genético materno), que afetam a composição de HMO (LI et al., 2018; CHOURAQUI, 2020).

Os oligossacarídeos do leite humano podem: atuar como prebióticos, estimulando a colonização de microrganismos. Exercem mecanismos de defesa diretos contra patógenos. Agir como moléculas sinalizadoras, interagindo diretamente com as células do hospedeiro. Atuar como agentes anti-inflamatórios e moduladores imunes. E atuar como nutrientes para o desenvolvimento neurológico infantil (BODE; JANTSCHER-KRENN, 2012) e estão ilustradas na (**Figura 1**):

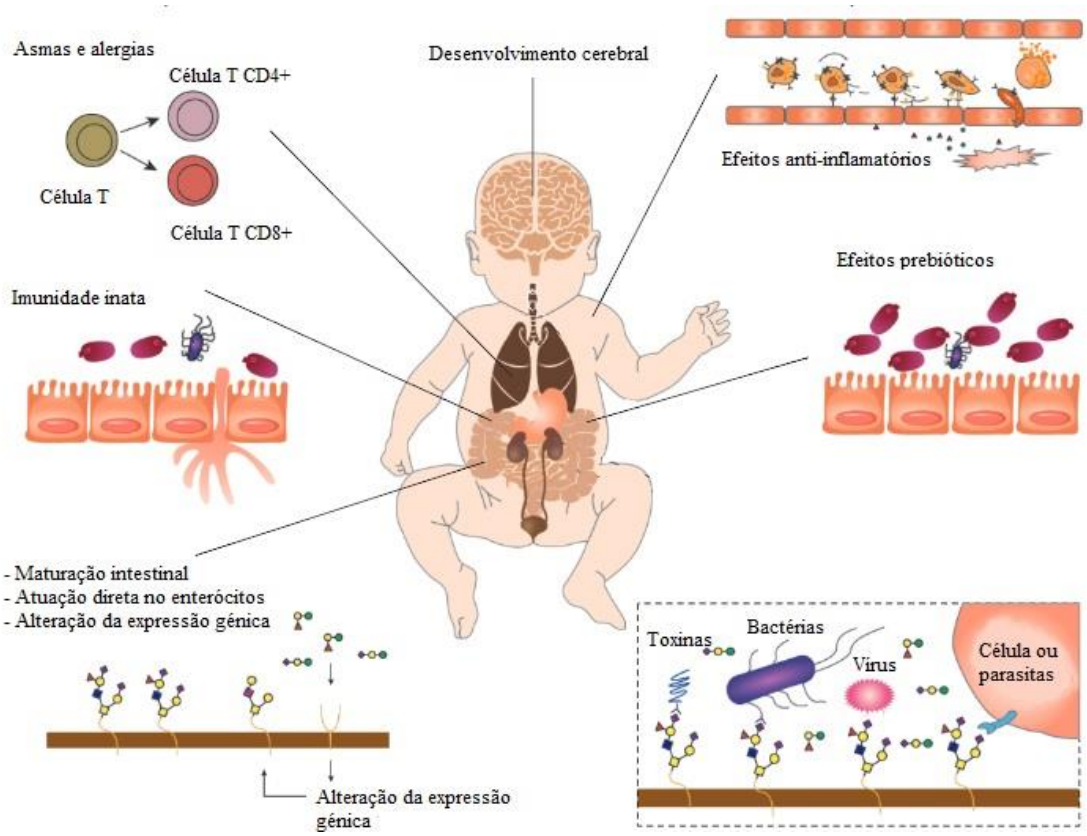


Figura 1: Principais funções desempenhadas por oligossacarídeos do leite humano no organismo humano. Adaptado: RAY et al., 2019

[1]Refere-se ao processo de adição de fucose em uma molécula. É conhecido por facilitar o processo de adesão celular e a regulação imunológica.

Os oligossacarídeos do leite humano são considerados agentes prebióticos, pois estimulam seletivamente o crescimento de microrganismos desejavéis. Eles têm estrutura semelhante aos glicanos da mucosa intestinal, agindo como receptores isca, protegendo da invasão de patógenos entéricos, e interagem diretamente com as células epiteliais GI produzindo mudanças que levam a modulação das interações hospedeiro-bactérias (**Figura 2**) (BODE; JANTSCHER-KRENN, 2012).

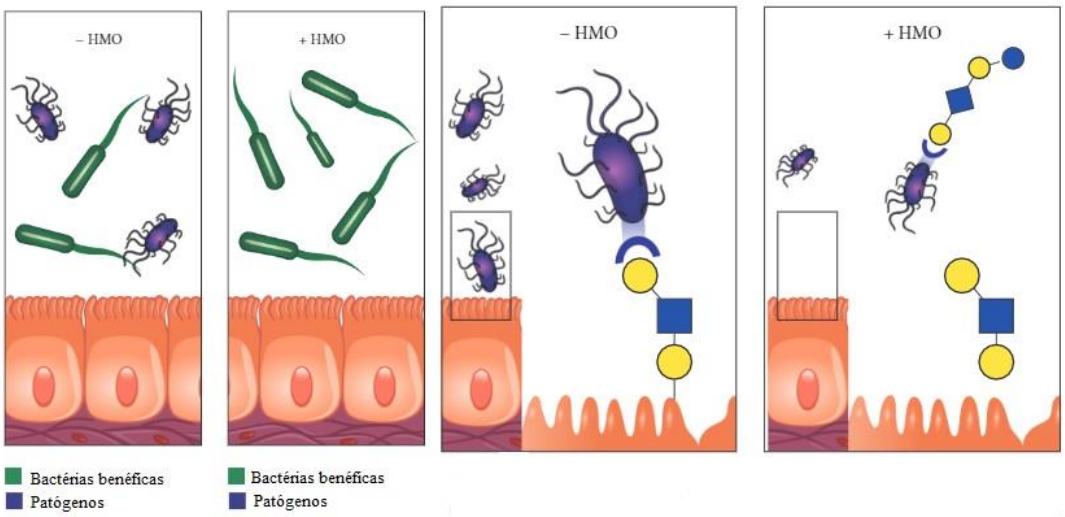


Figura 2: Representação do mecanismo pelo qual os oligossacarídeos do leite humano inibem infecção de bactérias patogênicas. Adaptado: RAY et al., 2019.

2.2.1. Colonização da microbiota e sua composição

A microbiota gastrointestinal é formada por fungos, vírus e bactérias. Em relação às bactérias, taxonomicamente são classificadas em: filo, classe, ordem, família, gênero e espécie (LATERZA et al., 2016). Os filos predominantes são seis: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia (**Figura 3**). Em adultos, 90% da composição bacteriana corresponde aos filos Bacteroidetes (principais gêneros: *Bacteroides* e *Prevotella*) e Firmicutes (principais gêneros: *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Ruminicoccus*). Em adultos, o filo Actinobacteria tem menor abundância e é representado principalmente pelo gênero *Bifidobacterium*, ao contrário do observado em crianças que são colonizadas majoritariamente por esse gênero (ARUMUGAM et al., 2011).

O processo de colonização do TGI dependerá de uma série de fatores como: idade gestacional, tipo de parto, tipo de leite utilizado (LH ou FI), idade, uso de antibióticos, introdução alimentar e tipo de dieta. Após 2 a 5 anos de vida, a composição da microbiota torna-se estável. Sua diversidade e abundância serão formadas no início da vida e caracterizarão a microbiota residente (RINNIELLA et al., 2019; DERRIEN; ALVAREZ; DE VOS, 2019; TURRONI et al., 2020; ROSWALL et al., 2021).

No que diz respeito ao tipo de leite utilizado, crianças amamentadas possuem uma microbiota mais complexa, diversa e duas vezes maior em espécies de *Bifidobacterium*. Também apresentam maior presença de *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus*. Ao passo que, crianças que utilizam FI apresentam uma microbiota, predominantemente, colonizada por *Escherichia coli*, *Bacteroides* e *Clostridium difficile* (RINNIELLA et al., 2019). A importância de uma microbiota rica em *Bifidobacterium*, especialmente em crianças, se dá, pois elas são responsáveis por diminuir a permeabilidade intestinal, por fortalecer as junções celulares e por estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias (CHICHLOWSKI et al., 2012; UNDERWOOD et al., 2015).

Figura 3: Exemplo da taxonomia da microbiota gastrointestinal. Nos balões são citadas algumas bactérias pertencentes aos determinados táxons. Adaptado: RINNIELLA et al., 2019.

2.3. Definição, função e classificação de prebióticos

Gibson e Roberfroid introduziram o conceito de prebióticos, definido como "ingredientes alimentares não digeríveis, que apresentam benefícios para o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou um número limitado de bactérias no cólon intestinal, e melhorando a saúde do hospedeiro" (GIBSON; ROBERFROID, 1985). Segundo esta definição, apenas alguns componentes do grupo de carboidratos podem ser classificados como prebióticos e são eles: frutooligossacarídeos (FOS), inulina, GOS e lactulose. O sexto encontro da Associação Internacional Científica de Probióticos e Prebióticos (*International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics* - ISAPP), em 2017, definiu prebióticos dietéticos como "substratos que são utilizados seletivamente por microorganismos do hospedeiro conferindo benefícios à sua saúde " (GIBSON et al., 2017). Prebióticos são encontrados, naturalmente, em alimentos como: aspargos, açúcar de beterraba, alho, cebola, mel, chicória, farinha de trigo, banana, tomate, soja, ervilha, feijões, LH, entre outros (VARZAKAS, 2018). Entretanto, apresentam baixa concentração nos alimentos e, sendo assim, são produzidos em larga escala pela indústria, que utiliza como base a lactose, a sacarose ou o amido (PANESAR, 2013; DAVANI-DAVARI et al., 2019).

O mecanismo de ação dos prebióticos é, em grande parte, devido aos seus efeitos indiretos. Eles atuam como fonte de combustível para fermentação seletiva por microrganismos residentes que promovem a saúde do TGI, que são necessários para proteger contra patógenos. Além disso, melhoram a função/integridade da barreira intestinal, atuam sobre vias de sinalização do sistema imunológico e influenciam a função cerebral (PARNELL; REIMER, 2012; MIQDADY et al., 2020). Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são os principais produtos finais da fermentação. Medeiam os efeitos diretos dos prebióticos, fornecendo energia para o epitélio intestinal. Também atuam na expressão genética local, aumentam a barreira intestinal (regulando a montagem de proteínas da zona de oclusão), melhoram a motilidade intestinal, a homeostase de açúcar e lipídios e função imunológica. Os principais AGCC formados, a partir do processo de fermentação, são o acetato, o propionato e o butirato e, juntamente com o ácido lático, atuam reduzindo o pH intestinal para concentrações que inibem o crescimento de patógenos (ROBERFROID et al., 2010; JAKOBSDOTTIR; NYMAN; FÅK, 2014) (**Figura 4**). Barcelo et al. (2004) observaram que AGCC podem atuar no aumento de produção de mucina, contribuindo para uma menor incidência de

translocação bacteriana através da barreira intestinal. Ademais, prebióticos podem exercer efeito antimicrobiano direto, aderindo aos locais onde há ligação bacteriana na superfície de enterócitos e, assim, bloquear a adesão de bactérias patogênicas às células intestinais (GIBSON; MCCARTNEY; RASTALL, 2005; SHOAF et al., 2006). Para ser classificado como prebiótico um composto deve: 1) ser resistente ao pH estomacal, não podendo ser hidrolisado por enzimas mamíferas nem absorvido pelo TGI; 2) poder ser fermentado pela microbiota intestinal; e 3) poder estimular o crescimento e/ou atividade das bactérias intestinais e este processo melhorar a saúde do hospedeiro (GIBSON et al., 2017).

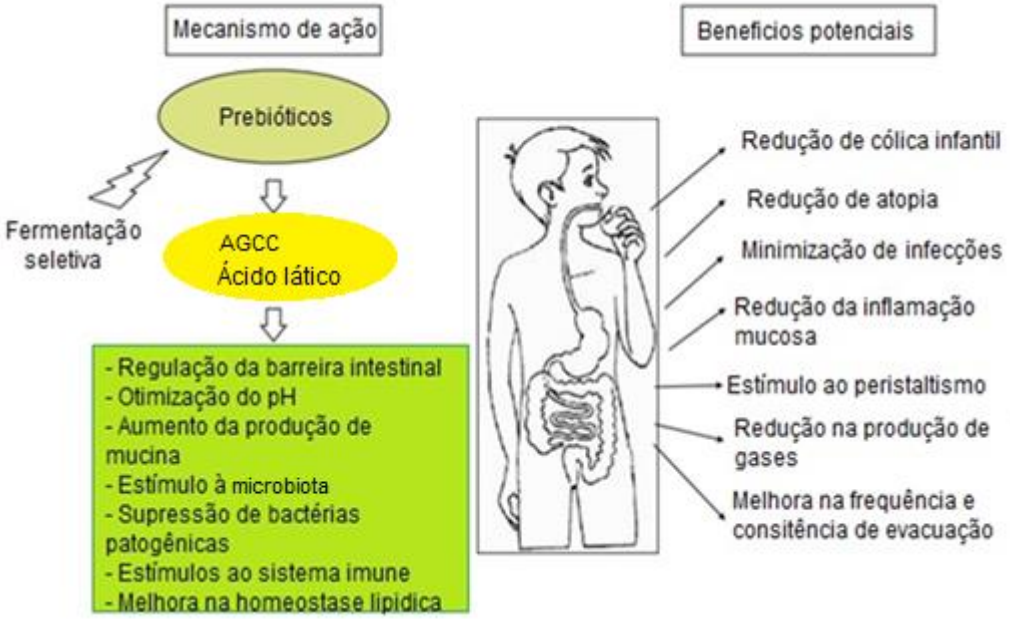


Figura 4: Representação do mecanismo de ação e benefícios potenciais à saúde desempenhados pelos prebióticos. AGCC: ácido graxo de cadeia curta. Adaptado: MIQDADY et al., 2020.

2.3.1. Tipos de prebióticos

Apesar de existirem muitos tipos de prebióticos, a sua maioria é um subconjunto de grupos de carboidratos, principalmente carboidratos oligossacarídeos. Os principais artigos e os mais relevantes são sobre oligossacarídeos carboidratos, entretanto, novos trabalhos indicam a existência de prebióticos não carboidratos (DAVANI-DAVARI et al., 2019; CARDOSO et al., 2021). Os principais tipos são: frutanos, galactooligossacarídeos, oligossacarídeos derivados de amido e glicose e oligossacarídeos (OS) não carboidratos.

2.3.2. Frutanos, galactooligossacarídeos, oligossacarídeos derivados de amido e glicose, outros oligossacarídeos e oligossacarídeos não carboidratos

Frutanos são polímeros de frutose, sintetizados em plantas, a partir da sacarose. Os prebióticos que se adéquam a esta classificação são: inulina e FOS ou oligofrutose (LOUIS; FLINT; MICHEL, 2016). Estudos anteriores indicavam que os frutanos podiam estimular bactérias ácido-lácticas, seletivamente. No entanto, nos últimos anos, algumas investigações, como a de Scott et al. (2014) mostraram que o comprimento da cadeia dos frutanos é um critério importante para determinar quais bactérias podem fermentá-los.

Os galactooligossacarídeos (GOS) são o produto da extensão da lactose e são classificados em dois subgrupos: os com excesso de galactose e os fabricados a partir da lactose por meio de transglicosilação enzimática. O produto final dessa reação é, principalmente, uma mistura de tri a pentassacarídeos com galactose (MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008). Louis, Flint e Michel (2016) descreveram que os GOS têm a capacidade de estimular bifidobactérias e lactobacilos. Em crianças, por exemplo, bifidobactérias mostraram alta incorporação com GOS; *Enterobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* também são estimulados, mas em menor grau.

O amido resistente é um tipo de amido que resiste à digestão no TGI superior, também classificado como prebiótico (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011). Walker et al. (2011) descrevem que diferentes grupos de *Firmicutes* apresentam grande incorporação de amido resistente, *in vitro*, podem ser degradados por bactérias como: *Ruminococcus bromii* e *Bifidobacterium adolescentis*, e em uma taxa menor por *Eubacterium rectale* e *Bacteroides thetaiotaomicron*. A polidextrose (PDX), um OS derivado da glicose, consiste de um glucano ramificado com ligações glicosídicas, podendo estimular o crescimento de bifidobactérias (COSTABILE et al., 2012).

A pectina é outro tipo de OS, derivado de polissacarídeos, sendo chamado de oligossacarídeo péctico (POS - *pectic oligosaccharide*). A pectina é formada por uma cadeia linear de unidades α-D-ácido galacturônico, monossacarídeos, principalmente L-ramnose. Algumas pectinas contêm cadeias de vários tipos de açúcares ligados às cadeias laterais (por exemplo, arabinose, galactose e xilose) ou ácido ferúlico, mas sua estrutura irá variar dependendo da fonte de POS (YOO; KIM; PAEK, 2012; GULLÓN et al., 2013; USP, 2015). Existem, também, compostos não classificados como carboidratos que apresentam características de prebióticos como, por exemplo, polifenóis, ácidos graxos

poli-insaturados (GIBSON et al., 2017; CARDOSO et al, 2021), bem como proteínas (), hidrolisados e peptídeos (ZHANG et al., 2020). Tzounis et al. (2011) observaram, em experimentos *in vivo* e *in vitro*, que os flavonoides podem estimular bactérias lácticas. A capacidade das bactérias utilizarem algum substrato especifico depende de transportadores e enzimas codificadas dentro das células. Enquanto algumas bactérias conseguem utilizar uma gama de substratos, outras são mais seletivas (HAMAKER; TUNCIL, 2014). Outros prebióticos não carboidratos são (**Figura 5**).

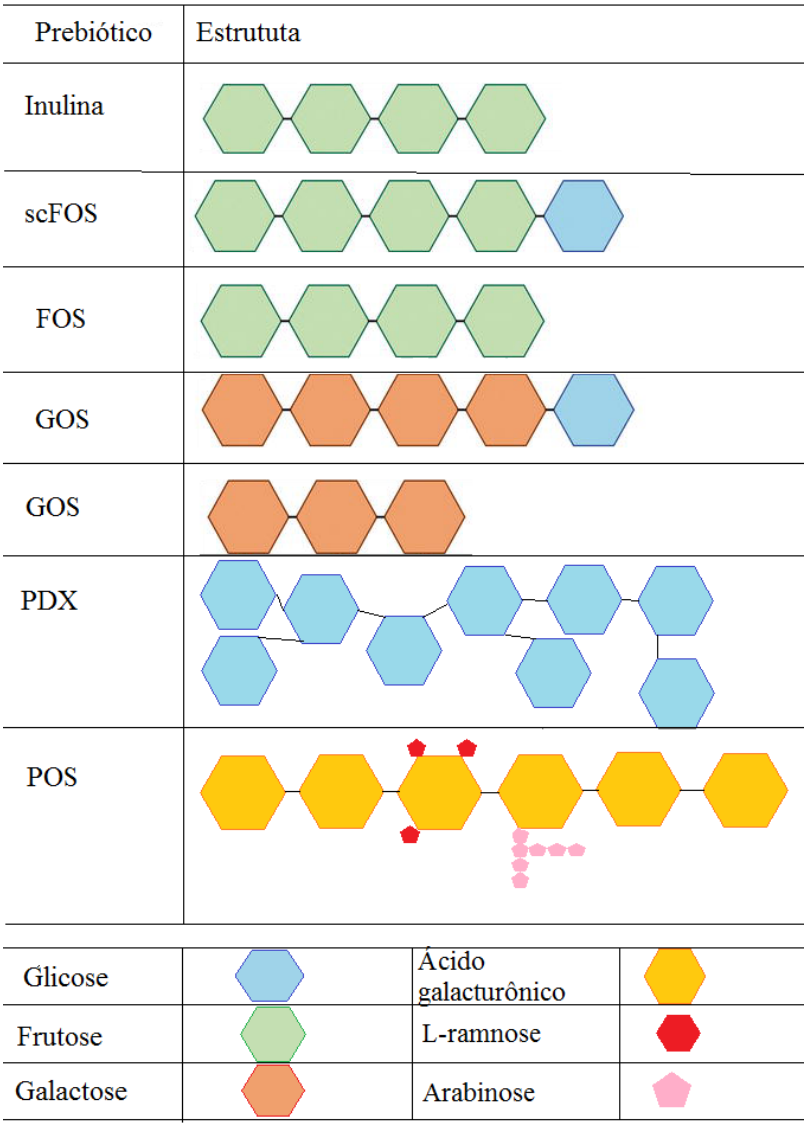


Figura 5: Estrutura simplificada dos principais prebióticos encontrados em fórmulas infantis. FOS: frutooligossacarídeos; GOS: galactooligossacarídeos; PDX: polidextrose; POS: oligossacarídeo péctico; scFOS: *short chain fructooligossacharides*; Adaptado: SAVILLE; SAVILLE, 2019.

2.4. História das fórmulas infantis

Desde 2000 antes de Cristo (a.C.) os humanos utilizam fontes alternativas de nutrição para seus lactentes, mesmo tendo a capacidade de nutri-los, para garantir a sobrevivência dos recém-nascidos em caso de morte materna durante o parto, de abandono infantil ou de incapacidade de amamentar. Uma prática muito comum foi a utilização de amas de leite, inicialmente por necessidade e posteriormente utilizada por mulheres com maior *status* social (WICKES[a], 1953; OSBORN, 1979; STEVENS; PATRICK; PICKLER, 2009). A utilização de leite de outros mamíferos, particularmente vacas, também era praticada (WICKES[c], 1953; RADBILL, 1981). Evidências arqueológicas datadas de 2000 a.C. apontam para a existência de dispositivos para alimentação de lactentes como vasos de madeira, cerâmica e chifre animal (WICKES[c], 1953). Do século 16 ao 18 a utilização de *pap boats*[2] se tornou muito difundida: utilizava-se misturas de pão embebido de água ou leite (também chamada de *pap*) ou cereais cozidos em caldo, conhecido como *panada*.

No século 18 (1770), o médico Hugh Smith criou o *bubby-pot*[3] de estanho ou prata, e um precursor das mamadeiras modernas surgiu na França em 1851 (WICKES[a], 1953; RADBILL, 1981). O uso de leites alternativos em crianças pode levar a riscos à saúde, por exemplo, deficiência de folato, convulsões por hipocalemia, azotemia[4] e infecções por patógenos (WICKES[b], 1953). A taxa de mortalidade infantil era um fator preocupante e, em 1748, William Cadogan observou que apenas uma em cada três crianças que utilizavam os métodos alternativos de alimentação, que não amas de leite, sobrevivia até o segundo ano de vida. Em parte, por decorrência da baixa higiene geral e da falta de limpeza adequada dos recipientes de alimentação (KLEINMAN; BARNESS; FINBERG, 2003).

---

[2] Um pequeno recipiente para alimentar para lactentes ou pessoas impossibilitadas de se alimentar. Tem a forma típica de barco, com a extremidade de alimentação moldada como um lábio curto ou afunilado estendido para ser colocado na boca da pessoa que está sendo alimentada. A extremidade de retenção é um pouco encurvada e geralmente sem alça.

[3] O nome *bubby* é derivado de uma palavra antiga que se referia ao seio feminino. Possui uma tampa (com um pequeno orifício de ar que regula o fluxo de seu conteúdo).

[4] Refere-se ao aumento das concentrações séricas de ureia, creatinina e outros compostos nitrogenados não-proteicos no sangue, no plasma ou no soro.

Foi a partir da Revolução Industrial (aproximadamente de 1760 a 1870) que avanços científicos e tecnológicos mudaram as sociedades. Os cientistas começaram a entender as causas de doenças e os motivos para alta mortalidade infantil. Microrganismos patogênicos (bactérias, vírus, fungos e protozoários) identificados no leite cru e no ambiente foi responsável por causar doenças comuns à época, como: disenteria, escarlatina, gripe, varíola e pneumonia. Métodos de preservação foram sendo desenvolvidos ao longo do tempo, há evidências escritas que os povos tártaros conseguiram condensar o leite para preservá-lo, provavelmente o leite fermentado, e não leite fresco (POLO, 1920; WARGO, 2016). O francês Nicolas Appert o "pai da conserva" criou um método de preservação de alimentos através de banho em água quente em potes de vidro (APPERT, 1811). Em 1835, William Newton criou o método para condensar o leite por evaporação, processo que proporcionou maior vida de prateleira em relação ao leite bovino cru. Gail Borden (1853) inventou o processo de produção de leite condensado adoçado, pelo qual açúcar era adicionado para inibir ainda mais o crescimento microbiano (APPERT, 1811; STEVENS, 2009). Louis Pasteur (1864) desenvolveu a pasteurização, um processo de tratamento de calor capaz de eliminar bactérias não esporuladas e reduzir o número de patógenos viáveis em alimentos. O processo foi adotado na Europa e EUA para conservar o leite bovino para o consumo humano. Outros tipos de processamento do leite também foram desenvolvidos, como a evaporação, que eliminava o uso de açúcar e a homogeneização[5] (FAMON, 2001).

O químico alemão Justus von Liebig, em 1865, criou a primeira fórmula infantil comercial líquida, a partir de leite bovino, farinha de trigo e/ou malte, e bicarbonato de potássio, seguida por sua versão em pó que facilitava sua preservação (LEVENSTEIN, 1988). Na Suíça por volta do mesmo período, Heinrich (Henri) Nestlé desenvolveu a primeira FI artificial - a *Farine Lactée*® (Farinha Láctea) - uma mistura de malte, leite bovino, açúcar e farinha de trigo, preparada a partir de sua diluição em água (SCHUMAN, 2003). Até o ano de 1883, ao menos 27 marcas de FI já haviam sido patenteadas e comercializadas (BRACKEN, 1953). No início do século 20 mais avanços foram obtidos através da identificação e compreensão de componentes importantes do LH, como a presença de vitaminas para prevenir doenças, como beriberi, escorbuto, pelagra e raquitismo (FUNK, 1912; FOMON, 2001).

[5] Processo pelo qual os componentes não solúveis, como caseína e gordura, adquirem tamanho menor e distribuição mais uniformes no leite líquido após o tratamento térmico.

Em 1912, a *Mead Johnson & Company* iniciou a comercialização de FI com dextrina e maltose. Nos EUA, em 1919, Gerstenberger, Frohring e Ruh co-criaram uma fórmula em pó chamada de SMA (*synthetic milk adapted* – leite sintético adaptado), produzida a partir de leite de vaca desnatado, lactose e óleo vegetal ou marinho (SCHUMAN, 2003). Não muito tempo depois, a Nestlé introduziu no mercado a Lactogen®. Em 1924, Alfred Bosworth concordou em comercializar sua fórmula SMA para a *Moores & Ross Milk Company* (futura *Abbott Nutrition*), posteriormente nomeada de Similac®, à base de leite de vaca, óleos vegetais e minerais como cálcio e fósforo (FOMON, 2001; SCHUMAN, 2003; IMNA, 2004). Em 1974, uma reportagem intitulada "*The Baby Killer*" acusou a Nestlé S.A. de promover extensivamente o *marketing* do uso de fórmulas ao invés da amamentação, especialmente em países em desenvolvimento. Nestes países, o uso de água não fervida contaminada por patógenos e diluição incorreta da fórmula, levou ao desenvolvimento de doenças e morte de crianças (MULLER, 1974).

Ao longo dos anos, as FI foram se aprimorando, e a Pet, Inc foi a primeira empresa a produzir leite suplementado com vitamina D. A *Mead Johnson & Company* (1929) desenvolveu uma fórmula a base de soja, para crianças com alergia ao leite de vaca (FOMON, 2001). Em 1942, surgiram as primeiras fórmulas hidrolisadas e, em 1959, as fórmulas foram suplementadas com ferro para melhorar a contagem de hemácias em crianças com baixo peso ao nascer. No ano de 1960, estudos mostraram que o conteúdo proteico deveria ser reduzido para não sobrecarregar o sistema renal imaturo das crianças. Apenas em 1962, as fórmulas a base de leite de vaca passaram a ter uma razão de soro/caseína similar à encontrada no LH. A adição de nucleotídeos ocorreu nos anos 90, baseada na sua alegação de atuar como fator de crescimento e melhorar o sistema imune dos lactentes. Nos anos 2000, a atenção foi voltada para os lipídios. Ácidos graxos, como ácido araquidônico e ácido docosaexaenoico, começaram a ser incorporados nas fórmulas, com o objetivo de melhorar o desenvolvimento cognitivo (FOMON, 2001; SCHUMAN, 2003; IMNA, 2004). Atualmente, ainda há o empenho em produzir uma FI o mais nutricionalmente equivalente ao LH, focando na necessidade nutricional específica para lactentes prematuros e a termo. Neste sentido, sabendo que a MGI exerce um papel modulador na promoção da saúde, a adição de OS às FI pretende simular o papel desempenhado pelos HMO (FOMON, 2001; IMNA, 2004).

2.5. Diretrizes para produção e composição de fórmulas infantis

Quando a amamentação é impossibilitada, a recomendação tanto da OMS quanto do Ministério da Saúde do Brasil é a utilização de FI infantis de partida (0 a 6 meses) e de seguimento para lactentes (6 a 12 meses) (WHO, 2009; BRASIL, 2015). A manufatura de FI é um processo regulado e monitorado rigorosamente para atender critérios de qualidade internacional (WHO, 2006). A composição do produto também é regulada e deve seguir as diretrizes estabelecidas por cada agência governamental. Os principais componentes (proteínas, lipídios e carboidratos) adicionados nas fórmulas possuem uma variação mínima e máxima, afim de atender as necessidades nutricionais dos lactentes nas diferentes fases de desenvolvimento. A variação de cada nutriente deve ser mantida durante o tempo de prateleira do produto (COOK, 1989; KOLETZKO et al., 2005). O uso de frutose deve ser evitado, devido à intolerância à frutose; gorduras e óleos hidrogenados são proibidos; para fórmulas com aminoácidos, apenas as formas L são permitidas, em virtude de as formas D poderem causar acidose lática (COOK, 1989; PAPAGAROUFALIS, 2014).

Apesar da fabricação de um produto igual ao LH não ser possível, a indústria investe em encontrar um que seja similar ao seu perfil nutricional, com o objetivo de permitir o desenvolvimento e o crescimento normal das crianças que utilizam as FI. Nas fórmulas por exemplo, não há a presença de componentes bioativos e protetores contra infecções, podendo ser atribuído a maior risco de infecção neonatais (WHO, 2009). A base utilizada para produzir a FI é o leite de vaca, e o interesse pelo lucro e a um produto mais similar a LH faz com ingredientas sejam suplementados, como nucleotídeos, mistura de óleos/gorduras e outros ácidos graxos (como ácido araquidônico e ácido docosahexaenoico), além de prebióticos (MARTIN; LING; BLACKBURN, 2016). Segundo o Codex Alimentarius a fórmula infantil preparada para o consumo deve conter de 60 a 70 kcal de energia por 100 mL (FAO, 2020). O **Quadro 2** contém as informações pertinentes ao mínimo e máximo ou GUL6 (guidance upper levels) dos nutrientes encontrados em FI.

---

[6]*Guidance upper levels* são utilizados para nutrientes que possuem pouca informação científica para uma análise de risco. Desta maneira, os valores inferidos, derivam no requerimento nutricional infantil e no que aparenta ser seguro historicamente, podendo então ser ajustados à medida que haja divulgação de novas informações. O propósito do GUL é guiar a produção, não devendo ser valores a serem alcançados.

Quadro 2: Composição nutricional de fórmulas infantis (quantidade por 100 kcal), adapatado do *Codex Alimentarius*.

Componente	**Mínimo**	**Máximo**	**GUL**
Proteínas (g)	1,8	3	-
Carboidratos (g)	9	14	-
Lipídios (g)	4,4	6	-
Ácido linoleico (mg)	300	-	1400
Ácido a-linolênico (mg)	50	NE	-
Vitaminas			
Vitamina A (µg RE[10)])	60	180	-
Vitamina D_3 (µg)	1	2,5	
Vitamina E (mg α-TE)	0,5	-	5
Vitamina K (mg)	4	-	27
Tiamina (µg)	60	-	300
Riboflavina (µg)	80	-	500
Niacina (µg)	300	-	1500
Vitamina B_6 (µg)	35	-	175
Vitamina B_{12} (µg)	0,1	-	1,5
Ácido pantotênico (µg)	400	-	2000
Ácido fólico (µg)	10	-	50
Biotina (µg)	1,5	-	10
Vitamina C (mg)	10	-	70
Minerais e Elementos traços			
Ferro (mg)	0,45	-	-
Cálcio (mg)	50	-	140
Fósforo (mg)	25	-	10
Magnésio (mg)	5	-	15
Sódio (mg)	20	60	-
Cloreto (mg)	50	160	-
Potássio (mg)	60	180	-

Manganês (µg)	1	-	100
Iodo (µg)	10	-	80
Selênio (µg)	1	-	9
Cobre (µg)	35	-	120
Zinco (mg)	0,5	-	1,5

α-TE: equivalente de alfa- tocoferol; g: gramas; mg: miligramas; µg: microgramas; NE: Não especificado, RE[10]: equivalente de retinol. Adaptado: CAC, 2019.

2.6. Fórmulas prebióticas

Prebióticos são considerados substâncias estáveis, com baixo risco de efeitos adversos, de fácil administração e exercem um papel na função e composição da microbiota. Desta maneira, seu uso em FI visa se assemelhar nas funções desempenhas pelos OS presentes no leite humano (MIQDADY et al., 2020). Os prebióticos mais estudados e utilizados são misturas de GOS e FOS. No que diz respeito à FI observa-se, principalmente, a combinação entre GOS de cadeia curta (scGOS – *short chain GOS*) e FOS de cadeia longa (lcFOS – *long chain FOS*) na proporção 9:1 (SALMINEN et al., 2020). Essa mistura se assemelha em quantidade aos HMO (8 g/L) presentes no LH, mas não possuem a mesma estrutura molecular que os HMO (BOEHM et al., 2003).

Todavia, estudos clínicos observam benefícios ligados à formação da microbiota intestinal e do sistema imunológico, redução da incidência de infecções e fezes macias (MORO; BOEHM, 2012; MIQDADY et al., 2020). É possível adicionar, no processo de manufatura, OS sintéticos quimicamente iguais aos HMO, como por exemplo, *2'-Fucosyllactose* e *Lacto-N-neotetraose*, bem como os classicamente utilizados: GOS, FOS, PDX e frutanos tipo inulina (ROBERFROID et al., 2010; COULET et al., 2014; VANDENPLAS et al., 2018).

O leite materno possui alta concentração e diversidade de HMO, enquanto o leite de vaca quase não apresenta OS. A microbiota de crianças alimentadas com fórmulas sem prebióticos, geralmente não é colonizada por espécies de bifidobactérias, como é encontrado em lactentes amamentados ou que utilizam fórmulas suplementadas (OOZEER *et al*., 2013; MUSILOVA, 2014). Bezirtzoglou, Tsiotsias e Welling (2011) demonstraram que recém-nascidos amamentados possuem uma microbiota mais estável e uniforme, se comparados aos que utilizam fórmula. Desta maneira, a adição de

ingredientes que modulem a microbiota representa uma estratégia importante para a redução da incidência/gravidade de diarreia em crianças e para a promoção de uma microbiota com composição, diversidade e função similares aos lactentes amamentados.

2.7. Legislação brasileira

No Brasil, a legislação que norteia a produção de FI é por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Com a revogação da antiga Portaria SVS/MS n. 977/1998 (regulamento referente às FI para lactentes de partida e de seguimento), as resoluções RDC n. 43, 44 e 45 de 2011 regulamentam as fórmulas infantis:

I) Resolução RDC n. 43/2011- Regulamento Técnico para fórmulas infantis para lactentes.

II) Resolução RDC n. 44/2011- fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância.

III) Resolução RDC n. 45/2011- fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietéticas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas.

IV) Resolução RDC n. 42/2011 – compostos de nutrientes para alimentos destinados a lactantes e a crianças de primeira infância.

V) Resolução RDC n. 46/2011 – aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia para fórmulas infantis destinadas a lactentes e crianças de primeira infância. Este regulamento se aplica às fórmulas infantis para lactentes, às fórmulas de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância, às fórmulas infantis destinadas a necessidades dietoterápicas específicas, e aos alimentos similares especialmente formulados para lactentes e crianças de primeira infância comercializados no país.

No ano de 2014, houve a alteração de alguns pontos das resoluções de 2011 (Resoluções RDC n. 45, 46, 47, 48 e 49 de 2014), e em 2018 a RDC n. 241 dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Por fim, a Lei n. 11.265/2006 e pelo Decreto n. 9.579/2018 regulamentam a comercialização e as práticas correlatas de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância.

Sobre a utilização de prebióticos, especificamente, a RDC 44 de 2011 na Seção II destaca:

IV – frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeos (GOS), de acordo com os critérios abaixo:

a) a quantidade adicionada não pode ultrapassar o limite de 0,8 g/100 mL em uma combinação de 10% de frutooligossacarídeos e 90% de galactooligossacarídeos; e

b) outras combinações e níveis máximos de frutooligossacarídeos e galactooligossacarídeos podem ser utilizados, desde que comprovados cientificamente como seguros e adequados para o crescimento e desenvolvimento dos lactentes e das crianças de primeira infância, preferencialmente, por meio de revisão sistemática de ensaios clínicos publicada em revistas científicas indexadas.

3. Justificativa

O primeiro ano de vida de uma criança é fundamental para o desenvolvimento e maturação de uma microbiota gastrointestinal saudável. Sua formação adequada garantirá benefícios à saúde em longo prazo. A microbiota pode ser alterada por fatores ambientais como o tipo de parto, a idade gestacional, o uso de antibióticos e a alimentação da criança. Nos primeiros 6 meses de vida, o leite materno deve ser a única fonte nutricional, pois apresenta uma constituição de nutrientes e compostos bioativos, como por exemplo prebióticos, que se adequam às necessidades infantis. No caso de contraindicações à amamentação, decorrente de algumas doenças maternas e da criança, ou uso de determinados medicamentos pela mãe, ou por dificuldades no estabelecimento do aleitamento materno exclusivo, o uso de fórmulas infantis pode se fazer necessário. Nem todas as fórmulas disponíveis no mercado apresentam prebióticos e alguns estudos encontraram benefícios de seu consumo para a criança, como melhor frequência de evacuação e consistência das fezes, menos desconforto abdominal e melhor formação da microbiota. Por conseguinte, em virtude da variedade de fórmulas e seu papel no desenvolvimento da microbiota, é importante estudar se as fórmulas infantis suplementadas com prebióticos tem ação de forma significativa na formação da microbiota intestinal de crianças.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Revisar sistematicamente a literatura para avaliar se o consumo de fórmulas infantis suplementadas com prebióticos é capaz de modular a composição da microbiota gastrointestinal infantil até pelo menos um ano de vida.

4.2. Objetivos específicos

- Revisar a literatura e resumir as evidências sobre o efeito do consumo de fórmulas prebióticas na composição da microbiota intestinal;

- Descrever os resultados da microbiota intestinal, de acordo com o tipo de fórmula infantil utilizada.

5. Métodos

5.1. Registro do protocolo

A PROSPERO (*International Prospective Register of Systematic Reviews*) é uma base de dados internacional para registro de revisões sistemáticas na área de saúde. Seu objetivo principal é fornecer informações relevantes sobre as revisões registradas, a fim de evitar duplicações, além de permitir a comparação da revisão concluída com o que havia sido planejado no protocolo (CENTRE FOR REVIEWS AND DISSEMINATION, 2009). A presente revisão foi registrada com o seguinte título no PROSPERO (nº CRD42021243920): "*Effect of the consumption of infant formula supplemented with prebiotics on the gastrointestinal microbiota: a systematic review of randomized clinical trials*".

5.2. Desenho de estudo

O desenho de estudo é uma revisão sistemática de literatura, de publicações que avaliaram a associação do tipo de alimentação do lactente (uso de fórmula prebiótica) com a microbiota intestinal infantil. O estudo foi conduzido de acordo com os *guidelines* do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (MOHER et al., 2009). Para a definição da pergunta do estudo, utilizamos a estratégia PICOS (LIBERATI et al., 2009), na qual cada letra se refere à definição de um item:

P – *population* – população: crianças recém-nascidas a termo e saudáveis;

I – *intervention* – exposição: utilização de fórmulas infantis contendo prebióticos;

C – *comparison* – comparação: lactentes que utilizaram fórmula padrão sem adição de prebióticos;

O – *outcome* – resultado/desfecho: ter realizado a avaliação da composição da microbiota intestinal infantil;

S – *study type* – desenho do estudo: ser um Ensaio Clínico Randomizado

5.3. Critérios de inclusão e exclusão

Os seguintes critérios de inclusão e foram adotados: ter sido realizado com crianças a termo saudáveis, ser um estudo em que os prebióticos foram adicionados durante o processo de fabricação e o tipo ter sido especificado, ter realizado a avaliação

da composição da microbiota gastrointestinal. Os critérios de exclusão foram: estudos realizados com animais ou *in vitro*, com crianças prematuras, ou que o uso de prebiótico não foi administrado durante o processo de manufatura, e introdução alimentar precoce prática não recomentada pela OMS que propõe o aleitamento exclusivo até os 6 meses de vida da criança. Também foram excluídos ensaios clínicos randomizados que avaliaram fórmulas fermentadas, acidificadas, com simbióticos, parcial ou extensivamente hidrolisadas, geralmente utilizadas para crianças com alergia; e publicações na forma de resumo e sem dados.

5.4. Estratégia de busca

A busca foi realizada por 2 investigadores (T. M. e N. D.) no período de agosto de 2020 a dezembro de 2021, nas seguintes bases de dados eletrônicas: *Pubmed*, *Web of Science*, *Scopus*, *Embase*, FSTA, CINAHAL e *Open Grey*. As palavras-chave e suas combinações estão detalhadas no **Quadro 3**. Adicionalmente a busca nos sites: www.clinicaltrials.gov, www.clinicaltrialsregister.eu e www.anzctr.org.au para encontrar possíveis ensaios em andamento.

Quadro 3: Bases de dados utilizadas e estratégias de busca

Base de dados	**Período de tempo**	**Palavras-chave e suas combinações**
Cochrane Library e PROSPERO	Ago/2020 a Dez/2021	Busca por revisões sistemáticas com o mesmo tema
Pubmed	Ago/2020 a Dez /2021	(Prebiotics[mesh] OR Prebiotic*[tiab] OR Oligosaccharides[mesh] OR Oligosaccharides[tiab] OR galacto oligosaccharides [tiab] OR galacto-oligosaccharide [tiab] OR gos [tiab] OR fos [tiab] OR fructooligosaccharides [tiab] OR 2-fucosyllactose [tiab] OR 2-FL [tiab] OR lacto-N-neotetraose [tiab] OR inulin* [tiab] OR polydextrose[tiab] OR Infant[mesh] OR Infant*[tiab] OR Infant,newborn [mesh] OR Newborn*[tiab] OR Infant Formula[mesh] OR Baby Formula*[tiab] OR Infant Formulae [tiab] OR formula-fed [all fields] OR Milk,Human [mesh] OR Human milk [all fields] OR Breast Feeding [mesh] OR Breast Feeding[tiab] OR Dietary Supplements[mesh] OR Dietary Supplement*[all fields] OR *Bifidobacterium*[mesh] OR *Bifidobacterium* [all fields]) AND (Microbiota[mesh] OR Microbiota[tiab] OR Intestines[mesh] OR Intestine[tiab] OR Gastrointestinal Microbiome [mesh] OR Gut Microbiome*

		[tiab] OR Gut Microbiota* [tiab] OR Intestinal Microbiome* [tiab] OR Intestinal Microbiota* [tiab]) AND (Randomized Controlled Trial [pt] OR Randomized Controlled Trial [tiab] OR RCT [tiab] OR Controlled Clinical Trials [tiab] OR Clinical Trials [tiab] OR Double-Blind Method [mesh] OR Double-Blind study[tiab] OR Double-Blind [all fields] OR placebo [tiab] OR ramdomiz*[tiab])
EMBASE	Ago/2020 a Dez /2021	('artificial milk'/exp OR 'prebiotic agent'/exp OR 'oligosaccharide'/exp OR prebiotic* OR oligosaccharid* OR galactooligosaccharid* OR 'galacto-oligosaccharide' OR gos OR fos OR fructooligosaccharid* OR '2-fucosyllactose' OR '2 fl' OR 'lacto-n- neotetraose' OR inulin* OR polydextrose OR 'infant formula' OR 'baby formula' OR 'human milk') AND ('intestine flora'/exp OR 'gastrointestinal microbiome' OR 'gut microbiome' OR 'gut microbiota' OR 'intestinal microbiome' OR 'intestinal microbiota' OR 'gastrointestinal flora' OR 'intestine microbiota') AND ('clinical article' OR 'clinical trial' OR 'randomized controlled trial' OR 'randomized controlled trial topic' OR rct OR 'controlled clinical trials')
SCOPUS	Ago/2020 a Dez/2021	(TITLE-ABS-KEY (prebiotic* OR oligosaccharid* OR galactooligosaccharid* OR "galacto-oligosaccharide" OR gos OR fos OR fructooligosaccharid* OR "2-fucosyllactose" OR 2-fl OR "lacto-N- neotetraose" OR inulin* OR polydextrose OR "Infant Formula" OR "Baby Formula" OR "Human milk") AND (TITLE-ABS-KEY ("Gastrointestinal Microbiome" OR "Gut Microbiome" OR "Gut Microbiota" OR "Intestinal Microbiome" OR "Intestinal Microbiota")) AND (TITLE-ABS-KEY ("Randomized Controlled Trial" OR rct OR "Controlled Clinical Trials" OR "Clinical Trials"))
Web of Science	Ago/2020 a Dez/2021	(prebiotic* OR oligosaccharid* OR galactooligosaccharid* OR "galacto-oligosaccharide" OR gos OR fos OR fructooligosaccharid* OR "2-fucosyllactose" OR 2-fl OR "lacto-N- neotetraose" OR inulin* OR polydextrose OR "Infant Formula" OR "Baby Formula" OR "Human milk") AND ("Gastrointestinal Microbiome" OR "Gut Microbiome" OR "Gut Microbiota" OR "Intestinal Microbiome" OR "Intestinal Microbiota") AND ("Randomized Controlled Trial" OR rct OR "Controlled Clinical Trials" OR "Clinical Trials")
FSTA	Ago/2020 a Dez/2021	(prebiotic* OR oligosaccharid* OR galactooligosaccharid* OR "galacto-oligosaccharide" OR gos OR fos OR fructooligosaccharid* OR "2-fucosyllactose" OR 2-fl OR "lacto-N-neotetraose" OR inulin* OR polydextrose OR "Infant Formula" OR "Baby Formula" OR "Human milk") AND ("Gastrointestinal Microbiome" OR "Gut Microbiome" OR "Gut Microbiota" OR "Intestinal Microbiome" OR "Intestinal Microbiota") AND ("Randomized

		Controlled Trial" OR rct OR "Controlled Clinical Trials" OR "Clinical Trials")
CINAHAL	Ago/2020 a Dez/2021	(prebiotic* OR oligosaccharid* OR galactooligosaccharid* OR "galacto-oligosaccharide" OR gos OR fos OR fructooligosaccharid* OR "2-fucosyllactose" OR 2-fl OR "lacto-N- neotetraose" OR inulin* OR polydextrose OR "Infant Formula" OR "Baby Formula" OR "Human milk") AND ("Gastrointestinal Microbiome" OR "Gut Microbiome" OR "Gut Microbiota" OR "Intestinal Microbiome" OR "Intestinal Microbiota") AND ("Randomized Controlled Trial" OR rct OR "Controlled Clinical Trials" OR "Clinical Trials")
Open Grey	Ago/2020 a Dez/2021	(prebiotic* OR oligosaccharid* OR "Infant Formula") AND ("Gut Microbiota" OR "Intestinal Microbiota")

5.5. Gerenciamento em softwares de referências

Todas as referências foram exportadas para o gerenciador de referências Endnote online. Os estudos duplicados foram encontrados e excluídos. Resumos e textos completos foram adicionados ao gerenciador de revisões sistemáticas Covidence®, para seleção dos estudos de acordo com os critérios de inclusão pré-selecionados e para a extração de dados.

5.6.Risco de viés

Segundo o manual da Cochrane para elaboração de revisões sistemáticas, quando há a inclusão de ensaios clínicos randomizados, a ferramenta recomendada para analisar o risco de viés é o *Risk of Bias 2* (RoB 2) (HIGGINS et al., 2020). O dispositivo disponibiliza um *framework*[7] para avaliar o risco de viés em um único resultado de qualquer tipo de ensaio clínico randomizado (estimar o efeito de uma intervenção experimental com seu comparador para um determinado desfecho). O RoB 2 é organizado em domínios onde os viéses podem ser introduzidos no resultado. Esses foram identificados baseados em evidências empíricas e considerações teóricas, descritas no **Quadro 4**.

[7]*Framework* tem como principal objetivo resolver problemas recorrentes com uma abordagem genérica, permitindo ao desenvolvedor focar seus esforços na resolução do problema em si.

Ademais, o sistema de pontuação de qualidade de Oxford, ou escala de Jadad, também foi utilizado para avaliar a qualidade dos estudos. A escala oferece um *score* para cada estudo variando de 0 a 5 pontos, onde 5 é a pontuação máxima de qualidade. Os estudos receberam um ponto se houvesse a descrição de randomização; um se fossem descritos como duplo-cego; e um ponto se relatassem desistências e exclusões. Um ponto adicional era dado se o método de randomização fosse descrito e considerado apropriado, e outro ponto se o método de cegamento fosse descrito e considerado apropriado. Se o processo de randomização e cegamento foram considerados inapropriados, um ponto era retirado da soma para cada item. Cada critério foi julgado por uma das três respostas: "sim" indicando um baixo risco de viés; "não" indicando alto risco; e "não descrito" indicando falta de informação ou certeza a respeito de viés em potencial. Estudos que obtiveram pontuação menor que 3 foram considerados de alto risco de viés e excluídos da revisão. Enquanto os que alcançaram ≥ 3 apontavam para um baixo risco de viés, sendo inseridos na presente revisão (JADAD et al., 1996).

Quadro 4: Descrição dos tipos de viéses existentes e as questões abordadas em cada

Tipo de viés	**Questões abordadas**
Viés de randomização	● A sequência de alocação dos participantes foi aleatória; ● A sequência de alocação foi adequadamente ocultada.
Viés desvios das intervenções pretendidas/sigilo de alocação/ cegamento dos participantes e da equipe	● Os participantes sabiam de sua intervenção durante o ensaio; ● A equipe estava ciente do tipo de intervenção durante o ensaio.
Viés de dados incompletos de desfechos	● Refere-se a perdas de seguimento de participantes do estudo para determinados desfechos avaliados; ● Os dados para o desfecho estavam disponíveis para todos ou quase todos, os participantes randomizados.
Viés de relato seletivo dos desfechos	● Corresponde à possibilidade dos autores terem avaliados múltiplos desfechos, mas relatados apenas alguns de maior conveniência;
Viés de avaliação do desfecho	● O método de avaliar o desfecho foi inapropriado; ● A averiguação dos resultados diferiu entre os grupos de intervenção; ● Os avaliadores dos desfechos estavam cientes da

	intervenção recebida pelos participantes.
Outras fontes de vieses	• Outros potenciais vieses, não compreendidos nos domínios anteriores.

Adaptado: HIGGINS et al., 2020.

5.7. Extração de dados

Após a avaliação de qualidade, a leitura completa dos artigos foi realizada. Qualquer discordância foi resolvida em consenso por dois pesquisadores treinados. Um formulário próprio de extração foi desenvolvido segundo o modelo proposto pelo *Cochrane Handbook* (2011). O formulário considerou os principais fatores de confusão descritos na literatura (**Anexo 1**). Para esta revisão sistemática, os dados foram sistematizados seguindo os critérios: autor, país e ano de publicação; características da população estudada; início de duração da intervenção; tamanho amostral; número de vezes e tempo de coleta de fezes; uso de antibióticos materno/infantil, idade gestacional ao nascer, amamentação (exclusiva, predominante ou mista e tempo de duração); uso de fórmula infantil ou outros alimentos; método de análise da microbiota. De forma concomitante, utilizamos o *Robot Reviewer*, um sistema de *machine learning* que avalia automaticamente viéses em ensaios clínicos randomizados (utiliza os domínios definidos pelo RoB da *Cochrane*), além da extração automática de dados. É válido salientar que, apesar de ter um bom desempenho, o sistema não substituiu a avaliação humana, sendo utilizado como um assistente, onde suas sugestões foram validadas ou não por um humano, fazendo as devidas correções (T.M.) (MARSHALL; KUIPER; WALLACE, 2016; MARSHALL et al., 2018).

6. Resultados

Modelo de manuscrito a ser submetido na revista *Nutrition review*.

6.1. Manuscrito

Title: Infant supplemented prebiotic formula and the development of gut microbiota: a systematic review.

Authors: Ferreira, T.M.S.; Darwich, N.; De Velasco, P.C.; Soares-Mota, M.

Abstract
Type of feeding is one of the main determinants of the development of infant's microbiota. The prebiotic-supplemented infant formula (IF) demonstrates to be safe and with positive effects on growth improvement, stool softening, increased short-chain fatty acids (SCFA) concentrations, and reduced respiratory/gastrointestinal infections, diarrhea, allergic manifestations, and fecal pH. Herein we aim to investigate the relation between prebiotic formula (PF) intake by infants and microbiota composition. Nine databases were screened up from August 2020 to December 2021 for randomized controlled trials and fourteen studies were included. Administration of PF to healthy infants in almost all trials had increased levels of *Bifidobacterium* genus. Other bacteria population such as *Lactobacillus* genus was not stimulated by prebiotic formulas. Overall, studies that analyzed pathogenic strains observed decrease abundance of these bacteria. Most prominent finding are the bifidogenic effect performed by prebiotic supplemented formula.

PROSPERO registration no. CRD42021243920

Keywords: gut microbiota, formula-fed, breastfeeding, infant, microbial colonization, microbiome, *Bifidobacterium*; dietary fiber; oligosaccharide

Background

Early colonization of the gut plays a crucial role for general infant health, having a potential impact later in life, and for the development of chronic diseases. Colonizing bacteria are the first defense against pathogens since they degrade potential toxins, compete for nutrients, and sites of adherence. The microbiota controls proliferation and differentiation of gut cells, maturation of the immune system, and metabolization of non-digestible carbohydrates[1] At around 2 to 5 years of age, it stabilizes and becomes closer to the adults' microbiome[2]. External factors can influence its composition including type of delivery, feeding (breastfeeding or formula-fed), use of antibiotics, and infant diet. Differences are observe between breastfed (BF) and formula-fed children, with less *Bifidobacterium* spp. and a more diverse bacterial community with strains such as *Clostridium difficilli* and *Escherichia* spp. Unusual development of the gut microbiota may influence the maturity of the immune system, and dysbiosis can cause or is a

consequence of diseases later in life, such as obesity, allergy, and type 1 diabetes mellitus[3-5].

Prebiotics are described as "a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit"[6]. The most commonly studied prebiotics in infant formula are galactooligosaccharide (GOS), fructooligosaccharide (FOS), and inulin. Adding prebiotics to IF stimulates the growth of beneficial gut bacteria (as *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.) as found in breastfed children[7]. The Committee on Nutrition of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN) suggests that the intake of IF with prebiotics is safe regarding adverse effects and children growth parameters. Nevertheless, they stated that there were not sufficient data to recommend its use on a routine basis. Most trials were funded for formula companies, thus independent, and unfunded trials would be required[8]. The updated review from Skórka et al.[9] indicates that the intake of PF is safe concerning the growth and adverse events. A primary favorable clinical effect observed was stool softening. In contrast, Mugambi et al. [10] described an increased weight gain in supplement formula groups, and also detected improved stool frequency but no changes in stool consistency.

Methods

The type of feeding is a major factor for predict gut microbiota formation and composition, the aim of this study is to systematically review trials that evaluated the intake of PF and its effect as a modifier of the gut microbiota.

Protocol and registration

We used the 27 items PRISMA checklist to compose this review[11]. The study protocol was registered in PROSPERO database under the registration number CRD42021243920.

Studies considered for this review

The characteristics of the studies included were: randomized controlled trials (RCT); participants were healthy term infants (0 to 12 months of age); the consumption of prebiotics supplemented infant formula was compared with consumption of no prebiotics supplemented formula; prebiotic should have been added during the

manufacturing process; and gastrointestinal microbiota analysis was a primary or secondary outcome.

The exclusion criteria were: studies carried out with animals or *in vitro*; studies with premature children; prebiotics not administered during the manufacturing process, but thereafter, for example in capsules; children that received solid foods before 6 months of age; formulas that were fermented, acidified, symbiotic, and partially or extensively hydrolyzed formulas. In addition, abstract publications and studies without data were excluded.

Search methods, data collection, analysis, and extraction

We performed a search in nine databases from August 2020 to December 2021: PROSPERO, Cochrane Library, MEDLINE, EMBASE, Scopus, Web of Science, FSTA, CINAHL, and Open Grey. No limits by language or date were imposed in the search strategies. The search results were uploaded into Endnote online, and 3168 records were screened. And three registers for clinical trials were screened (www.clinicaltrials.gov, www.clinical tialsregister.eu; www.anzctr.org.au).

The search strategies were independently performed by two researchers (T.M and N.D.), titles and abstracts were screened according to inclusion and exclusion criteria. A full-text read of the eligible article was performed, and any disagreements were reached through consensus among the review team. Data extraction was accomplished using specific design data-extraction forms. Collected data was: participant characteristics, type and duration of interventions, outcomes, type of analyses performed, and funding.

Assessment of risk of bias

For assess the risk of bias we use the revised Cochrane Collaboration's tool. Studies with a high risk of bias in three or more items were excluded from the review[12]. In addition, we assessed the Jadad Scale. A system of punctuation that offers a score for each study ranging between 0 to 5 points[13].

Results

Description of search results and selected studies

After the nine-database screening and duplicate removal, 729 studies were identified. The title analysis resulted in the exclusion of 129 studies, while a further 59

were excluded after reading the abstracts because they failed to meet the inclusion criteria. The 73 remaining articles were read in full and only one of these was ruled out as it was a case report. Twenty-one studies were included in the bias risk analysis, after which only fourteen remained in this systematic review. **Supplementary table 1** describes reasons for exclusion.

The PRISMA flow diagram illustrates the procedure for eligible trials[14] (**Supplementary Figure 1**). A summary characteristic of the included trials is described in **Table 1,** concerning the effects of prebiotic infant formula in the microbiota composition. Studies were conducted in healthy term infants and were funded by formula-industry. The majority of studies used a mixture of GOS and FOS, in a proportion of 9:1[15, 17, 19, 23, 25]. The second most present prebiotic was FOS[21, 22, 27, 28]; followed by GOS[18, 20]; oligofructose plus inulin[17, 26]; and polydextrose (PDX) plus GOS[24]. Control groups were standard formula (SF). The doses used in each formula was different between studies, ranging from 0.2 to 0.8 g/100 mL. The length of intervention varied from 2 weeks to 6.5 months. One trial used exclusively bacterial culture technique. Five studies performed, exclusively, fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. Other six studies executed the polymerase chain reaction (PCR) technique, and its variations quantative PCR (qPCR), and real-time PCR (rtPCR), of which only one was targeting 16S-23S rRNA. Two trials mixed PCR technique with bacterial counts. One study associated FISH and Flow Cytometry Detection, and other one FISH and qPCR. Vaginal birth was the most common type of delivery found in trials, one trial had more cesarean section[17], and the type of birth was not describe by two trials[27, 28]. Three trials described the use of antibiotic[17, 26, 27], and two studies did not inform its use[15, 25].

Assessment Risk of Bias in included trials

Figure 1 summarizes the risk of bias in included trials. Nearly all studies had methodological limitations. Overall, studies presented good to medium quality after assessment. The most current problem was performance biases, with lack description of intended interventions specified in the trial protocol.

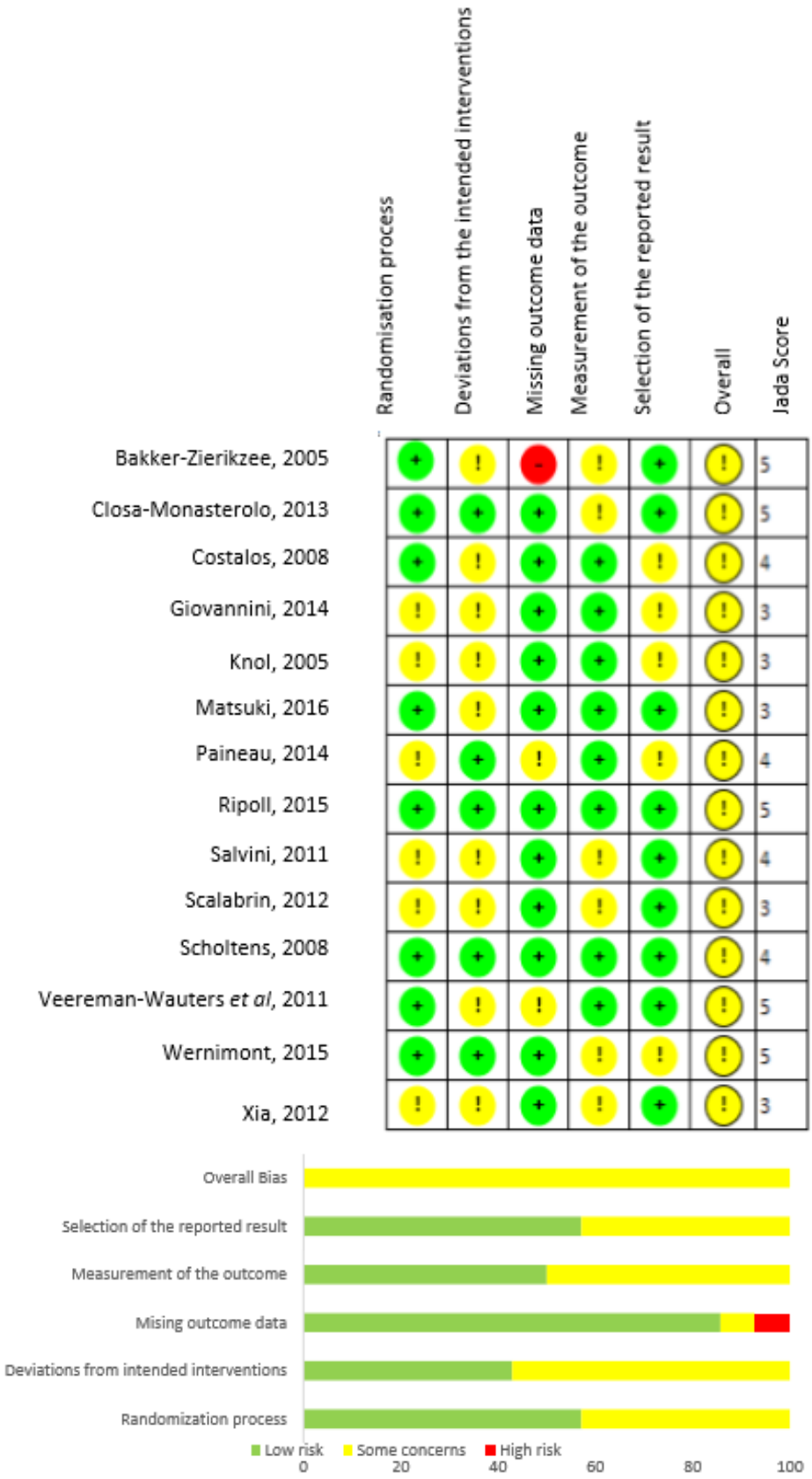


Figure 1: Analyzes of the risk of bias according to RoB2 tool.

Table 1: Summary of the findings of included trials

References	Participants	Start of intervention	Duration of intervention	Intervention	Comparison	Outcome/effect	Type of analyses	Funding
GOS								
Giovannini et al., 2014 (Italy)	Healthy term infants (15 days of life)	Within 15 days of life	6 mo	GOS – 0.4 g/100 mL (n 83)	SF (n 80) and BF (n 199)	• In children with colic PF lower *Clostridium* abundance ($p < 0.05$) • PF stimulate *Bifidobacterium genus* ($p < 0.05$), and *Lactobacillus* growth vs. control. • In the absence of colic, reduce Clostridium colonization in PF vs. control ($p < 0.05$).	PCR and spore co unts	Heinz Italia SpA (Latina, Italy)
Matsuki et al., 2016 (Japan)	Term infants (42±6 days of life)	NI	2 weeks (1/2 mo)	GOS – 0.3g/100 mL (n 17)	SF (n 18)	• Increase in Bifidobacteriaceae abundance (p=0.043) • NS changes *in Bifidobacterium* spp. • NS for Streptococcaceae (p =0.071).	Total bacterial counts and 16S rRNA	Yakult Central Institute
FOS								
Xia et al., 2012 (USA)	Healthy term infants (0 to 6 days of life)	NI	4 weeks (1 mo)	FOS - 0.2 g /100 mL (n 26) or FOS 0.3 g/100 mL (n 27)	SF (n 26) and BF (n 22)	NS difference for *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Bacteroides* abundance among the four feeding groups.	Rt- PCR	Abbott Nutrition
Paineau et al., 2014 (France)	Healthy term infants <7d	NI	4 mo	FOS – 0.4 g/ 100 mL (n 31)	SF (n 37)	Increase of bifidobacteria abundance between M0 and M3 (p=0.008)	rtPCR	NI
Ripoll et al., 2015 (Spain)	Healthy term infants (4 mo)	4-month-old	6 mo	FOS – 0.5 g/ 100 mL (n 37)	SF (n 38)	Increase of bifidobacteria after one month (p=0.03) but was no longer significant after 2 months (p=0.25).	PCR targeting 16S-23S rRNA	Syral Iberia Saragoss, Spain

Wernimont et al., 2015 (USA)	Healthy term infants (1 to 13 days of life)	NI	8 weeks (2 mo)	FOS – 0.3g/100mL (n 47)	SF (n 48) BF (n 50)	•Increase of bifidobacteria (p = 0.008) from baseline to week 8 • NS for Bacteroides, *Clostridia*, Lactobacillus/Enterococcus, Enterobacteriaceae and Staphylococcus.	FISH	Wyeth Nutrition
GOS/FOS								
Bakker-Zierikzee et al., 2005 (Netherlands)	Healthy infants	After birth	16 weeks (4 mo)	GOS/FOS – 0.6 g/100mL (n 19)	SF (n 19) and BF (n 63)	NS for *Bifidobacterium.*	FISH	NI
Knol et al, 2005 (Germany	Healthy infants (7 to 8 weeks)	7 to 8 weeks of life	6 weeks (1,5 mo)	GOS/FOS - 0.8 g/100 mL (n 24)	SF (n 23) and BF (n 21)	The mean proportion of bifidobacteria was significantly higher in the intervention group (59.6% vs. 49.5% in the SF group (p<0.05).	FISH	Numico Research
Costalos et al., 2008 (Greece)	Healthy term infants ≤14 days of life	NI	12 weeks (3 mo)	GOS/FOS - 0.4 g/ 100 mL (n 80)	SF (n 80)	• NS for percentage of bifidobacteria (p = 0.262). • At 6 weeks *Clostridia* was lower at intervention group vs. control (0% vs. 3.29%).	FISH	Numico Research
Scholtens et al., 2008 (Belgium)	Healthy term infants	From birth or before 8 weeks of age	26 weeks (8.5 mo)	scGOS/lcFOS - 0.6 g/100 mL (n 27)	SF (n 29) and BF (n 39)	• Higher percentages of bifidobacteria in the scGOS/lcFOS group (p = 0.04); • Lower percentages of *Clostridium* spp. in PF vs. control (p=0.006); • NS for *E. coli.*	FISH	Numico Research

Salvini et al., 2011 (Italy)	Healthy infants born from hepatitis C virus infected mothers	From birth	6 mo	scGOS/lcFOS – 0.8 g/100 mL (n 10)	SF (n 10)	•Increase abundance of faecal bifidobacteria and *Lactobacillus* (p<0.005). The difference persisted after discontinuation of supplementation, at 7 months. Obs: Children were tested throughout the study and tested negative for hepatitis C.	Fecal bacterial count	Danone Research
PDX/GOS								
Scalabrin et al., 2012 (USA)	Healthy infants (21 to 30 day of life)	NI	60 days (2 months)	PDX/GOS – 0.4 g/100 mL (n 100)	SF (n 101) and BF (n 88)	• At 30 days: Using qPCR, prebiotic group was higher vs. control for total bifidobacteria (p = 0.069) and *Bifidobacterium longum* (p = 0.057) and *B. infantis* (p = 0.002). At 60 days: prebiotic group were higher vs. control for total bifidobacteria (p <0.05). • NS for *C. difficile.*	FISH and qPCR	Mead Johnson Nutrition
Oligofructose and inulin								
Closa-Monasterolo et al., 2013 (Spain)	Healthy term infants (<4 weeks)	NI	4 mo	Oligofructose and long chain inulin (SYN1) – 0.8 g/100 mL (n 128)	SF (n 124) and BF (n 100)	• Percentages of *Bifidobacterium* (%) was higher in prebiotic group vs. control (p < 0.05); • The numbers of *Bacteroides* and *Enterobacteriaceae* were significantly lower in the prebiotic group vs. control (p<0.05).	qPCR	BENEO-Institute

Veereman-Wauters et al., 2011 (Belgium)	Healthy term infants (up to 5 days of life)	From birth (1-3 days)	28 days (1 mo)	SYN 1 - 0.4 g/dL (n 21), SYN1 - 0.8 g/100 mL (n 20), and GOS/FOS - 0.8 g/100 mL (n 19)	SF (n 21) and BF (n 29)	• At day 14: increased *Bifidobacterium* vs. control (GOS/FOS: 9.36; SYN1 0.8: 9.49); • At day 28 (GOS/FOS: 9.88; SYN1 0.8: 9.74); • NS for *Bacteroidetes*, *Clostridia*, and *Lactobacillus*.	FISH and DAPI	Beneo-Orafti

16s rRNA: ribosomal ribonucleic acid; BF: breastfeed; C-section: Caesarean section; DAPI: 40,6-diamidino-2-phenyl-indole; FISH: fluorescence in situ hybridisation; M0: 0 months of age; M2: 2 months of age; M3: 3 months of age; mo: months of age; NI: not informed; NS: not significant; OS: oligossacharide; PF: prebiotic formula; qPCR: quantative Polymerase Chain Reaction; rt-PCR: real time polymerase chain reaction; SF: standard formula; SYN1: Orafti® Synergy1; USA: United States of America.

Effects on gastrointestinal microbiota composition
***Bifidobacterium* genus**

For the 0.4 g/100 mL GOS formula (6 months) in infants with colic (treatment started at 15 days of life), *Bifidobacterium* was stimulated ($p < 0.05$)[18]; and in the formula with 0.3g/100 mL there was an increase in *Bifidobacterium* population. After a 2 week-supplementation, the amount increased significantly when compared to control ($p = 0.043$)[20].

When FOS was added at 0.4 g/mL (4 months) there was no change between M0 and M2, however amid M0 and M3, prebiotic group were higher than control (scFOS: 2.30 x 107 ± 7.73 x 107 colonic form unit/g feces; control: -2.51 x 105 ± 9.36 x 107 CFU/g feces p=0.008)[21]. Ripoll *et al.*[22] observed that adding 0.5 g/100 mL FOS for 6 months (intervention started at 4 months of age) produced a significant increase in bifidobacteria count in a one-month supplementation ($p = 0.03$), but this difference was no longer significant after two months ($p = 0.25$). Wernimont *et al*.[27] observed that prebiotic group (0.3g/100mL for 8 weeks) had a significantly greater increase from baseline to week 8 compared to control (mean ± SE: prebiotic group 0.70 ± 0.15 vs. CF group 0.16 ± 0.12, $p = 0.008$). In contrast, Xia *et al.* did not find any significant difference (4 weeks intervention with 0.2 and 0.3 g/100 mL FOS vs. control)[28].

For GOS/FOS supplementation in infant formula, different outcomes were observed. Bakker-Ziriekkze *et al.*[15] reported non-significant results for *the Bifidobacterium* population after 16 weeks with a concentration of 0.6 g/mL (intervention started after birth. For Salvini *et al.*[23] supplementation for 6 months after birth (0.8 g/100mL) increased bifidobacteria abundance during the first 3 months ($p < 0.0001$) and remained stable after ($p < 0.05$). For the 3-month intervention, abundance of bifidobacteria were higher in the prebiotic group than control ($p < 0.013$). This difference persisted even after discontinuation of the prebiotic suppleme15ntation at 7 months of age. When Knol *et al*.[19] investigated the use of a formula with 0.8 g/mL of GOS/FOS for 1.5 months, percentage of bifidobacteria was significantly higher ($p = 0.046$) in the prebiotic group vs. the SF group (59.6% and 49.5%, respectively). A 3 month-intervention with 0.4 g/100mL GOS/FOS had no significative changes vs. control ($p = 0.262$)[17]. After 8 weeks of a formula with 0.6 g/mL of scGOS/lcFOS (started from birth or before 8 weeks of age), abundance between groups did not differ, and after 26 weeks of intervention, the percentage of bifidobacteria in the scGOS/lcFOS group (59.8 IC 95% 37.1 - 88.0) was higher than in control 47.2 (12.1 - 64.0) $p< 0.05$[19].

A 2-month supplementation with PDX/GOS at 0.4 g/100 mL, by FISH, resulted in no significant changes on *Bifidobacterium* spp. abundance between groups (BF, prebiotic, or control) at 30 days. At 60 days PDX/GOS (median: 9.58, p = 0.049) abundance of *Bifidobacterium* spp. was higher than SF (median: 9.36, p = 0.007) but differences were not statistically significant (p = 0.084). At baseline, abundance was significantly higher in BF versus control (p=0.033) or PDX/GOS (p = 0.025) and no differences were observed between control and intervention groups. At 30 days, higher abundance was detected at PDX/GOS group, and at 60 days, a pattern of higher abundance at the prebiotic group was established vs. control, where PDX/GOS was like BF abundance (p = 0.002) and significantly higher than control (p = 0.001)[24].

The addition of oligofructose and inulin (for 4 months with 0.8 g/100 mL), intervention group trended toward higher *Bifidobacterium* cell abundance vs control (p=0.061). Percentages of *Bifidobacterium* were also higher than control ($p < 0.05$)[16]. And a one-month trial started from birth with two concentrations of SYN 1 (0.4 g/100 mL and 0.8 g/100 mL), and GOS/FOS (0.8 g/ 100 mL) demonstrate that at day 14 there was an increase in *Bifidobacterium* mean when compared to SF: 14 days: GOS/FOS: 9.36; SYN1 at 0.8: 9.49, and at 28 days: GOS/FOS: 9.88; SYN1 at 0.8: 9.74) ($p < 0.05$) [26].

Bacteroidetes phyla

Matsuki et al. did not observe significant alterations between groups when GOS was added at a concentration of 0.3 g/100 mL for 2 weeks[20].

Oligofructose and inulin supplementation (at 0.8 g/100 mL for 4 months) reduced *Bacteroidaceae* family (median (Interquartile range) 7.45 [5.00, 9.10] $p < 0.05$) compared to control (9.14 [5.70, 10.25]), similar to the breastfed group (7.68 [5.00, 10.32])[16]. However, a 28 day-trial from birth with 0.4 g/100 mL and 0.8 g/100 mL SYN1 showed no changes between groups[26].

When FOS was administrated for 8 weeks at 0.3 g/100 mL[27], and for 4 weeks at 0.2 or 0.3 g/100 mL no significant changes were found among intervention groups[28].

Firmicutes phyla (Clostridium spp. and Lactobacillus spp.)

For Firmicutes phyla studies investigate *Clostridium* spp. and *Lactobacillus* spp. From birth a GOS formula (with 0.4 g/100 mL for 6 months), in infants with colic was able to decrease *Clostridium* spp. ($p < 0.05$)[18]. After 5 weeks the use of 0.4 g/mL GOS/FOS formula significantly lower *Clostridia* percentage in the prebiotic compared to the SF (0% vs. 3.29%) [17]. A prebiotic intervention (0.8 g/100 mL) for 6 months showed a higher abundance of *Lactobacillus* (3 months: prebiotic 6.7 (6.1–7.3) vs. control 5.2 (4.6–5.9) $p < 0.013$; 6 months: 6.9 (6.3–7.5) vs. 5.5 (5.0–6.0) $p = 0.005$; 12 months: 6.7 (6.2–7.2) vs. 5.4 (5.1–5.8) $p < 0.005$. This difference persisted even after discontinuation of the prebiotic supplementation at 7 months of age[23]. An IF with 0.6 g/100 mL scGOS/lcFOS from birth to 8.5 months evaluated only *Clostridium* spp., and in the exclusively formula fed group the percentage was lower than in the control group (prebiotic: 1.1 [0.0 - 8.0] vs. control: 3.9 [0.0 - 10.4] $p < 0.05$)[25].

The 60-day feeding with PDX/GOS formula (0.4 g/100 mL) by FISH absolute *C. lituseburense*/*C histolyticum* abundance breastfed group (medians below detection limit) was lower than control and prebiotic groups respectively (medians: 7.52, baseline: 7.13, 30 days: 7.34, 60 days $p<0.001$ and medians: 7.59, baseline; 7.16, 30 days; 7.40, 60 days; $p<0.001$). Meanwhile, by qPCR abundance of *C. coccoides* was lower in the BF versus both formula groups ($p \leq 0.002$); formula groups were significantly different only at 60 days ($p = 0.005$). For *C. difficile* differences were not sensed amid groups (control vs. prebiotic) at 30 or 60 days. Overall, few abundance of *C. difficile* or *C. coccoides* group reached a level >10 $\log_{10}$ CFU/g stool. *Clostridium difficile* was below the detection limit by qPCR in >75% of infants from all groups at all time points, and *C. coccoides* were detected in 78% and C difficile in only 23% of fecal samples[26].

For the two-concentration FOS formula (0.2 and 0.3 g/100 mL for 4 weeks) *Lactobacillus* abundance did not differ significantly among the four feeding groups. *Clostridium difficile* was present in all of the infant stool samples and varied in abundance among feeding groups, with the LSM (±SEM) for the BF: 4.16 (±0.43), control formula:4.96 (±0.47), FOS 0.2: 6.00 (±0.47), and FOS 0.3: 5.68 (±0.40) logs. The BF group had less *C. difficile* than the 3 formula-fed groups, but only the difference with the FOS 0.2 group was statistically significant. Among the 3 formula-fed groups, the CF group had lower *C. difficile* than the FOS 0.2 and FOS 0.3 groups (1.04 and 0.72 logs lower, respectively), but the difference lacked statistical significance[28]. Meanwhile FOS administration for 8 weeks (0.3

g/100 mL)[27], and SYN1 formula for 1 month (0.4 g/100 mL and 0.8 g/100 mL) did not demonstrate significant changes between groups for *Clostridia* and *Lactobacillus*/ *Enterococcus*[26].

Enterobacteriaceae family (*Escherichia coli*)

A six-month trial with GOS at 0.4 g/100 mL started with 15 days of life[18], and a two-week intervention with GOS at 0.3g/100 mL[20] did not observe significant changes among groups. A one-month treatment with FOS formula (0.2 and 0.3 g/100 mL) resulted in an abundance of *E. coli* had different degrees of variations among infants within each feeding group. For this reason, no statistically significant differences were observed[28]. Oligofructose and inulin at 0.8g/100 mL for 4 months significantly lower *Enterobacteriaceae* abundance in the prebiotic: 8.71 (7.88 ± 9.33) vs. control group: 9.28 (8.50 ± 9.88), and were more similar to BF: 8.51 (5.00 ± 9.35), $p < 0.05$[16].

Discussion

In this systematic review we evaluate the add of prebiotics to IF and the development of the gut microbiota. Prebiotic supplementation increases *Bifidobacterium* counts, except in one trial with FOS[28], and two with GOS/FOS[15, 17]. The genus *Bifidobacterium* is the most predominant in BF children and uses human milk oligosaccharides as substrate for its growth, to add prebiotics to IF aims to resemble the function performed by these non-nutritive carbohydrates[29-32]. A predominate gut with Bifidobacterium is crucial for the overall health since studies demonstrates its role in directly improve the gut barrier against pathogen infection[32,33]. Early decrease of *Bifidobacterium* could inhibit its interaction with the immune system leading to inflammation. Higher bacterial diversity in infancy, before the transition to an adult-like microbiota, might indicate a risk to develop chronic diseases[35,36]. The species *B. longum* (subsp. *infantis*) is the only one with a high capacity to digest human milk oligosaccharides. Herein only one study analyzed species-specific colonization and observed an increase in members of the *Bifidobacterium* genus (specifically *B. infantis*, *B. longum*, and *B. catenulatum*) during a 60-day feeding period[24]. The metabolism of the non-digestive carbohydrates also stimulates the production of short chain fatty acids that act on immune pathways[37], improves the integrity of the gut mucosa, in consequence reduces pathogen invasion[38]. The loss of gut functions might be related to reduce *B. infantis* which selects a microbiota less stable during pivotal immune and metabolic development[5]. As Henrick et al. (2019)[39] described the absence of *B. infantis* in children shows sign of enteric inflammation for

the first 60 days of life, which could increase the risk to develop atopic dermatitis and asthma at 6 years of age[40].

The genus *Lactobacillus* produces lactic acid that act as antiviral and antimicrobial, and maintains eubiosis4[1]. In breastfed children this genus is also present, and studies have reported that some species are effective in preventing diseases[42,43]. *Lactobacillus* spp. can adhere to gut cells, inhibiting pathogen attachment, and stimulates mucin production[44]. Some specific *Lactobacillus* species seems to affect the immune system, as *L. paracasei* reduces incidence of respiratory and gut infections, and improves production of innate and acquired immunity peptides[45]. The presence of *L. fermentum* demonstrates an immunomodulatory role, and *L. salivarius* has an anti-inflammatory effect[46]. And *L. reuteri* produces reuterin, a broad-spectrum substance that restrains the growth of bacteria (gram-positive and negative), fungi, yeast, and parasites[42]. Species of *Lactobacillus* are well-equipped to metabolize oligosacharides[47]. Herein trials were not able to stimulate their growth, as seen by Mugambi et al. (2012)[9].

The Bacteroidetes phylum can also use Human milk oligosaccharides as a source of energy[48]. This phylum plays a role in cell maturation and pathogen resistance[49]. In children, they seem to promote neurodevelopment in late infancy period, where myelination and expanded connectivity of neurons occur. Developmental delay can occur if these processes are decelerated[50-52]. Within the genus *Bacteroides*, the species *B. fragilis* aids cellular maturation of the immune system and pathogen resistance[49;53]. The strain *B. vulgatus* influences the secretion of cytokines, and *B. uniformis* improves inflammation and metabolic dysfunction related to obesity[54-56]. Only one trial observed changes in *the Bacteroides* genus, where prebiotic group was more similar to those of the BF infants at 3 months[16]. This effect might be time-dependent since the trial that described an increase in the genus was the lengthier among the prebiotic studied.

In the genus *Clostridium* the species *C. perfringens*, *C. botulinum*, and *C. difficili* are linked to harm health. They produce toxins that mediate cell damage and clinical signs, and cause gut infection or tissue necrosis[54-56]. Penders et al.[56], observed that infants (1-month-old) who were formula-fed (FF) and not received antibiotics were twice more colonized by *C. difficile* than that BF. Previous research has established that FF children (up to 1-year-old), had 4 times higher colonization rates than exclusively breastfed ones[57]. Breastfed infants usually are colonized by *Ruminococcus*, this strain inhibits *Clostridia* growth, therefore prevents *C.*

difficile colonization[58]. In our review, four in five studies that investigated *Clostridium* spp. presented reduced colonization[17,18, 24 25, 28].

Formula-fed infants have increased levels of *E. coli* in contrast with BF[56, 60]. The genus *Escherichia* is associated with its virulent serotypes. They are the main bacteria responsible for diarrheal diseases, accounted for 1 in 9 deaths worldwide in children under 5 years[61]. They act by producing enterotoxins, through invasion of the gut, or by adherence, which led to loss (effacement) of absorptive microvilli and reduction of water absorption, leading to diarrhea episodes. The studies that evaluated GOS[17, 19], and FOS[27] supplementation did not observe significant changes among groups for these bacteria. By contrast, the SYN1 formula[15] was able to lower *Enterobacteriaceae* abundance.

To understand the intestinal ecosystem requires a broad comprehensive of its structure, activity, and functionality[62]. The methods for obtaining specimens (feces, mucosal biopsy, and intestinal aspiration) may not reflect precisely the composition of the gut microbiota[63]. Herein, the only method used to examine specimen was feces, a non-invasive method and easily obtained, which allows recurrent samples. However, it might not mimic the gut microbiota composition. A sort of techniques can be performed to investigate the microbiota population, such as FISH, PCR, 16S rRNA, and culture methods[64], but they depend on reproducible and precise samples, storage, and processing. Gold standards for bacterial species are 16S rRNA, used to identify and reconstruct phylogenies, due to slow changes of the gene[65]. Techniques applied in this systematic review diverge between trials delivering mixed results. Most applied herein were PCR and FISH, although they are not the gold standard it gives better results compared to culture-based.

Since the type of feeding is not the only factor responsible for shaping microbiota composition, it is also relevant to consider other factors such as delivery mode, gestational age, use of antibiotics, and solid food introduction. C-section-born infants have a lower abundance of *Bifidobacterium* and *Bacteroides* spp. up to 6 months of age, and a reduced population of *Lactobacillus*, *B. longum*, *B. catenulatum*, and *E. coli*. Those who were exclusively breastfed had a similar microbiota of infants born by vaginal delivery[66]. Herein vaginal delivery was most prevalent among trials, only one trial had more c-section[17], which could be related to no differences on *Bifidobacterium* counts. Antibiotic administration is associate with reduced microbiome diversity and richness (*Bifidobacterium* and *Lactobacillus*), and increased Proteobacteria, such as *E. coli*[67]. In our review the trials that informed the use of antibiotics[17,

[26, 27] only one did not had differences on *Bifidobacterium* counts[17]. Time of complementary feeding is also a key factor since studies described that early solid introduction is related to a decrease in *Bifidobacteria* population and more adult-like gut microbiota[68], in his work it was an exclusion factor. Of the fourteen trials only two did not informed funding, and the other twelve were sponsored, funding bias might be present, since only two trials did not informed sponsorship [69].

Conclusion

Infant's intestinal microbiome is shaped by numerous factors, and type of delivery must be considered as important confounding factor. Herein most type of delivery were vaginal and the use of antibiotic were limited among trials. Previous studies have been linking gut microbiota with chronic non-infectious diseases, since the development of the microbiota begins in early life and can influence later health. Overall, the most significant result was the increase in bifidobacteria abundance. A decrease of pathogenic bacteria was detected in some trials. However, mixed results are observed, since length of intervention, type and quantity of prebiotics differ among studies. Different analysis techniques may also represent an important confounding factor. Herein we realize that prebiotic type may exert different bifidogenic effect. Consistent with previous data, prebiotic formula is considered safe regarding growth, adverse effects, and favorable clinical effects. There is still lack of information on long-term effects of administration of such formulas.

Considerations on breastfeeding

The reviewers of this work state that the role of breastfeeding on infants' health is undeniable and we are in agreement with World Health Organization recommendation for exclusive breastfeeding for 6 months and continued until 2 years old, and healthy and adequate complementary feeding after 6 months of age. Our intention in developing this review is to bring light on possible benefits on microbiota when BF is contraindicated or was not performed.

Abbreviations

16SrRNA 16S ribosomal ribonucleic acid
BF breastfeed
C-section Caesarean section
DAPI 40,6-diamidino-2-phenyl- indole
ESPGHAN European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition
FF formula-fed
FISH Fluorescence in situ hybridization
FOS fructo-oligosaccharides
GOS galacto-oligosaccharides

M0 0 months of age
M2 2 months of age
Mo months of age
NI not informed
NS not significant
PCR Polymerase chain reaction
PDX polydextrose
qPCR quantative PCR
rtPCR real-time PCR
SF standard formula
SYN1 Orafti® Synergy1combination of oligofructose and long- chain inulin (50:50)
USA United States of America

References

[1] Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. Microorganisms. 2019;7(1). doi:10.3390/microorganisms7010014**.**

[2] Wilkins LJ, Monga M, Miller AW. Defining Dysbiosis for a Cluster of Chronic Diseases. doi:10.1038/s41598-019-49452-y.

[3] Fischbach MA. Microbiome: Focus on causation and mechanism. *Cell*. 2018;174(4):785. doi:10.1016/J.CELL.2018.07.038

[4] Brüssow H. Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. *Microb Biotechnol*. 2020;13(2):423-434. doi:10.1111/1751-7915.13479

[5] Duar RM, Henrick BM, Casaburi G, Frese SA. Integrating the Ecosystem Services Framework to Define Dysbiosis of the Breastfed Infant Gut: The Role of B. infantis and Human Milk Oligosaccharides. *Front Nutr*. 2020;7:33. doi:10.3389/FNUT.2020.00033

[6] Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, 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*. 2017;14(8):491-502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75

[7] Underwood MA, Salzmand NH, Bennett SH, Barman M, Mills DA, Marcobal A, Tancredi DJ, Bevins CL, Sherman M: A randomized placebo -controlled comparison of 2 prebiotic/probiotic combinations in preterm infants: Impact on weight gain, intestinal micro biota and fecal short chain fatty acids. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2009, 48:216–225.

[8] Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: A systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011;52(2):238-250. doi:10.1097/MPG.0b013e3181fb9e80.

[9] Skórka A, Pieścik-Lech M, Kołodziej M, Szajewska H. Infant formulae supplemented with prebiotics: Are they better than unsupplemented formulae? An updated systematic review. Br J Nutr. 2018;119(7):810-825. doi:10.1017/S0007114518000120.

[10] Mugambi MN, Musekiwa A, Lombard M, Young T, Blaauw R. Synbiotics , probiotics or prebiotics in infant formula for full term infants : a systematic review. Published online 2012. doi 10.1017/jns.2016.35.

[11] Hutton B, Salanti G, Caldwell DM, et al. The PRISMA extension statement for reporting of systematic reviews incorporating network meta-analyses of health care interventions: Checklist and explanations. Ann Intern Med. 2015;162(11):777-784. doi:10.7326/M14-2385.

[12] Sterne JAC, Savović J, Page MJ, et al. RoB 2: A revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. BMJ. 2019;366:1-8. doi:10.1136/bmj.l4898.

[13] Jadad AR, Moore RA, Carroll D, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: Is blinding necessary? Control Clin Trials. 1996;17(1):1-12. doi:10.1016/0197-2456(95)00134-4.

[14] Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group TP. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. 2009;6(7). doi:10.1371/journal.pmed.1000097.

[15] Bakker-Zierikzee AM, Alles MS, Knol J, Kok FJ, Tolboom JJM, Bindels JG. Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable Bifidobacterium animalis on the intestinal microbiota during the first 4 months of life. Br J Nutr. 2005;94(5):783-790. doi:10.1079/bjn20051451.

[16] Closa-Monasterolo R, Gispert-Llaurado M, Luque V, et al. Safety and efficacy of inulin and oligofructose supplementation in infant formula: Results from a randomized clinical trial. Clin Nutr. 2013;32(6):918-927. doi:10.1016/j.clnu.2013.02.009.

[17] Costalos C, Kapiki A, Apostolou M, Papathoma E. The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants. Early Hum Dev. 2008;84(1):45-49. doi:10.1016/j.earlhumdev.2007.03.001.

[18] Giovannini M, Verduci E, Gregori D, et al. Prebiotic Effect of an Infant Formula Supplemented with Galacto-Oligosaccharides: Randomized Multicenter Trial. J Am Coll Nutr. 2014;33(5):385-393. doi:10.1080/07315724.2013.878232.

[19] Knol J, Scholtens P, Kafka C, et al. Colon microbiota in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: More like breast-fed infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2005;40(1):36-42. doi:10.1097/00005176-200501000-00007.

[20] Matsuki T, Tajima S, Hara T, Yahagi K, Ogawa E, Kodama H. Infant formula with galacto-oligosaccharides (OM55N) stimulates the growth of indigenous bifidobacteria in healthy term infants. Benef Microbes. 2016;7(4):453-461. doi:10.3920/BM2015.0168.

[21] Paineau D, Respondek F, Menet V, Sauvage R, Bornet F, Wagner A. Effects of short-chain fructooligosaccharides on faecal bifidobacteria and specific immune response in formula-fed term infants: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2014;60(3):167-175. doi:10.3177/jnsv.60.167.

[22] Ripoll C, Chappuis E, Respondek F, Wagner A, Gottrand F. ScFOS supplemented follow-on formula in healthy infants: Impact on vaccine specific faecal secretory IGA response, faecal bifidobacteria, growth and digestive tolerance. Bioact Carbohydrates Diet Fibre. 2015;5(2):169-178. doi:10.1016/j.bcdf.2015.03.006.

[23] Salvini F, Riva E, Salvatici E, et al. A Specific Prebiotic Mixture Added to Starting Infant Formula Has Long-Lasting. J Nutr. 2011;141:1335-1339. doi:10.3945/jn.110.136747.1335.

[24] Scalabrin DMF, Mitmesser SH, Welling GW, et al. New prebiotic blend of polydextrose and galacto-oligosaccharides has a bifidogenic effect in young infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;54(3):343-352. doi:10.1097/MPG.0b013e318237ed95.

[25] Scholtens PAMJ, Alliet P, Raes M, et al. Fecal secretory immunoglobulin A is increased in healthy infants who receive a formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides. J Nutr. 2008;138(6):1141-1147. doi:10.1093/jn/138.6.1141.

[26] Veereman-Wauters G, Staelens S, Van De Broek H, et al. Physiological and bifidogenic effects of prebiotic supplements in infant formulae. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011;52(6):763-771. doi:10.1097/MPG.0b013e3182139f39.

[27] Wernimont S, Northington R, Kullen MJ, Yao M, Bettler J. Effect of an α-lactalbumin-enriched infant formula supplemented with oligofructose on fecal microbiota, stool characteristics, and hydration status: A randomized, double-blind, controlled trial. Clin Pediatr (Phila). 2015;54(4):359-370. doi:10.1177/0009922814553433.

[28] Xia Q, Williams T, Hustead D, Price P, Morrison M, Yu Z. Quantitative analysis of intestinal bacterial populations from term infants fed formula supplemented with fructo-oligosaccharides. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;55(3):314-320. doi:10.1097/MPG.0b013e3182523254.

[29] Underwood MA, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Bifidobacterium longum subspecies infantis: champion colonizer of the infant gut. Pediatr Res. 2015;77(1-2):229-235. doi:10.1038/pr.2014.156.

[30] Craft KM, Townsend SD. The Human Milk Glycome as a Defense Against Infectious Diseases: Rationale, Challenges, and Opportunities. ACS Infect Dis. 2018;4(2):77-83. doi:10.1021/acsinfecdis.7b00209.

[31] Thomson P, Medina DA, Garrido D. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. Food Microbiol. 2018;75:37-46. doi:10.1016/j.fm.2017.09.001.

[32] Chouraqui J. Does the contribution of human milk oligosaccharides to the beneficial effects of breast milk allow us to hope for an improvement in infant formulas ? Crit Rev Food Sci Nutr. 2020;0(0):1-12. doi:10.1080/10408398.2020.1761772.

[33] Li YT, Wang L, Chen Y, et al. Effects of gut microbiota on hepatic damage after acute liver injury in rats. J Trauma. 2010;68(1):76-83. doi:10.1097/TA.0b013e31818ba467

[34] Sarkar A, Mandal S. Bifidobacteria-Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. Microbiol Res. 2016;192:159-171. doi:10.1016/j.micres.2016.07.001.

[35] Thompson AL, Monteagudo-Mera A, Cadenas MB, Lampl ML, Azcarate-Peril MA. Milk- and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome. Front Cell Infect Microbiol. 2015;5:3. Published 2015 Feb 5. doi:10.3389/fcimb.2015.00003.

[36] Turroni F, Milani C, Duranti S, et al. Deciphering bifidobacterial-mediated metabolic interactions and their impact on gut microbiota by a multi-omics approach. ISME J. 2016;10(7):1656-1668. doi:10.1038/ismej.2015.236.

[37] Moro G, Minoli I, Mosca M, et al. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2002;34(3):291-295. doi:10.1097/00005176-200203000-00014.

[38] Corsello G, Carta M, Marinello R, et al. Preventive Effect of Cow's Milk Fermented with Lactobacillus paracasei CBA L74 on Common Infectious Diseases in Children: A Multicenter Randomized Controlled Trial. Nutrients. 2017;9(7):669. Published 2017 Jun 27. doi:10.3390/nu9070669.

[39] Henrick BM, Chew S, Casaburi G, et al. Colonization by B. infantis EVC001 modulates enteric inflammation in exclusively breastfed infants. Pediatr Res. 2019;86(6):749-757. doi:10.1038/s41390-019-0533-2

[40] Orivuori L, Mustonen K, de Goffau MC, et al. High level of fecal calprotectin at age 2 months as a marker of intestinal inflammation predicts atopic dermatitis and asthma by age 6. Clin Exp Allergy. 2015;45(5):928-939. doi:10.1111/cea.12522

[41] Tachedjian G, Aldunate M, Bradshaw CS, Cone RA. The role of lactic acid production by probiotic Lactobacillus species in vaginal health. Res Microbiol. 2017;168(9-10):782-792. doi:10.1016/j.resmic.2017.04.001.

[42] Urbańska M, Szajewska H. The efficacy of Lactobacillus reuteri DSM 17938 in infants and children: a review of the current evidence. Eur J Pediatr. 2014;173(10):1327-1337. doi:10.1007/s00431-014-2328-0.

[43] Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. BMJ. 2001;322(7298):1327. doi:10.1136/bmj.322.7298.1327.

[44] Ma J, Li Z, Zhang W, et al. Comparison of gut microbiota in exclusively breast-fed and formula-fed babies: a study of 91 term infants. Sci Rep. 2020;10(1):15792. Published 2020 Sep 25. doi:10.1038/s41598-020-72635-x.

[45] Corsello G, Carta M, Marinello R, et al. Preventive Effect of Cow's Milk Fermented with Lactobacillus paracasei CBA L74 on Common Infectious Diseases in Children: A Multicenter Randomized Controlled Trial. Nutrients. 2017;9(7):669. Published 2017 Jun 27. doi:10.3390/nu9070669

[46] Díaz-Ropero MP, Martín R, Sierra S, et al. Two Lactobacillus strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. J Appl Microbiol. 2007;102(2):337-343. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03102.x.

[47] Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(42):15611-15616. doi:10.1073/pnas.0607117103.

[48] Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB., Lebrilla CB., Mills DA. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010;58 (9):5334–5340. doi: 10.1021/jf9044205

[49] Wexler AG, Goodman AL. An insider's perspective: Bacteroides as a window into the microbiome. Nat Microbiol. 2017;2:17026. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.26.

[50] Gilmore JH, Knickmeyer RC, Gao W. Imaging structural and functional brain development in early childhood. Nat Rev Neurosci. 2018;19(3):123–137. doi:10.1038/nrn.2018.1.

[51] Jena A, Montoya CA, Mullaney JA, Dilger RN, Young W, McNabb WC, Roy NC. Gut-brain axis in the early postnatal years of life: a developmental perspective. Front Integr Neurosci. 2020;14:44. doi:10.3389/fnint.2020.000

[52] Tamana SK, Tun HM, Konya T, et al. Bacteroides-dominant gut microbiome of late infancy is associated with enhanced neurodevelopment. Gut Microbes. 2021;13(1):1-17. doi:10.1080/19490976.2021.1930875

[53] Huang JY, Lee SM, Mazmanian SK. The human commensal Bacteroides fragilis binds intestinal mucin. Anaerobe. 2011;17(4):137-141. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.05.017.

[54] Gauffin Cano P, Santacruz A, Moya Á, Sanz Y. Bacteroides uniformis CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity. PLoS One. 2012;7(7):e41079. doi:10.1371/journal.pone.0041079.

[55] Ó Cuív P, de Wouters T, Giri R, et al. The gut bacterium and pathobiont Bacteroides vulgatus activates NF-κB in a human gut epithelial cell line in a strain and growth phase dependent manner. Anaerobe. 2017;47:209-217. doi:10.1016/j.anaerobe.2017.06.002.

[56] Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics. 2006;118(2):511-521. doi:10.1542/peds.2005-2824.

[57] Tullus K, Aronsson B, Marcus S, Möllby R. Intestinal colonization with Clostridium difficile in infants up to 18 months of age. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1989;8(5):390-393. doi:10.1007/BF01964052.

[58] Morelli L. Postnatal development of intestinal microbiota as influenced by infant nutrition. J Nutr. 2008;138(9):1791S-1795S. doi:10.1093/jn/138.9.1791S.

[59] Fallani M, Amarri S, Uusijarvi A, et al. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. Microbiology (Reading). 2011;157(Pt 5):1385-1392. doi:10.1099/mic.0.042143-0.

[60] Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). Anaerobe. 2011;17(6):478-482. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.009.

[61] Ugboko HU, Nwinyi OC, Oranusi SU, Oyewale JO. Childhood diarrhoeal diseases in developing countries [published correction appears in Heliyon. 2020 Jun 10;6(6):e04040]. Heliyon. 2020;6(4):e03690. Published 2020 Apr 13. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03690.

[62] Heintz-Buschart A, Wilmes P. Human Gut Microbiome: Function Matters. Trends Microbiol. 2018;26(7):563-574. doi:10.1016/j.tim.2017.11.002.

[63] Ingala MR, Simmons NB, Wultsch C, Krampis K, Speer KA, Perkins SL. Comparing microbiome sampling methods in a wild mammal: Fecal and intestinal samples record different signals of host ecology, evolution. Front Microbiol. 2018;9(MAY). doi:10.3389/fmicb.2018.00803.

[64] Watson EJ, Giles J, Scherer BL, Blatchford P. Human faecal collection methods demonstrate a bias in microbiome composition by cell wall structure. Sci Rep. 2019;9(1):1-8. doi:10.1038/s41598-019-53183-5.

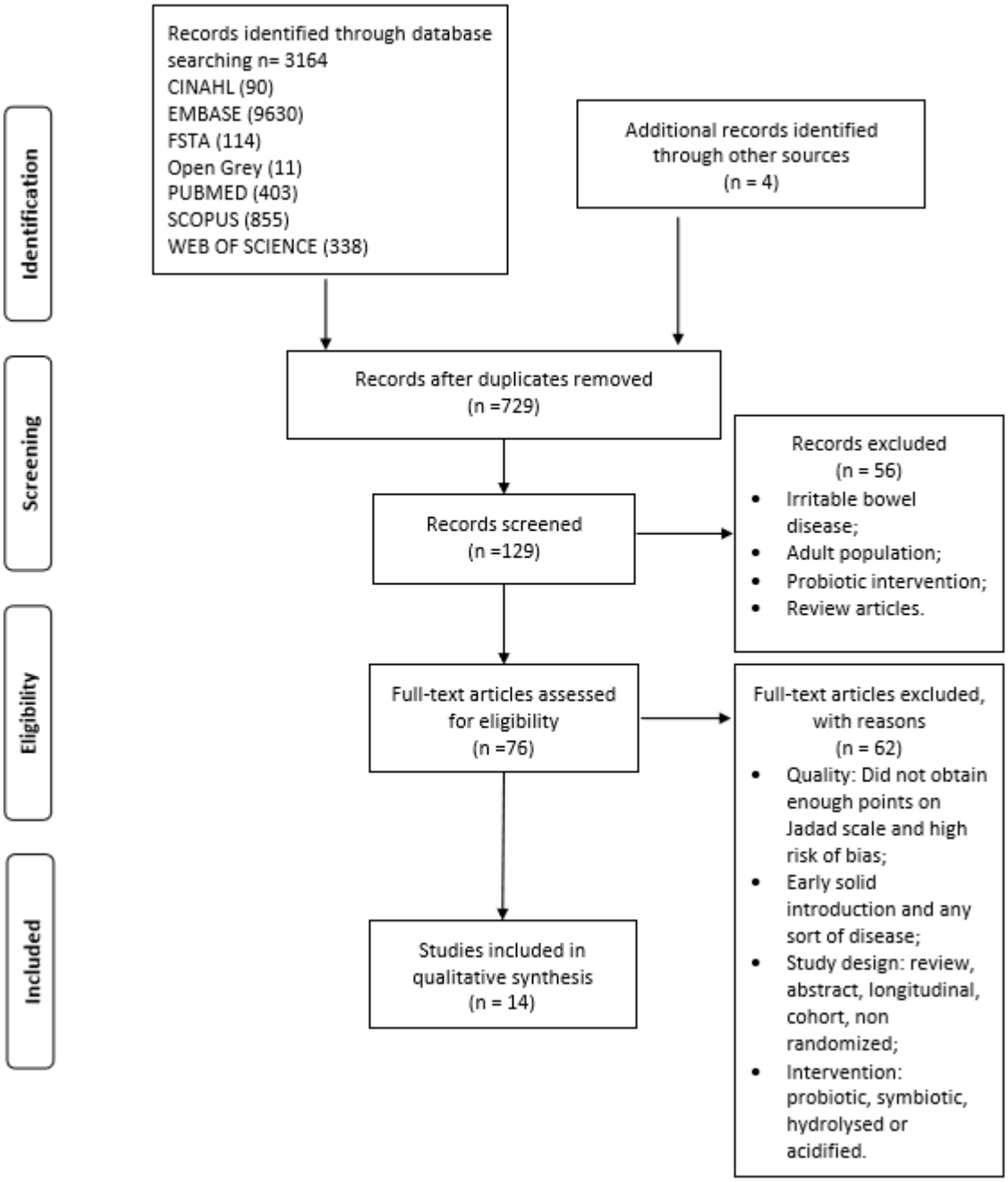
[65] Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(11):5088-5090. doi:10.1073/PNAS.74.11.5088.

[66] Princisval L, Rebelo F, Williams BL, et al. Association Between the Mode of Delivery and Infant Gut Microbiota Composition Up to 6 Months of Age: A Systematic Literature Review Considering the Role of Breastfeeding [published online ahead of print, 2021 Apr 9]. Nutr Rev. 2021;nuab008. doi:10.1093/nutrit/nuab008.

[67] McDonnell L, Gilkes A, Ashworth M, et al. Association between antibiotics and gut microbiome dysbiosis in children: systematic review and meta-analysis. Gut Microbes. 2021;13(1):1-18. doi:10.1080/19490976.2020.1870402

[68] Differding MK, Benjamin-Neelon SE, Hoyo C, Østbye T, Mueller NT. Timing of complementary feeding is associated with gut microbiota diversity and composition and short chain fatty acid concentrations over the first year of life. BMC Microbiol. 2020;20(1):56. doi:10.1186/s12866-020-01723-9.

[69] Jefferson T. Sponsorship bias in clinical trials: growing menace or dawning realisation? J R Soc Med. 2020;113(4):148-157. doi:10.1177/0141076820914242



Supplementary figure 1: PRISMA flow diagram.

Supplementary table 1

Reference	Reason for exclusion
Alliet et al., 2007	Outcome: Did not analyse gastrointestinal microbiota
Al-Zyoud, 2019	Non-randomized and unhealthy children (with phenylketonuria)
Ashley, 2012	Outcome: Did not analyse gastrointestinal microbiota
Bakker-Zierikzee, 2007	Outcome: Did not analyse gastrointestinal microbiota
Ballini, 2019	Population: teenagers (14-18 years old)
Bazanella, 2017	Intervention: prebiotic formula
Ben, 2004	Quality assessment: did not obtain enough score on Jadad scale and high risk of bias
Ben, 2008	Quality assessment: did not obtain enough score on Jadad scale and high risk of bias
Berger, 2020	Early solid introduction
Borewicz, 2019	Study design: longitudinal (KOALA and BINGO cohort)
Brunser et al., 2006	Early solid introduction
Bruzzese, 2009	Outcome: Did not analyse gastrointestinal microbiota
Burton, 2017	Population: adults
Cai, 2008	Same population as Ben, 2008 Did not obtain enough score on Jadad scale
Candy, 2018	Intervention: synbiotic formula
Capitão, 2020	Population: children with 3-5 years old
Cardile, 2016	Study design: review
Castanet, 2020	Intervention: synbiotic formula
Chin, 2021	Intervention: non-exclusive formula fed (brestfeed + formula), and non-randomized
Chua, 2017	Intervention: mixed-feeding (formula + breastfeeding)
Chong, 2018	Study design: review
Chrzanowska-Liszewska, 2012	Intervention and population: Enteral nutrition and premature infants
Civardi, 2015	Intervention: acidified milk with prebiotics
De Morais, 2006	Study design: review
Dhudasia, 2019	Intervention: extensively hydrolyzed formula and Outcome: Did not evaluate GI microbiota.
Estorninos, 2019	Outcome: Did not analyse GI microbiota
Euler, 2005	Quality assessment: did not obtain enough score on Jadad scale and high risk of bias
Fanaro, 2005	Quality assessment: did not obtain enough score on Jadad scale and high risk of bias
Fanaro, 2008	Study design: literature review
Fanaro, 2009	Early solid introduction
Flaherman, 2018	Intervention: breastfeeding with early limited formula

Goehring, 2016	Did not evaluate GI microbiota and same population as Marriage, 2015
Grześkowiak, 2012	Intervention: probiotic formula
Haarman, 2005	Same population as Knol, 2005
Hascoët, 2011	Intervention: probiotic formula
He, 2019	Intervention: formula with milk fat globule membrane
Ivakhnenko, 2013	Early solid introduction
Kajzer, 2016	Meeting abstract
Kukkonen, 2005	Intervention: probiotic and prebiotic capsule
Liu, 2016	● Population: children and rats; ● Intervention: SF was not provided by the researchers, instead was purchased at the discretion of the parents and; ● Quality assessment: did not obtain enough points on Jadad scale.
Liu, 2017	Population: adults
Maldonado, 2010	Intervention: probiotic formula
Mardani, 2021	Study design: review
Magne et al., 2008	Intervention: Partial formula feeding
Marriage, 2015	Did not analyse GI microbiota
Moro, 2002	Quality assessment: did not obtain enough score on Jadad scale and high risk of bias (assessment)
Penders et al., 2005	Study design: longitudinal (KOALA cohort)
Paganini, 2017	Intervention: powder with or without prebiotic
Quinn, 2020	Study design: Symposium review
Radke, 2017	Intervention: symbiotic formula (*B. lactis* with Bovine Milk Oligosaccharides)
Riechmann, 2020	Study design: non-randomized trial
Salminen, 2016	Same population as Scalabrin et al., 2012
Salminen, 2020	Study design: review
Savage, 2018	Intervention: Did not described the type of formula used on infants
Sherman, 2009	Summit meeting review
Sierra, 2015	Early solid introduction
Smilowitz, 2017	Intervention: Prebitic formula
Tandon, 2019	Population: adults
van der Aa, 2010	Intervention: synbiotic formula
Vitoria Miñana, 2007	Study design: review
Walker, 2010	Meeting abstract
Williams, 2014	Did not analyse gastrointestinal microbiota
Wopereis et al., 2018	Intervention: partially hydrolysed formula

Supplementary table 2

Database	Period of time	Keywords and their combinations
Cochrane Library and PROSPERO	August/2020 to April/2021	Search for systematic review studies with the same theme
Pubmed	August/2020 to April/2021	(Prebiotics[mesh] OR Prebiotic*[tiab] OR Oligosaccharides[mesh] OR Oligosaccharides[tiab] OR galacto oligosaccharides [tiab] OR galacto-oligosaccharide [tiab] OR gos [tiab] OR fos [tiab] OR fructooligosaccharides [tiab] OR 2-fucosyllactose [tiab] OR 2-FL [tiab] OR lacto-N- neotetraose [tiab] OR inulin* [tiab] OR polydextrose[tiab] OR Infant[mesh] OR Infant*[tiab] OR Infant,newborn [mesh] OR Newborn*[tiab] OR Infant Formula[mesh] OR Baby Formula*[tiab] OR Infant Formulae [tiab] OR formula-fed [all fields] OR Milk,Human [mesh] OR Human milk [all fields] OR Breast Feeding [mesh] OR Breast Feeding[tiab] OR Dietary Supplements[mesh] OR Dietary Supplement*[all fields] OR *Bifidobacterium*[mesh] OR *Bifidobacterium* [all fields]) AND (Microbiota[mesh] OR Microbiota[tiab] OR Intestines[mesh] OR Intestine[tiab] OR Gastrointestinal Microbiome [mesh] OR Gut Microbiome* [tiab] OR Gut Microbiota* [tiab] OR Intestinal Microbiome* [tiab] OR Intestinal Microbiota* [tiab]) AND (Randomized Controlled Trial [pt] OR Randomized Controlled Trial [tiab] OR RCT [tiab] OR Controlled Clinical Trials [tiab] OR Clinical Trials [tiab] OR Double-Blind Method [mesh] OR Double-Blind study[tiab] OR Double-Blind [all fields] OR placebo [tiab] OR ramdomiz*[tiab])
EMBASE	August/2020 to April/2021	('artificial milk'/exp OR 'prebiotic agent'/exp OR 'oligosaccharide'/exp OR prebiotic* OR oligosaccharid* OR galactooligosaccharid* OR 'galacto-oligosaccharide' OR gos OR fos OR fructooligosaccharid* OR '2-fucosyllactose' OR '2 fl' OR 'lacto-n- neotetraose' OR inulin* OR polydextrose OR 'infant formula' OR 'baby formula' OR 'human milk') AND ('intestine flora'/exp OR 'gastrointestinal microbiome' OR 'gut microbiome' OR 'gut microbiota' OR 'intestinal microbiome' OR 'intestinal microbiota' OR 'gastrointestinal flora' OR 'intestine microbiota') AND ('clinical article' OR 'clinical trial' OR 'randomized controlled trial' OR 'randomized controlled trial topic' OR rct OR 'controlled clinical trials')

SCOPUS	August/2020 to April/2021	(TITLE-ABS-KEY (prebiotic* OR oligosaccharid* OR galactooligosaccharid* OR "galacto-oligosaccharide" OR gos OR fos OR fructooligosaccharid* OR "2-fucosyllactose" OR 2-fl OR "lacto-N- neotetraose" OR inulin* OR polydextrose OR "Infant Formula" OR "Baby Formula" OR "Human milk") AND (TITLE-ABS-KEY ("Gastrointestinal Microbiome" OR "Gut Microbiome" OR "Gut Microbiota" OR "Intestinal Microbiome" OR "Intestinal Microbiota")) AND (TITLE-ABS-KEY ("Randomized Controlled Trial" OR rct OR "Controlled Clinical Trials" OR "Clinical Trials"))
Web of Science	August/2020 to April/2021	(prebiotic* OR oligosaccharid* OR galactooligosaccharid* OR "galacto-oligosaccharide" OR gos OR fos OR fructooligosaccharid* OR "2-fucosyllactose" OR 2-fl OR "lacto-N- neotetraose" OR inulin* OR polydextrose OR "Infant Formula" OR "Baby Formula" OR "Human milk") AND ("Gastrointestinal Microbiome" OR "Gut Microbiome" OR "Gut Microbiota" OR "Intestinal Microbiome" OR "Intestinal Microbiota") AND ("Randomized Controlled Trial" OR rct OR "Controlled Clinical Trials" OR "Clinical Trials")
FSTA	August/2020 to April/2021	(prebiotic* OR oligosaccharid* OR galactooligosaccharid* OR "galacto-oligosaccharide" OR gos OR fos OR fructooligosaccharid* OR "2-fucosyllactose" OR 2-fl OR "lacto-N-neotetraose" OR inulin* OR polydextrose OR "Infant Formula" OR "Baby Formula" OR "Human milk") AND ("Gastrointestinal Microbiome" OR "Gut Microbiome" OR "Gut Microbiota" OR "Intestinal Microbiome" OR "Intestinal Microbiota") AND ("Randomized Controlled Trial" OR rct OR "Controlled Clinical Trials" OR "Clinical Trials")
CINAHAL	August/2020 to April/2021	(prebiotic* OR oligosaccharid* OR galactooligosaccharid* OR "galacto-oligosaccharide" OR gos OR fos OR fructooligosaccharid* OR "2-fucosyllactose" OR 2-fl OR "lacto-N- neotetraose" OR inulin* OR polydextrose OR "Infant Formula" OR "Baby Formula" OR "Human milk") AND ("Gastrointestinal Microbiome" OR "Gut Microbiome" OR "Gut Microbiota" OR "Intestinal Microbiome" OR "Intestinal Microbiota") AND ("Randomized Controlled Trial" OR rct OR "Controlled Clinical Trials" OR "Clinical Trials")
Open Grey	August/2020 to April/2021	(prebiotic* OR oligosaccharid* OR "Infant Formula") AND ("Gut Microbiota" OR "Intestinal Microbiota")

7. Conclusão

Estudos prévios demonstraram associação ente a microbiota intestinal e o surgimento de doenças crônicas, cujo desenvolvimento se inicia na infância. A microbiota atua na maturação do sistema imune, na absorção de nutrientes e impede a invasão de patógenos. Mudanças na composição microbiana são associadas com o desenvolvimento de obesidade, atopia e doenças inflamatórias crônicas. A formação do perfil microbiológico do trato intestinal infantil pode ser modulada por uma série de fatores, sendo os mais importantes o tipo de parto, o método de alimentação (amamentado ou com uso de fórmula) e fatores ambientais. Nesta revisão buscamos entender a influência do uso de fórmulas prebióticas na composição da microbiota intestinal infantil.

Os resultados encontrados confirmam achados da literatura, de que o uso de fórmulas infantis suplementadas com prebióticos modulam positivamente a composição da microbiota gastrointestinal infantil. Alguns táxons específicos já são caracterizados entre crianças amamentadas ou não. No que diz respeito ao gênero *Bifidobacterium*, este está presente especialmente em altas quantidades em crianças que são amamentadas. Seu aumento com o uso de fórmulas prebióticas é um efeito positivo, uma vez que lactentes que utilizam fórmula infantil não suplementadas apresentam baixas concentração deste tipo de bactéria, que desempenha uma série de benefícios ao lactente. Os resultados para o gênero *Lactobacillus* são divergentes e apenas alguns estudos observaram aumento nesta população, apesar de terem a capacidade de utilizar OS como substrato. Para o gênero *Bacteroidetes* apenas um estudo observou redução. Para bactérias patogênicas, como *Clostridium* spp. e *E. coli*, alguns estudos que observaram menor colonização patogênica, enquanto outros não observaram diferenças entre os grupos.

Esta revisão considerou apenas o papel modulador de fórmulas prebióticas na microbiota infantil, e teve como limitações o fato de serem estudos patrocinados e da intervenção ser de curta duração. Para os fatores confundiores como uso de antibiótico e tipo de parto, a maioria dos ensaios não utilizou antibiótico e o parto vaginal foi mais frequente. Os estudos foram realizados com crianças nascidas a termo e saudáveis, e o parto vaginal esteve em maior proporção nos estudos incluídos. Entretanto dada a heterogeneidade dos ensaios conclusões definitivas não podem ser adotadas.

Referências

AMITAY, E. L.; KEINAN-BOKER, L. Breastfeeding and childhood leukemia incidence: a meta-analysis and systematic review. **JAMA pediatrics**, v. 169, n. 6, p. e151025-e151025, 2015.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; REMLEY, D. T. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 4, p. 525-535, 1999.

ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; LE-DOARE, K. M. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early human development**, v. 91, n. 11, p. 629-635, 2015.

APPERT, N. **The Art of Preserving All Kinds of Animal and Vegetable Substances for Several Years**. Publishing LLC, Whitefish, 1811.

ARUMUGAM, M., RAES, J., PELLETIER, E., et al. "Enterotypes of the human gut microbiome". **Nature 2011 473:7346**, v. 473, n. 7346, p. 174–180, 2011.

AZAD, M. B. Et al. Gut Microbiota of Healthy Canadian Infants: Profiles by Mode of Delivery and Infant Diet at 4 Months. **Canadian Medical Association Journal**. v. 185, n. 5, p. 385-394, 2013.

BÄCKHED, F. et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 5, p. 690-703, 2015.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatric Clinics**, v. 60, n. 1, p. 49-74, 2013.

BARCELO, A. et al. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon, **Gut**, v. 46, n. 2, p. 218, 2000.

BAUER, J.; GERSS, J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. **Clinical nutrition**, v. 30, n. 2, p. 215-220, 2011.

BÄUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 85-93, 2016.

BEZIRTZOGLOU, E., TSIOTSIAS, A., WELLING, G. W. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH), **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 478–482, 2011.

BODE, L.; JANTSCHER-KRENN, E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 383S-391S, 2012.

BOEHM, G., et al. Prebiotic concept for infant nutrition, **Acta Pædiatrica**, v. 92, n. 441, p. 64–67, 2003.

BOKULICH, N. A. et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. **Science translational medicine**, v. 8, n. 343, p. 343ra82-343ra82, 2016.

BOREWICZ, K, et al. Correlating Infant Fecal Microbiota Composition and Human Milk Oligosaccharide Consumption by Microbiota of 1-Month-Old Breastfed Infants. **Molecular nutrition & food research**, v. 63, n. 13, p. 1801214, 2019.

BRACKEN, F. J. Infant feeding in the American colonies. **J. Am. Diet. Assoc**, v. 29, p. 349–358, 1953.

BRAEGGER, C. et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: A systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 52, n. 2, p. 238–250, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar. Brasília; **Cadernos de Atenção Básica**, n. 23, 2015:184p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_crianca_aleitamento_materno_cab23.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Guia alimentar para crianças brasileiras menores de 2 anos versão resumida. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2021.

BRÜSSOW, H. Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis, **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 423–434, 2020.

BURGESS, J. W. A history of infant feeding. **Medical bulletin (Ann Arbor, Mich.)**, v. 19, n. 12, p. 324–333, 1953.

CARDOSO, E. C.; FERNANDES, R. A. Q. Situações maternas impeditivas do aleitamento materno: uma revisão bibliográfica. **Rev Saúde**, n. 7, v. 1-2, p. 50-6, 2013.

CARDOSO, B.B. et al. Novel and emerging prebiotics: Advances and opportunities, **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 95, p. 41–95, 2021.

CENTRE FOR REVIEWS AND DISSEMINATION, U. of Y. "CRD's guidance on systematic reviews", **Centre for Reviews and Dissemination, University of York, 2008**, p. 294, 2009. Disponível em:https://gate2.library.lse.ac.uk/login?url=http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2524.2003.00433.x/abstract. Acesso em: 24 jul. 2021.

CHANG, C.; LIN, H. Dysbiosis in gastrointestinal disorders. **Best practice & research Clinical gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 3-15, 2016.

CHATURVEDI, P. et al. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. **Glycobiology**, v. 11, n. 5, p. 365-372, 2012.

CHICHLOWSKI, M. et al. Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 55, n. 3, p. 321, 2012.

CHIU, L. et al. Protective microbiota: from localized to long-reaching co-immunity. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1678, 2017.

CHOURAQUI, J. P. Does the contribution of human milk oligosaccharides to the beneficial effects of breast milk allow us to hope for an improvement in infant formulas? **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 61, n. 9, p. 1503-1514, 2020.

COLLADO, M. C.; RAUTAVA, S.; AAKKO, J.; ISOLAURI, E. et al. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. **Sci Rep**, 6, p. 23129, 2016.

COOK, D. A. Nutrient levels in infant formulas: technical considerations. **The Journal of nutrition**, v. 119, n. suppl_12, p. 1773-1778, 1989.

COSTABILE, A. et al. Impact of polydextrose on the faecal microbiota: a double-blind, crossover, placebo-controlled feeding study in healthy human subjects. **British Journal of Nutrition,** v. 108, n. 3, p. 471-481, 2012.

COULET, M. et al. Pre-clinical safety evaluation of the synthetic human milk, nature-identical, oligosaccharide 2′-O-Fucosyllactose (2′ FL). Regulatory Toxicology and **Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 59-69, 2014.

DAVANI-DAVARI, D. et al. Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 92, 2019.

DAWODU, A. et al. Heightened attention to supplementation is needed to improve the vitamin D status of breastfeeding mothers and infants when sunshine exposure is restricted. **Maternal & child nutrition**, v. 10, n. 3, p. 383-397, 2014.

DERRIEN, M.; ALVAREZ, A.S.; DE VOS, W.M. The gut microbiota in the first decade of life. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 12, p. 997-1010, 2019.

DOGRA, S. et al. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. **MBio**, v. 6, n. 1, 2015.

DUAR, R. M. *et al.* Integrating the Ecosystem Services Framework to Define Dysbiosis of the Breastfed Infant Gut: The Role of B. infantis and Human Milk Oligosaccharides, **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 33, 2020.

FOMON, S. Infant feeding in the 20th century: formula and beikost, **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 2, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATON (**FAO***)*, 2020, Dísponivel em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B72-1981%252FCXS_072e.pdf. Acessado em julho 2021.

FUNK, B. C. The etiology of the deficiency diseases. **J. State Med**. v. 20, p. 341–368, 1912.

GDALEVICH, M. et al. Breast-feeding and the onset of atopic dermatitis in childhood: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 4, p. 520-527, 2001.

GENSOLLEN, T. et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 539-544, 2016.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R., MCCARTNEY, A. L., RASTALL, R. A. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections, **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. S1, p. S31–S34, abr. 2005.
GIBSON, G. R., et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics, **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.

GREER, F. R. Do breastfed infants need supplemental vitamins? **Pediatric Clinics of North America,** v. 48, n. 2, p. 415-423, 2001.

GRIER, A. et al. Impact of prematurity and nutrition on the developing gut microbiome and preterm infant growth. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 158, 2017.

GUARALDI, F.; SALVATORI, G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 94, 2012.

GULLÓN, B. et al. Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. **Trends in food science & technology**, v. 30, n. 2, p. 153-161, 2013.

HAMAKER, B.; TUNCIL, Y. E. A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota. **Journal of Molecular Biology**. v. 426, n. 23, p. 3838- 3850, 2014.

HIGGINS, J. P. T et al. Chapter 8: Assessing risk of bias in a randomized trial. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.1 (updated September 2020). **Cochrane**, 2020. Disponível em: www.training.cochrane.org/handbook

HORTA, B. L.; LORET DE MOLA, C.; VICTORA, C. G. Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Acta paediatrica**, v. 104, p. 30-37, 2015.

HOWLETT, J. F. et al. The definition of dietary fiber–discussions at the Ninth Vahouny Fiber Symposium: building scientific agreement. **Food & nutrition research**, v. 54, n. 1, p. 5750, 2010.

INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMICS (IMNA). Infant Formula: Evaluating the Safety of New Ingredients. **The National Academics Press**; Washington, DC, USA, 2004.

INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIE (IMNA). **Defining safety for infants, in Infant Formula: Evaluating the Safety of New Ingredients**. Washington, DC, The National Academies Press, 2004.

IP, S. et al. Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. **Evid Rep Technol Assess**, n. 153, p. 1-186, 2007.

JAKOBSDOTTIR, G.; NYMAN, M.; FÅK, F. Designing future prebiotic fiber to target metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 497–502, 2014.

KIM, S.Y.; YI, D.Y. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. **Clinical and experimental pediatrics**, v. 63, n. 8, p. 301, 2020.

KOLETZKO, B. et al. Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 41, n. 5, p. 584-599, 2005.

KORPELA, K. et al. Selective maternal seeding and environment shape the human gut microbiome. **Genome research**, v. 28, n. 4, p. 561-568, 2018.

LATERZA, L. et al. The gut microbiota and immune system relationship in human graft-versus-host disease. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2016025–e2016025, 2016.

LAWLEY, T. D.; WALKER, A. W. Intestinal colonization resistance. **Immunology**, v. 138, n. 1, p. 1-11, 2013.

LEE, M. K. et al. Nutritional supplements during breastfeeding. **Current Pediatric Reviews**, v. 8, n. 4, p. 292-298, 2011

LEVENSTEIN, H. **Revolution at the Table: The Transformation of the American Diet**. New York, NY, Oxford University Press, 1988.

LI, J. et al. Unmasking Fucosylation: from Cell Adhesion to Immune System Regulation and Diseases, **Cell Chemical Biology**, v. 25, n. 5, p. 499–512, 2018.

LIBERATI, A. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. **Journal of Clinical Epidemiololy**, 62, n. 10, p. e1-34, 2009.

LÖNNERDAL, B. Human milk proteins. In: *Protecting Infants through Human Milk*. **Springer**, p. 11-25, 2004.

LOUIS, P.; FLINT, H. J.; MICHEL, C. How to manipulate the microbiota: prebiotics. In: Microbiota of the human body. **Springer, Cham**, p. 119-142, 2016.

MACFARLANE, G. T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics, **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 2, p. 305–344, 2008.

MARSHALL, I. J., et al. Machine learning for identifying randomized controlled trials: an evaluation and practitioner's guide. **Research synthesis method***s*, v. 9, n. 4, p. 602-614, 2018.

MARSHALL, I. J.; KUIPER, J. L; WALLACE, B. C. RobotReviewer: evaluation of a system for automatically assessing bias in clinical trials. **Journal of the American Medical Informatics Association**, v. 23, n. 1, p. 193-201, 2016.

MARTIN, C. R.; LING, P-R; BLACKBURN, G. L. Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. **Nutrients**, v. 8, n. 5, p. 279, 2016.

MIQDADY, M., et al. Prebiotics in the Infant Microbiome: The Past, Present, and Future. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 1–14, 1 jan. 2020.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **PLoS medicine**. v. 6, n, 7, p. e1000097, 2009.

MORO, G; BOEHM, G. Clinical outcomes of prebiotic intervention trials during infancy: a review. **Functional Food Reviews**, v. 4, n. 3, p. 101-113, 2012.

MUGAMBI, M. N. et al. Synbiotics, probiotics or prebiotics in infant formula for full term infants: a systematic review. **Nutrition journal**, v. 11, n. 1, p.1-32.2012.

MULLER, M. The Baby Killer. **War on Want**, 1974.

MUSILOVA, S, et al. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. **Beneficial microbes**, v. 5, n. 3, p. 273-283, 2014.

NATIVIDAD, J. M. M.; VERDU, E. F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. **Pharmacological research**, v. 69, n. 1, p. 42-51, 2013.

NOMMSEN, L. A. et al. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 53, n. 2, p. 457-465, 1991.

OOZEER, R. et al. Intestinal microbiology in early life: specific prebiotics can have similar functionalities as human-milk oligosaccharides. **The American journal of clinical nutrition**, v. 98, n. 2, p. 561S-571S, 2013.

OSBORN, M. L. The rent breasts. Part II., **Midwife, health visitor & community nurse**, v. 15, n. 9, p. 347–348, 1979.

PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. Immunology of breast milk. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 6, p. 584-593, 2016.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 345-364, 2013.

PARNELL, J. A.; REIMER, R. A. Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR: LA-cp rats. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 4, p. 601-613, 2012.

PEREZ-MUÑOZ, M. E. et al. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 48, 2017.

PLAZA-DÍAZ, J.; FONTANA, L.; GIL, A. Human milk oligosaccharides and immune system development. **Nutrients**, v. 10, n. 8, p. 1038, 2018.

POLO, M. "The Travels of Marco Polo. Translated by Henry Yule". **Medieval Source book**, London, Medieval Source book, 1920.

PRATICÒ, G. et al. Exploring human breast milk composition by NMR-based metabolomics. **Natural Product Research**. v. 28, n. 2, p. 95–101, 2014.

RADBILL, S. X. Infant feeding through the ages. **Clinical pediatrics**, v. 20, n. 10, p. 613–621, 1981.

RAY, C. et al. Human milk oligosaccharides: The journey ahead. **International journal of pediatrics**, v. 2019, 2019.

RINNINELLA, E. et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem Across Age, Environment, Diet, And Diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 2019.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S2, p. S1-S63, 2010.

RODRIGUEZ-PALMERO, M. et al. "Nutritional and Biochemical Properties of Human Milk: II: Lipids, Micronutrients, and Bioactive Factors". **Clinics in Perinatology**, v. 26, n. 2, p. 335–359, 1 jun. 1999.

ROGER, L. C. et al. Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast-and formula-fed infants during the first 18 months of life. **Microbiology**, v. 156, n. 11, p. 3329-3341, 2010.

ROSWALL, J. et al. Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life. **Cell host & microbe**, n. 29, v. 5, p. 765-776, 2021.

SALMINEN, S. et al. Infant formula supplemented with biotics: Current knowledge and future perspectives., **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 1–20, 2020.

SAMUEL, T. M. et al. Nutritional and non-nutritional composition of human milk is modulated by maternal, infant and methodological factors. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 172, 2020.

SÁNCHEZ-ZAPATA, E. et al. Resistant starch as prebiotic: A review. **Starch-Stärke**, v. 7, n. 63, p. 406-415, 2011.

SAVILLE, B. A., SAVILLE, S. H. Functional Attributes and Health Benefits of Novel Prebiotic Oligosaccharides Derived from Xylan, Arabinan, and Mannan. Prebiotics and Probiotics-Potential Benefits in Nutrition and Health. **IntechOpen**, 2019. Disponível em: https://www.intechopen.com/chapters/69385

SCHUMAN, A. J. A concise history of infant formula (twists and turns included). 2003. **Contemporary Pediatrics**. Disponível em: https://www.contemporarypediatrics.com/view/concise-history-infant-formula-twists-and-turns-included

SCOTT, K. P. et al. Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro. **FEMS microbiology ecology**, v. 87, n. 1, p. 30-40, 2014.

SEGURA, S. A. et al. La importancia de la nutrición materna durante la lactancia,¿ necesitan las madres lactantes suplementos nutricionales? In: **Anales de Pediatría**. p. 347. e1-347. e7, 2016.

SHOAF, K. et al. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic Escherichia coli to tissue culture cells., **Infection and Immunity**, v. 74, n. 12, p. 6920–6928, dez. 2006.

SKÓRKA, A. et al. Infant formulae supplemented with prebiotics: Are they better than unsupplemented formulae? An updated systematic review. **British Journal of Nutrition**, v. 119, n. 7, p. 810–825, 2018.

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1417-1435, 2013.

SMILOWITZ, J. T. et al. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. **Annual review of nutrition**, v. 34, p. 143-169, 2014.

STEWART, C. J. et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. **Nature**, v. 562, n. 7728, p. 583-588, 2018.

TAMBURINI, S. et al. The microbiome in early life: implications for health outcomes. **Nature medicine**, v. 22, n. 7, p. 713-722, 2016.

THURL, S. et al. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. **Nutrition Reviews**, v. 75, n. 11, p. 920-933, 2017.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823-1836, 2017.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C. M. et al. The human microbiome project. **Nature**, 449, n. 7164, p. 804-810, 2007.

TURRONI, F. et al. The infant gut microbiome as a microbial organ influencing host well-being, **Italian Journal of Pediatrics**, v. 46, n. 1, p. 1–13, 2020.

TURRONI, F. et al. The human gut microbiota during the initial stages of life: Insights from bifidobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 73, p. 81-87, 2022.

TZOUNIS, X. et al. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 93, n. 1, p. 62-72, 2011.

UNDERWOOD, M. A. et al. *Bifidobacterium* longum subspecies infantis: champion colonizer of the infant gut. **Pediatric research**, v. 77, n. 1, p. 229-235, 2015.

UNIVERDIDADE DE SÃO PAULO (**USP**), Edisciplinas, 2020.Dísponivel em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3275086/mod_resource/content/1/Pectinas_aditivos_e_ingredientes%20365.pdf#:~:text=A%20pectina%20comercial%20%C3%A9%20obtida,a%2015%25%20de%20pectina).&text=A%20estrutura%20b%C3%A1sica%20de%20todas,%CE%B1%2DD%2D%C3%A1cido%20galactur%C3%B4nico. Acesso em: dezembro de 2020.

VANDENPLAS, Y. et al. Human milk oligosaccharides: 2′-fucosyllactose (2′-FL) and lacto-N-neotetraose (LNnT) in infant formula. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1161, 2018.

VANDENPLAS, Y.; DE GREEF, E.; VEEREMAN, G. Prebiotics in infant formula. **Gut Microbes**, v. 5, n. 6, p. 681–687, 2015.

VARZAKAS, T. et al. Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods. 2018.

VATANEN, T. et al. Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 842-853, 2016.

VICTORA, C. G. et al. Association between breastfeeding and intelligence, educational attainment, and income at 30 years of age: a prospective birth cohort study from Brazil. **The lancet global health**, v. 3, n. 4, p. e199-e205, 2015.

WALKER, A. W. et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. **The ISME journal**, v. 5, n. 2, p. 220-230, 2011.

WICKES, I. G. A history of infant feeding. I. Primitive peoples; ancient works; Renaissance writers, **Archives of disease in childhood**, v. 28, n. 138, p. 151–158, 1953.

WICKES, I. G. A history of infant feeding. II. Seventeenth and eighteenth centuries, **Archives of disease in childhood**, v. 28, n. 139, p. 232–240, 1953.

WICKES, I. G. A history of infant feeding. III. Eighteenth and nineteenth century writers, **Archives of disease in childhood**, v. 28, n. 140, p. 332–340, 1953.

WILKINS, L. J; MONGA, M. M.; AARON , W. Defining Dysbiosis for a Cluster of Chronic Diseases. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 12918, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (**WHO**). Infant and young child feeding: model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals. **World Health Organization**, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (**WHO**). Safe Preparation, Storage and Handling of Powdered Infant Formula Guidelines, 2006. [acessado em 10 de janeiro de 2021]. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf

WORLD HEALTH ORGANIZATION (**WHO**). The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding: Report of an Expert Consultation. World Health Organization: Geneva, 2001.

XU, G. et al. Absolute quantitation of human milk oligosaccharides reveals phenotypic variations during lactation. **The Journal of nutrition**, v. 147, n. 1, p, 117-124, 2017.

YARON, S. et al. Effect of high β-palmitate content in infant formula on the intestinal microbiota of term infants., **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 376–381, 2013.

YOO, H. D.; KIM, D.; PAEK, S. H. Plant cell wall polysaccharides as potential resources for the development of novel prebiotics. **Biomolecules & therapeutics**, v. 20, n. 4, p. 371, 2012.

ZHANG, Chi, et al. The potential of proteins, hydrolysates and peptides as growth factors for Lactobacillus and Bifidobacterium: Current research and future perspectives. **Food & function,** v. 11, n. 3, p. 1946-1957, 2020.

Anexo 1

Data extraction form
Y (Yes), N (No) or Uk (Unknow)

Identification	
Study ID	
Title	
Author	
Settings	
Location	Language
Study name?	
Study design	Study duration and study data

Comments:
_____
_____

Participants	
Sample	
Number of repeated measures of stool	
Time (months) of each stool collection ( ) < 1 mo specify: _____ days ( ) 1 mo ( ) 2 mo ( ) 3 mo ( ) 4 mo ( ) 5 mo ( ) 6 mo ( ) >6mo	
Characteristics	
Gestational age ( ) Y ( ) N ( ) Uk Specify: _____	Use antibiotic (mother) ( ) Y ( ) N ( ) Uk Specify: _____ During: ( ) Prenatal ( ) Breastfeeding ( ) Uk Duration:_____ days
Type of delivery ( ) Vaginal (n) _____ ( ) caesarian section (n) _____ ( ) NI	
In Early solids intake (if yes exclude)	

Use antibiotic (child) ( ) Y ( ) N ( ) Uk	
Considered breastfeeding the analysis? ( ) Y ( ) N ( ) Uk Duration: _____months	
% breastfed: % not breastfed:	% mixed breastfed: % formula fed
Other foods ( ) Y ( ) N ( ) Uk Age: _____ Still breastfed? ( ) Y ( ) N ( ) Uk	
% breastfed:	% not breastfed:
Exposure	
Breastfed (n/percentage (%))	Standard Formula (n/percentage (%)):
Prebiotic Formula (n/percentage (%)):	
Outcomes	
Bacterial detection techniques ( ) DNA extraction and 16S rRNA gene sequencing ( ) DNA extraction and 16S rRNA gene amplification ( ) Culture-dependent and molecular methods ( ) Fluorescence in situ hybridization of bacterial cells ( ) Other _____	