

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Fisiopatologia

**Efeito da colostroterapia e do leite materno no estabelecimento da microbiota de recém-nascidos prematuros**

Ramon Vitor Cortez de Godoy

Tese para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientadora: Carla Taddei de Castro Neves

São Paulo

2021

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Fisiopatologia

**Efeito da colostroterapia e do leite materno no estabelecimento da microbiota de recém-nascidos prematuros**

Ramon Vitor Cortez de Godoy

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018

Tese para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientadora: Carla Taddei de Castro Neves

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

G588e Godoy, Ramon Vitor Cortez de  
Efeito da colostroterapia e do leite materno no estabelecimento da microbiota de recém-nascidos prematuros / Ramon Vitor Cortez de Godoy. - São Paulo, 2021.  
123 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Neves, Carla Taddei de Castro

1. Colostroterapia. 2. Prematuridade. 3. Microbiota Oral. 4. Microbiota Intestinal. 5. Leite Materno. I. T. II. Neves, Carla Taddei de Castro, orientador.

Ramon Vitor Cortez de Godoy

Efeito da colostroterapia e do leite materno no estabelecimento da microbiota de recém-nascidos prematuros

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof<sup>a</sup>. Carla Taddei de Castro Neves

Orientadora / presidente

---

1º. Examinador

---

2º. Examinador

---

3º. Examinador

---

4º. Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_, 2021.

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Maria Cristina Cortez de Godoy**,

Apesar desses longos anos sem você por perto, você está presente em tudo que eu faço. Sempre lembro dos momentos que passamos juntos, do seu jeito sagaz e seu espírito jovem. Foi um privilégio viver com você e nunca vou esquecer de tudo que você me ensinou. Onde estiver, saiba que mais essa etapa é fruto do seu esforço também. Tenho certeza de que um dia vamos nos encontrar novamente. Obrigado por tudo. Te amo para sempre!

Às minhas irmãs, **Thais e Denise**,

Por todo carinho, suporte e paciência que sempre tiveram comigo, por toda a cumplicidade, força e união que nós três temos, agora mais do que nunca.

Aos meus sobrinhos, **Gustavo, Diana e Cristiano**,

Vocês me mostram, a cada dia, um tipo de amor novo e diferente. Vocês me inspiram e me fazem ter esperança em um mundo melhor no futuro.

Ao amor da minha vida, **Leandro Lucena**,

Depois que eu te conheci, tudo na minha vida mudou. Esses 9 anos juntos foram mais do que especiais. Nunca imaginei que amaria e confiaria tanto em alguém como amo e confio em você.

Você é a razão por eu estar finalizando essa etapa na minha vida. Sem seu auxílio, suporte emocional e confiança eu não estaria aqui. Só nós sabemos o trabalho por trás de cada conquista.

Te amo e estarei sempre ao seu lado.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar este projeto.

Aos professores do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pela oportunidade, pelo apoio e incentivo, essenciais para a conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves, minha orientadora, pela amizade, paciência, dedicação, confiança, conhecimento compartilhado e por cada ensinamento no dia a dia. Tenho grande admiração por você como professora, cientista, microbiologista e mulher.

Ao Prof. Dr. Rubens Feferbaum, pelo suporte e incentivo à pesquisa, as oportunidades que foram oferecidas e atenção sempre que preciso.

À Dra. Andrea Penha Spínola Fernandes, diretora do Banco de Leite Humano do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto, por ser um exemplo de uma profissional que realmente gosta do que faz, pelas conversas agradáveis e pela confiança no meu trabalho.

À equipe de profissionais do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros, tanto médicos, enfermeiras, auxiliares e nutricionistas, no auxílio à coleta de amostras. Obrigado por sempre me receberem de maneira gentil e por tornarem esse trabalho possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro no desenvolvimento desse projeto. Número do processo: 2018/10612-7.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular, Pedro Augusto Ramos Vanzele, Brenda Custódio, Amanda Motta e Cilícia Nascimento, pelo companheirismo e pelos bons momentos. Em especial, agradeço meu amigo e colega de trabalho Luiz Gustavo Sparvoli, pois trabalhar com você foi um privilégio, toda sua ajuda e empenho fizeram a diferença. Nunca vou esquecer desse período que trabalhamos juntos.

## RESUMO

Cortez, R. V. **Efeito da colostroterapia e do leite materno no estabelecimento da microbiota de recém-nascidos prematuros.** 2021. 123 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A colonização inicial da microbiota humana é de suma importância, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento imunológico, nutricional, metabólico e neurológico. Recém-nascidos prematuros e de baixo peso muitas vezes precisam permanecer internados em unidades de terapia intensiva e frequentemente a dieta enteral trófica é limitada, devido à imaturidade do sistema digestivo ou estado clínico do recém-nascido. Nesse contexto, a amamentação é importante para o desenvolvimento do recém-nascido e para a colonização inicial do trato gastrointestinal. Além disso, a administração de colostro como imunoterapia oral já foi descrita como uma terapia segura, viável e bem tolerável por recém-nascidos. Sendo assim, este projeto avaliou o efeito da administração de leite materno, seja através da dieta ou colostroterapia, no desenvolvimento da microbiota oral e intestinal de recém-nascidos prematuros. Foi realizado um estudo longitudinal e observacional, onde foram recrutados 20 neonatos prematuros para a análise da microbiota oral e 56 para a análise da microbiota intestinal. Foram coletadas amostras de saliva e fezes dos neonatos, e leite materno das mães destes neonatos, e realizado sequenciamento do gene 16S rRNA destas amostras, além da dosagem de imunoglobulina A (IgA) nas fezes dos recém-nascidos. Para análise estatística, foi utilizado o software SPSS e R Studio, adotando significância de 5% para os testes. O leite materno de mães de recém-nascidos prematuros apresenta composição que muda ao longo do tempo, com aumento de *Staphylococcus* e *Streptococcus* e diminuição de *Corynebacterium 1*. A colostroterapia possui efeito benéfico sobre a microbiota oral, com aumento de gêneros como *Staphylococcus*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides*. Adicionalmente, existe diferença na microbiota intestinal quando diferentes proporções de leite materno são oferecidas durante a primeira semana de vida, além de maiores níveis de IgA total nas amostras de fezes de neonatos que receberam maiores proporções de leite materno.

**Palavras-chave:** Colostroterapia, prematuridade, microbiota oral, microbiota intestinal, leite materno.

## **ABSTRACT**

Cortez, R. V. **Effect of breast milk and oropharyngeal administration of colostrum on the establishment of the microbiota of preterm newborns**. 2021. 123 p. Thesis (Doctorate) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

The initial colonization of the human microbiota is of paramount importance, playing a fundamental role in immunological, nutritional, metabolic, and neurological development. Premature and low-birth-weight newborns often need to remain hospitalized in intensive care units and often enteral trophic diet is limited due to the immaturity of the digestive system or the newborn's clinical status. In this context, breastfeeding is important for the newborn's development and for the initial colonization of the gastrointestinal tract. Furthermore, the administration of colostrum as oral immunotherapy has been described as a safe, viable and well-tolerable therapy for newborns. Therefore, this project evaluated the effect of administering breast milk, either through diet or administration of colostrum, on the development of the oral and intestinal microbiota of preterm newborns. A longitudinal and observational study was carried out, where 20 premature neonates were recruited for the analysis of the oral microbiota and 56 for the analysis of the intestinal microbiota. Samples of saliva and feces were collected from the newborns, and breast milk from the mothers of these newborns, and 16S rRNA gene sequencing was performed from these samples, in addition to the dosage of immunoglobulin A (IgA) in the feces of the newborns. For statistical analysis, SPSS and R Studio software were used, adopting a significance of 5% for the tests. Breast milk from mothers of premature newborns has a composition that changes over time, with an increase in *Staphylococcus* and *Streptococcus* and a decrease in *Corynebacterium I*. Administration of colostrum has a beneficial effect on the oral microbiota, with an increase in genera such as *Staphylococcus*, *Bifidobacterium* and *Bacteroides*. Additionally, there is a difference in the intestinal microbiota when different proportions of breast milk are offered during the first week of life, in addition to higher levels of total IgA in stool samples from newborns who received higher proportions of breast milk.

**Keywords:** Administration of colostrum, prematurity, oral microbiome, gut microbiome, breast milk.

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

TGI	Trato gastrointestinal
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UTINN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor - Alpha</i>
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
IL-10	Interleucina-10
FCH	Fator de Crescimento de Hepatócitos
OLM	Oligossacarídeos do Leite Materno
WHO	<i>World Health Organization</i>
mL	Mililitros
IgM	Imunoglobulina M
BLH	Banco de Leite Humano
$\mu$ L	Microlitros
USP	Universidade de São Paulo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
pH	potencial Hidrogeniônico
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	Ácido clorídrico
RNA	Ácido ribonucleico
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

pb pares de base

ASV *Amplicon Sequencing Variant*

QIIME *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*

IgA Imunoglobulina A

ELISA *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

SPSS *Statistical Package for the Social Sciences*

GzLM *Generalized Linear Model*

GEE *Generalized Estimating Equations*

IDF Faith Índice de Diversidade Filogenética de Faith

QIC *Quasi likelihood under Independence Criterion*

GAMLSS- *Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape with a zero*  
BEZI *inflated beta family*

sIgA Imunoglobulina A secretora

FDR *False discovery rate*

PCoA *Principal Coordinates Analysis*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Relação dos dados descritivos das mães doadoras de leite materno (n=28).....	25
<b>Tabela 2.</b> Relação dos principais gêneros bacterianos encontrados nas amostras de leite materno entre o 1º ao 10º dia após o nascimento (n=28).....	27
<b>Tabela 3.</b> Avaliação dos índices de Alfa diversidade nas amostras de leite materno de mães de recém-nascidos prematuros (n=28).....	29
<b>Tabela 4.</b> Análise da beta diversidade considerando as amostras de leite materno com o passar do tempo.....	31
<b>Tabela 5.</b> Comparação dos dados descritivos entre os grupos (n=20).....	33
<b>Tabela 6.</b> Porcentagem de colostroterapia e dieta oral administrada na 1ª semana de vida (n=20).....	34
<b>Tabela 7.</b> Porcentagem de colostroterapia e dieta oral administrada após a 1ª semana de vida (n=19).....	35
<b>Tabela 8.</b> Comparação entre os principais gêneros bacterianos entre os grupos com o passar do tempo (n=20).....	37
<b>Tabela 9.</b> Índices de alfa diversidade considerando a interação entre grupo/tempo (n=20)....	40
<b>Tabela 10.</b> Análise da beta diversidade considerando a diferença entre os grupos (AC e CP).....	43
<b>Tabela 11.</b> Análise de beta diversidade considerando a diferença ao longo do tempo, dentro dos grupos (AC e CP).....	43
<b>Tabela 12.</b> Comparação dos dados descritivos entre os grupos de acordo com a porcentagem de aleitamento durante a primeira semana de internação (n=55).....	47
<b>Tabela 13.</b> Porcentagem de aleitamento enteral durante os sete primeiros dias de vida (n=55).....	48
<b>Tabela 14.</b> Porcentagem de aleitamento enteral após a 1ª semana de vida (n=36).....	49
<b>Tabela 15.</b> Comparação entre os principais gêneros bacterianos intestinais observados no T0 (n=55).....	50
<b>Tabela 16.</b> Comparação entre os principais gêneros bacterianos intestinais observados em T1 (n=55).....	51
<b>Tabela 17.</b> Comparação entre os principais gêneros bacterianos intestinais observados em T2 (n=55).....	52

<b>Tabela 18.</b> Comparação entre os principais gêneros bacterianos intestinais observados em T3 (n=55).....	53
<b>Tabela 19.</b> Comparação entre os principais gêneros bacterianos no grupo com menos de 50% de aleitamento com o passar do tempo (n=9).....	57
<b>Tabela 20.</b> Comparação entre os principais gêneros bacterianos nos grupos com o passar do tempo (n=19).....	59
<b>Tabela 21.</b> Comparação entre os principais gêneros bacterianos no grupo com mais de 75% de aleitamento com o passar do tempo (n=27).....	61
<b>Tabela 22.</b> Índices de Alfa diversidade considerando a interação entre grupo/tempo (n=55).....	63
<b>Tabela 23.</b> Análise da Beta diversidade nas amostras fecais considerando a diferença entre os grupos (A, B e C) nos tempos.....	65
<b>Tabela 24.</b> Análise de beta diversidade nas amostras fecais considerando a diferença ao longo do tempo, dentro dos grupos (A, B e C).....	67
<b>Tabela 25.</b> Nível de IgA encontrado nas amostras de fezes dos neonatos com o passar do tempo.....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Linha do tempo.....	12
<b>Figura 2.</b> Fluxograma do processo de coleta.....	17
<b>Figura 3.</b> Fluxograma das amostras de leite incluídas para análise.....	24
<b>Figura 4.</b> Relação dos principais gêneros bacterianos encontrados nas amostras de leite materno com o passar do tempo.....	26
<b>Figura 5.</b> Índices de Alfa diversidade das amostras de leite materno com o passar do tempo.....	28
<b>Figura 6.</b> Beta diversidade nas amostras de leite materno.....	30
<b>Figura 7.</b> Fluxograma relacionando o processo de inclusão dos recém-nascidos prematuros direcionados para avaliação do microbiota oral.....	31
<b>Figura 8.</b> Relação dos principais gêneros bacterianos encontrados nas amostras orais ao longo do tempo.....	36
<b>Figura 9.</b> Índices de Alfa diversidade em relação ao tempo nas amostras orais.....	41
<b>Figura 10.</b> Beta diversidade entre os grupos ao longo do tempo.....	42
<b>Figura 11.</b> Beta diversidade considerando a diferença ao longo do tempo, dentro dos grupos.....	44
<b>Figura 12.</b> Fluxograma do processo de coleta das amostras fecais.....	45
<b>Figura 13.</b> Relação dos principais gêneros observados na população ao longo do tempo.....	49
<b>Figura 14.</b> Relação dos principais gêneros bacterianos observados nos grupos e nos tempos.....	54
<b>Figura 15.</b> Relação dos principais gêneros bacterianos observados no grupo com menos de 50% de aleitamento considerando os momentos de avaliação.....	56
<b>Figura 16.</b> Relação dos principais gêneros bacterianos observados no grupo entre 50-75% de aleitamento considerando os momentos de avaliação.....	58
<b>Figura 17.</b> Relação dos principais gêneros bacterianos observados no grupo com mais de 75% de aleitamento considerando os momentos de avaliação.....	60
<b>Figura 18.</b> Índices de Alfa diversidade entre os grupos nos tempos.....	64
<b>Figura 19.</b> Beta diversidade entre os grupos nos tempos.....	66
<b>Figura 20.</b> Beta diversidade nos grupos e nos tempos.....	68

<b>Figura 21.</b> Nível de IgA total nos grupos e nos tempos.....	69
<b>Figura suplementar 1.</b> Gráfico Q-Q plot em relação aos resíduos de aderência dos índices de Alfa diversidade para análise das amostras de leite materno.....	98
<b>Figura suplementar 2.</b> Gráfico Q-Q plot em relação aos resíduos de aderência dos índices de Alfa diversidade para análise da microbiota oral.....	99
<b>Figura suplementar 3.</b> Gráfico Q-Q plot em relação aos resíduos de aderências dos índices de Alfa diversidade para análise da microbiota intestinal.....	100

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>9</b>
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>10</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
4.1.	Objetivo Geral .....	11
4.2.	Objetivos específicos .....	11
<b>5.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
5.1.	Aspecto ético .....	12
5.2.	População de estudo .....	12
5.3.	Protocolo experimental.....	13
5.4.	Pasteurização .....	14
5.5.	Estabelecimento de grupos de comparação .....	15
5.6.	Coleta de amostras.....	17
5.6.1.	Amostras de fezes dos recém-nascidos .....	17
5.6.2.	Amostras de leite materno.....	18
5.6.3.	Amostras de saliva dos recém-nascidos .....	18
5.7.	Extração de DNA.....	19
5.8.	Sequenciamento das amostras .....	20
5.8.1.	Amplificação do domínio V4 do gene 16S <i>rRNA</i> .....	20
5.8.2.	Amplificação do domínio V3-V4 do gene 16S <i>rRNA</i> .....	21
5.9.	Análise da microbiota por ferramentas de bioinformática .....	22
5.10.	Análise de IgA .....	22
5.11.	Análise estatística.....	22
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
6.1.	Leite materno .....	25
6.1.1.	Dados descritivos .....	25
6.1.2.	Abundância relativa.....	26
6.1.3.	Alfa Diversidade .....	29
6.1.4.	Beta Diversidade .....	31
6.2.	Microbiota Oral .....	32

6.2.1.	Dados descritivos .....	33
6.2.2.	Alimentação por via oral .....	34
6.2.3.	Abundância relativa.....	36
6.2.4.	Alfa Diversidade .....	39
6.2.5.	Beta Diversidade .....	42
6.3.	Microbiota Intestinal.....	46
6.3.1.	Dados descritivos .....	47
6.3.2.	Alimentação enteral.....	49
6.3.3.	Abundância relativa.....	50
6.3.4.	Alfa Diversidade .....	63
6.3.5.	Beta Diversidade .....	66
6.3.6.	Análise de IgA total nas fezes .....	70
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>10.</b>	<b>MATERIAL SUPLEMENTAR .....</b>	<b>99</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>102</b>
	Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.....	102
	Anexo 2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros.....	106
	Anexo 3. Termo de Consentimento Livre Esclarecido. ....	109
	Anexo 4. Ficha de coleta de dados .....	112
<b>12.</b>	<b>DOCUMENTOS ADICIONAIS .....</b>	<b>115</b>
12.1.	Ficha do aluno.....	115
12.2.	Currículo Lattes atualizado .....	118

## 1. INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) humano é um ecossistema complexo onde ocorrem diversas interações, sejam elas entre bactérias, bactérias-hospedeiro, bactérias-nutrientes e nutrientes-hospedeiro. A quantidade de bactérias que habitam o intestino é cerca de dez vezes maior do que o número de células do organismo humano (CLEMENTE et al., 2012). A microbiota intestinal humana, compilação de material genético que habita esse ecossistema, compreende um amplo ambiente simbiote de microrganismos que colonizam o trato gastrintestinal, da boca ao intestino, e contém cem vezes mais genes do que o genoma humano (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2016). Sabe-se hoje que estes microrganismos desempenham papel fundamental no metabolismo humano, sistema imune, sistema neurológico e nutricional, podendo ainda prevenir doenças (ARRIETA et al., 2015; EVANS; MORRIS; MARCHESI, 2013; GALLAND, 2014; SINGH et al., 2017).

A colonização tem início na vida intrauterina, através do líquido amniótico, membranas uterinas e mecônio (GOSALBES et al., 2013; MARTIN et al., 2016), contribuindo para o desenvolvimento da microbiota oral neonatal que colonizará o restante do trato gastrointestinal (SWEENEY et al., 2018). Desta forma, acredita-se que membros da microbiota materna possam ser transferidos para o feto pela corrente sanguínea, inviabilizando a teoria do nascimento estéril. No entanto, essa via de colonização ainda é discutida (PEREZ-MUÑOZ et al., 2017). Estudos nos últimos anos relatando que a colonização pode ser iniciada no útero (ANTONY et al., 2015; COLLADO et al., 2016) foram objeto de intenso debate e criticados por potencial contaminação (DE GOFFAU et al., 2019; THEIS et al., 2019). Estudo recente, publicado em 2021, concluiu que a colonização intestinal fetal de bebês saudáveis a termo não ocorre antes do nascimento e que os perfis microbianos do mecônio neonatal refletem as populações adquiridas durante e após o nascimento (KENNEDY et al., 2021). Ainda faltam mais trabalhos

para que de fato se comprove onde de fato se inicia a colonização, portanto, ainda há espaço para discussão neste tópico.

Ao nascimento, o parto natural, no qual o recém-nascido tem contato direto com o epitélio vaginal da mãe, é fundamental para o desenvolvimento da colonização gastrointestinal (MARTIN et al., 2016). Evidências mostram que fatores maternos, como tipo de parto e regime alimentar durante a gestação, influenciam diretamente no desenvolvimento do ambiente intestinal e na composição da microbiota oral nos recém-nascidos (ADLERBERTH; WOLD, 2009; ZAURA et al., 2014). Além disso, fatores ambientais pós-parto, como tipo de alimentação, contaminação ambiental e uso ou não de medicamentos são igualmente cruciais no desenvolvimento da microbiota do neonato (TADDEI; BRANDT; CARNEIRO-SAMPAIO, 2015).

Atualmente, já se sabe que os primeiros 1000 dias de vida (da concepção até o segundo ano de vida) são essenciais para a saúde do bebê. Dessa forma, complicações que venham a ocorrer neste período, sejam elas intercorrências alimentares ou o uso de medicamentos, apresentam um impacto disbiótico na microbiota intestinal do recém-nascido, com possíveis consequências na vida adulta, através de manifestações inflamatórias, entre elas obesidade, diabetes, alergias e doenças atópicas (WOPEREIS et al., 2014).

Os primeiros gêneros bacterianos que colonizam o trato gastrointestinal apresentam uma função regulatória da consequente colonização, visto que podem modular a expressão gênica das células epiteliais e deixar o ambiente favorável para o seu crescimento, prevenindo o crescimento de bactérias introduzidas posteriormente. Dessa forma, a colonização inicial do intestino possui um papel importante no processo de escolha de diversos gêneros bacterianos, e consequentemente pode trazer consequências em longo prazo (GRITZ; BHANDARI, 2015).

De maneira geral, em bebês saudáveis e a termo, as bactérias anaeróbias facultativas, como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são as primeiras

bactérias a colonizarem o trato gastrointestinal do recém-nascido, devido ao elevado teor de oxigênio que existe inicialmente. À medida que estas bactérias consomem o oxigênio, o meio se torna mais adequado para as bactérias anaeróbias estritas, como *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium* (PALMER et al., 2007). Posteriormente, a composição da microbiota intestinal se torna mais estável e a comunidade bacteriana normal do adulto é alcançada até os dois primeiros anos de vida, sendo os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* dominantes característicos (MATAMOROS et al., 2013; MEEHAN; BEIKO, 2014).

Por conseguinte, evidências já demonstraram como a amamentação pode auxiliar no desenvolvimento da microbiota oral e intestinal de recém-nascidos. Estudo realizado por Pannaraj e colaboradores (2017) com recém-nascidos a termo, observou que a comunidade bacteriana do leite materno é transferida para o intestino do bebê, influenciando o estabelecimento da microbiota e desenvolvimento do recém-nascido (PANNARAJ et al., 2017). Adicionalmente, estudo realizado por Holgerson et al. (2013) identificou que existe diferença na microbiota observada na boca de lactentes amamentados com leite materno em relação aos alimentado com fórmula infantil, com três meses de idade (HOLGERSON et al., 2013).

Acredita-se que o leite materno possa promover um estado de ativação imune importante para o equilíbrio e interação dos microrganismos com o epitélio intestinal (GROER et al., 2015). O leite materno também possui função protetora durante o início da vida, onde é uma das principais fontes de nutrição para o recém-nascido e contribui para as defesas imunológicas e para a integridade da barreira intestinal, que, neste contexto, ainda é imatura (STOCKINGER; HORNEF; CHASSIN, 2011).

A composição da microbiota oral em neonatos é um fator importante para a saúde e desenvolvimento da imunidade, visto que mudanças nessa comunidade podem predispor ao aparecimento de infecções ou doenças no início da vida (NEU, 2016; RAUTAVA, 2016). Diferentemente da microbiota oral de adultos, que se apresenta estável, a microbiota oral do

recém-nascido é mais dinâmica e influenciada pela alimentação oferecida nos primeiros meses de vida (AL-SHEHRI et al., 2016). Neste contexto, a amamentação tem papel fundamental, fornecendo citocinas reguladoras, fatores de crescimento e diversos outros componentes que atuam prevenindo infecções e apoiando o crescimento de bactérias benéficas, regulando dessa forma as interações bactéria- hospedeiro (LEBOUDER et al., 2006). Durante a amamentação, ocorrem à transferência de diversos gêneros bacterianos do leite materno para a mucosa intestinal do bebê, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (GROER et al., 2015; MURPHY et al., 2017).

Em estudo realizado por Martin e colaboradores (MARTIN et al., 2016), foi avaliada a microbiota intestinal ao longo dos seis primeiros meses de vida de bebês amamentados exclusivamente com leite materno, dieta mista (leite materno e fórmula infantil) e dieta exclusiva com fórmula infantil. Observaram que recém-nascidos expostos a fórmula infantil apresentaram maior frequência de *Enterococcus*, *Clostridium coccoides* e *Clostridium leptum*, comparados a recém-nascidos de amamentação exclusiva de leite materno, as quais apresentaram menor prevalência de *Clostridium perfringens*. É sabido que existe diferença na microbiota intestinal de crianças de amamentação exclusiva de leite materno em comparação a crianças que recebem fórmulas infantis, pois fórmulas infantis ou leites industrializados não são capazes de substituir todos os componentes proporcionados pelo leite materno humano. Outro estudo com a mesma população observou que recém-nascidos prematuros que recebiam fórmula infantil ou poucas doses de leite materno apresentavam aumento da permeabilidade intestinal, o que está relacionado ao desenvolvimento de doenças (RODRIGUEZ et al., 2010).

Como mencionado, o leite materno é responsável pela transferência de alguns gêneros bacterianos benéficos ao recém-nascido, além de transferir oligossacarídeos, imunoglobulinas, proteínas, como lisozima e lactoferrina, fatores de crescimento e citocinas (BÖTTCHER; JENMALM; BJÖRKSTÉN, 2003; CLAUD; SAVIDGE; WALKER, 2003; FROST et al., 2014;

LÖNNERDAL, 2013; WANG et al., 2015). A quantidade de cada componente, entretanto, muda ao longo da maturação do leite humano, período dividido em colostro, leite de transição e leite maduro. Sabe-se que o colostro, produzido entre o primeiro e terceiro dia de lactação, possui altas concentrações destes componentes quando comparado ao leite maduro (FROST et al., 2014; TURIN et al., 2017). Além disso, a composição do leite materno é diferente em mães de recém-nascidos prematuros e a termo (ALBENZIO et al., 2016; CASTELLOTE et al., 2011), se adequando à necessidade do neonato.

Diversos trabalhos descrevem a importância da amamentação para prevenir o desenvolvimento de doenças, como: displasia broncopulmonar (PATEL et al., 2017) e enterocolite necrosante (JOHNSON et al., 2015), além de diminuir a mortalidade (CORPELEIJN et al., 2012) e sepse em unidades de terapia intensiva neonatal (UTINN) (PATEL et al., 2013). Khodayar-Pard e colaboradores, no ano de 2014, avaliaram alguns gêneros bacterianos presentes no leite materno de mães de recém-nascidos prematuros e a termo. Neste estudo, o autor observou que o leite de mães de recém-nascidos prematuros possuía maior prevalência de *Bifidobacterium* sp e de *Enterococcus* sp em relação ao leite de mães de recém-nascidos a termo (KHODAYAR-PARDO et al., 2014). A presença de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* na microbiota intestinal inicial de neonatos é dita como ideal e saudável. Estes gêneros são capazes de ativar a produção de imunoglobulina A (IgA), através da fermentação de oligossacarídeos provenientes do leite materno e produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), os quais auxiliam o desenvolvimento do sistema de defesa (WALKER, 2010). Em adultos, a microbiota intestinal normalmente produz cerca de 50–100 mmol/L-1 por dia de AGCC, como os ácidos acético, propiônico e butírico, os quais são rapidamente absorvidos ou utilizados como fonte de energia pelo epitélio intestinal do hospedeiro (DUNCAN et al., 2009). Dessa forma, estudos recentes mostraram que os metabólitos microbianos do intestino têm efeitos sistêmicos por meio de sua ação imune na sinalização e

regulação da expressão gênica (KOH et al., 2016; MORRISON; PRESTON, 2016), sendo associados ao controle de doenças inflamatórias e alérgicas (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 2016; RICHARDS et al., 2016).

Para recém-nascidos prematuros e/ou de baixo peso, nem sempre é possível a alimentação com o leite da própria mãe. Neste caso, a opção lógica é a alimentação com leite pasteurizado de doadora (WAGNER; HANSON; ANDERSON BERRY, 2013). A pasteurização do tipo Holder, tratamento térmico onde o leite é colocado a 62,5° por 30 minutos, visa à inativação de todos os microrganismos patogênicos presentes no leite, assim como grande parte da microbiota (ANVISA, 2008). Além disso, o processo de pasteurização também promove a inativação de alguns componentes celulares presentes no leite materno, como, por exemplo, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e o fator de crescimento de hepatócitos (FCH) (EWASCHUK et al., 2011); porém, a concentração de oligossacarídeos do leite materno (OLMs) não é alterada pelo processo de pasteurização (BERTINO et al., 2008). Sabe-se que a presença de OLMs, um grupo de mais de 200 tipos de açúcares não-digeríveis, é extremamente importante para o desenvolvimento do recém-nascido (GERMAN et al., 2008) e que o leite de mães de recém-nascidos prematuros possui maiores concentrações de OLMs em comparação com o leite de mães de recém-nascidos a termo no primeiro mês de vida (GABRIELLI et al., 2011).

Os OLMs não fornecem valor nutricional direto para o recém-nascido, visto que somente uma pequena parte é absorvida pelo epitélio intestinal (BODE, 2012). Dessa forma, os OLMs agem como substratos para bactérias comensais do intestino, agindo como prebióticos e estimulando o crescimento de uma comunidade microbiana benéfica (BODE, 2012; CHICHLOWSKI et al., 2011). No caso de lactentes amamentados com fórmula infantil, percebe-se que a composição da microbiota intestinal difere em relação a lactentes

amamentados com leite materno cru ou pasteurizado, pois fórmulas infantis não possuem OLMs em sua composição (DE FILIPPO et al., 2010).

Estudos recentes observaram que crianças amamentadas com leite pasteurizado de doadora apresentam ganho de peso mais lento ou necessidade de fortificação do leite (QUIGLEY; EMBLETON; MCGUIRE, 2018; UNDERWOOD, 2013); entretanto, apresentam menor incidência de distúrbios intestinais graves, enterocolite necrosante e outras infecções durante a internação hospitalar (BOYD; QUIGLEY; BROCKLEHURST, 2007; MCGUIRE; ANTHONY, 2003; NARAYANAN et al., 1984). Esse dado é corroborado por uma revisão sistemática, que avaliou o efeito da alimentação com fórmula comparada com o leite materno de doadora no crescimento e desenvolvimento de prematuros ou recém-nascidos de baixo peso, evidenciando que a alimentação com fórmula comparada com o leite materno de doadora está associada a taxas de crescimento mais rápidas, mas com quase o dobro do risco de desenvolver enterocolite necrosante (QUIGLEY; EMBLETON; MCGUIRE, 2018). Além disso, atualmente a Organização Mundial de Saúde recomenda o uso de leite pasteurizado de doadora para recém-nascidos de baixo peso para os casos onde não há disponibilidade do leite da própria mãe (WHO, 2018).

Neonatos prematuros ou de baixo peso ao nascimento permanecem algum tempo internados em UTINN e, muitas vezes, a administração de dieta enteral trófica é limitada em consequência da imaturidade do sistema digestivo ou estado clínico do recém-nascido. Diante dos benefícios imunológicos do fornecimento do colostro materno, técnicas alternativas de administração foram adotadas, entre elas, a colostroterapia. A colostroterapia é uma terapia imune oral onde ocorre a administração orofaríngea do colostro, em que uma pequena quantidade de leite é colocada na mucosa oral para absorção através de um cotonete esterilizado ou aplicador oral (GEPHART; WELLER, 2014). Constituintes do colostro são capazes de promover maturação das células intestinais (LÖNNERDAL, 2013), instalação de gêneros

benéficos na microbiota intestinal (DAMACENO et al., 2017) e células de defesa contra bactérias patogênicas (BÖTTCHER; JENMALM; BJÖRKSTÉN, 2003). De acordo com uma meta-análise publicada em 2020, os protocolos de colostroterapia administram 0,2 mL de colostro materno, com um tempo de protocolo variando de 24 horas após o nascimento até 7 dias de vida, e intervalo de administração variando de 2 a 6 horas para cada administração de colostro (TAO et al., 2020). Adicionalmente, em revisão sistemática realizada por Panchal e colaboradores (2019), foi observado que as intervenções de colostroterapia tem duração de ao menos 46 horas consecutivas, dentro da primeira semana de vida dos recém-nascidos (PANCHAL; ATHALYE-JAPE; PATOLE, 2019).

A colostroterapia é uma prática segura, viável e bem tolerada até mesmo pelos menores prematuros (RODRIGUEZ et al., 2010) e evidências preliminares defendem o efeito da colostroterapia em reduzir o tempo de alimentação enteral total (GEPHART; WELLER, 2014). Em 2015, Lee e colaboradores estudaram os efeitos imunológicos da colostroterapia em prematuros extremos. Neste estudo, além do aumento de IgA secretora nos prematuros submetidos à colostroterapia, houve menor incidência de sepse clínica (LEE et al., 2015). Outro estudo, publicado em 2019, acompanhou 100 recém-nascidos prematuros extremos durante o primeiro mês de vida para observar o efeito da administração orofaríngea do colostro nos níveis séricos de imunoglobulinas, lactoferrina e resistina. Observaram que os níveis de IgA, IgM e resistina aumentaram no grupo que recebeu colostro após 15 e 30 dias e os níveis de lactoferrina aumentaram após 30 dias da administração, em comparação ao grupo que não recebeu colostro (MORENO-FERNANDEZ et al., 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

A colonização inicial da microbiota humana é de suma importância, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento imunológico, nutricional, metabólico e neurológico. Perda de bactérias simbiotes intestinais devido à nutrição parenteral, alimentação enteral retardada, tratamentos prolongados com antibióticos no ambiente da UTINN levam a uma colonização anormal do intestino e aumentam o risco de infecções. Neonatos prematuros e/ou com baixo peso ao nascer também são expostos a esses fatores ambientais, associados a diferentes práticas alimentares. Esse contexto configura um padrão delicado de interação com microrganismos intestinais e pode implicar em intercorrências. Nesse contexto, medidas de prevenção de intercorrências clínicas são necessárias em ambientes hospitalares. A amamentação é importante para o desenvolvimento do recém-nascido e para a colonização inicial do intestino. A administração de colostro como imunoterapia oral já foi descrita como uma terapia segura, viável e bem tolerável por recém-nascidos. Os benefícios clínicos dessa prática são associados à melhora imunológica e no perfil bacteriano. Além disso, o tempo para atingir o volume de alimentação enteral é menor nos grupos tratados com colostro. Apesar do desfecho clínico relacionado a essa prática, o número de estudos sobre os efeitos da terapia com colostro na microbiota oral de recém-nascidos prematuros ainda é escasso, assim como estudos que observem o efeito de diferentes proporções de leite materno na microbiota intestinal dessa população.

### 3. HIPÓTESE

**H<sub>0</sub> - 1:** A primeira hipótese nula do presente estudo é que a colostroterapia não tem efeito benéfico na composição da microbiota oral de recém-nascidos prematuros.

**H<sub>0</sub> - 2:** A segunda hipótese nula do presente estudo é que maiores porcentagens de leite materno na primeira semana de vida não apresentam diferença em relação a menores porcentagens de leite materno na microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros.

**H<sub>a</sub> - 1:** A primeira hipótese alternativa do presente estudo é que a colostroterapia apresenta efeito benéfico na composição da microbiota oral de recém-nascidos prematuros.

**H<sub>a</sub> - 2:** A segunda hipótese alternativa do presente estudo é que maiores porcentagens de leite materno na primeira semana de vida apresentam diferença em relação a menores porcentagens de leite materno na microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

O presente estudo tem como objetivo investigar o efeito da administração de leite materno no desenvolvimento da microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros, assim como observar o impacto da administração orofaríngea de colostro na microbiota oral desta população.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Examinar como a composição da microbiota do leite materno muda nos 10 primeiros dias após o parto.
- Avaliar e comparar a composição microbiana de amostras de saliva de recém-nascidos submetidos ou não à colostroterapia;
- Observar o efeito da colostroterapia na microbiota oral de recém-nascidos prematuros com o passar do tempo;
- Avaliar e comparar a composição da microbiota intestinal em neonatos prematuros que receberam diferentes proporções de leite materno nos primeiros sete dias após o nascimento;
- Observar o efeito de diferentes proporções de leite materno na microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros com o passar do tempo;
- Avaliar como o IgA total das amostras de fezes muda ao longo do tempo em relação a diferentes proporções de leite materno;

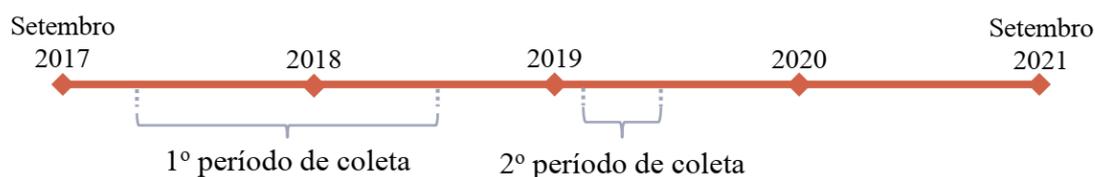
## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Aspecto ético

Após receberem informações detalhadas por escrito sobre a natureza, objetivos, procedimentos, riscos e relevância do estudo, as mães dos neonatos que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 3). Os procedimentos foram conduzidos de acordo com a Declaração de Helsinque e as normas éticas do Ministério da Saúde (Conselho Nacional de Saúde - Resolução nº 466/2012). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros (CAAE: 76151717.0.3001.0063) (Anexo 2) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CAAE: 76151717.0.0000.0067) (Anexo 1).

### 5.2. População de estudo

Este estudo longitudinal e observacional aconteceu em dois momentos distintos. Sendo assim, no 1º período de coleta, que ocorreu entre Outubro de 2017 e Junho de 2018, mães de recém-nascidos prematuros que aceitaram participar do estudo forneceram amostras de leite materno e de fezes de seus filhos. O 2º momento ocorreu entre Março e Junho de 2019 e amostras de saliva de recém-nascidos prematuros foram coletadas, após o consentimento de seus responsáveis. A Figura 1 ilustra a linha temporal destes eventos. Em ambos os períodos, o estudo acompanhou a rotina de tratamento destes recém-nascidos no Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros, São Paulo (SP), nascidos em situação de prematuridade, entre 28 e 35 semanas de gestação (WHO, 2018).



**Figura 1.** Linha do tempo

Além disso, foram aceitos neonatos que não apresentaram malformações ou síndromes genéticas, assim como qualquer outro tipo de anomalia. Os neonatos foram recrutados nas primeiras horas após o parto, ao serem admitidos na UTIN e estabilizados. Dessa forma, ao recrutarmos um neonato para o estudo, no mesmo momento as mães foram abordadas para participar da pesquisa.

Como critérios para não inclusão:

- Neonatos prematuros extremos, com idade gestacional menor que 28 semanas;
- Neonatos com doenças renais, gastrointestinais, cardíacas e pulmonares;
- Neonatos com malformação congênita;
- Mães com histórico de abuso de substâncias durante a gestação, com diabetes pré-existente (tipo 1, tipo 2 ou Diabetes Mellitus Gestacional), portadoras de doenças crônicas autoimunes, tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, febre reumática, entre outras;
- Mães portadoras de infecções agudas ou crônicas, como HIV e hepatite;
- Mães com transplante de órgãos sólidos.

Durante o período de acompanhamento, foram excluídas amostras de recém-nascidos que foram a óbito.

### **5.3. Protocolo experimental**

Nos recém-nascidos incluídos no estudo foi observada a dieta alimentar e o uso da colostroterapia como procedimento para estímulo imunológico. Os prontuários dos neonatos foram verificados para coletar informações sobre a saúde e dados gerais maternos, tempo e frequência da colostroterapia, tipo de colostroterapia (com leite cru, com leite pasteurizado ou mista), possíveis intercorrências durante a internação hospitalar e a dieta que foi administrada ao recém-nascido diariamente até o dia da alta hospitalar.

Em relação à rotina alimentar, o protocolo do hospital estabelece uma frequência alimentar a cada 3 horas (8 vezes por dia). Neste contexto, a ingestão de nutrientes pode ser por via oral e/ou orogástrica com o uso de leite materno cru, leite materno pasteurizado e fórmula infantil. O Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros recebeu o selo de hospital amigo da criança desde 2000 e possui o banco de leite humano (BLH) referência para sua região (zona leste da cidade de São Paulo). Além disso, o hospital é referência na prestação de assistência em obstetrícia, ginecologia e neonatologia e valoriza a ingestão de leite materno durante o período de internação dos neonatos.

A colostroterapia é uma terapia imune oral direcionada para os neonatos prematuros internados na UTINN), selecionados pelos médicos do banco de leite do hospital, cujo protocolo pode variar conforme o hospital. Neste estudo, a prática foi prescrita pela equipe médica da UTINN, iniciando entre as primeiras 24-48 horas de vida e prosseguindo por, ao menos, 72 horas consecutivas (3 dias). Foi administrado 0,2 mL de colostro em seringa de 1mL, o qual foi instilado na cavidade oral do recém-nascido de 3/3 h. Durante internação materna, foi ordenhado o colostro no banco de leite humano (BLH). Caso a mãe não tivesse condições de sair do leito, a equipe do BLH realizou a ordenha do colostro na unidade de internação materna e posteriormente levou o colostro ordenhado até a UTINN em cadeia de frio. Na ausência do leite da própria mãe, foi administrado leite pasteurizado proveniente do BLH.

#### **5.4. Pasteurização**

O método de pasteurização utilizado foi o *holder*, como preconizado pela Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano. O método de pasteurização *holder* consiste em tratamento térmico, conduzido a 62,5 °C por 30 minutos, aplicado ao leite humano ordenhado, com o objetivo de inativar 100% dos microrganismos patogênicos e 99,99% da microbiota saprófita, equivalendo a um tratamento 15°D para inativação térmica da *Coxiella burnetti* (ALMEIDA, 2007).

## **5.5. Estabelecimento de grupos de comparação**

Por se tratar de uma amostra de conveniência de um estudo observacional, a equipe de pesquisa não teve participação na escolha, prescrição e administração tanto do protocolo de colostroterapia, quanto da dieta dos recém-nascidos. Adicionalmente, por ser tratar de um projeto com múltiplos objetivos, para cada tipo de amostra foram estabelecidos diferentes grupos de comparação. Neste sentido, para observar se houve diferença no padrão e no desenvolvimento longitudinal da microbiota intestinal de recém-nascidos, optou-se por considerar o padrão alimentar destes neonatos nos sete primeiros dias de vida. Além disso, os recém-nascidos incluídos no primeiro período de coleta não receberam o protocolo de colostroterapia pelas horas consecutivas estipuladas pelo estudo; dessa forma, a avaliação foi realizada independente do uso de colostroterapia nesta população. Dessa forma, foi coletada a primeira amostra de fezes do recém-nascido (entre 1 e 3 dias de vida), uma amostra de fezes após a primeira semana de vida (variando entre 6 e 10 dias), uma amostra de fezes entre o 15º e o 22º dia de vida e uma amostra após o 22º dia de vida, para os neonatos que ainda estavam internados até esse momento. Sendo assim, os neonatos participantes foram divididos em 3 grupos:

- Neonatos que receberam menos de 50% de alimentação enteral com leite materno (seja por via oral ou por sonda orogástrica) considerando o número de possíveis administrações de dieta. Por consequência, este grupo permaneceu por um maior período e jejum.
- Neonatos que receberam ente 50-75% de alimentação enteral com leite materno (seja por via oral ou por sonda orogástrica) considerando o número de possíveis administrações de dieta.

- Neonatos que receberam mais que 75% de alimentação enteral com leite materno (seja por via oral ou por sonda orogástrica) considerando o número de possíveis administrações de dieta.

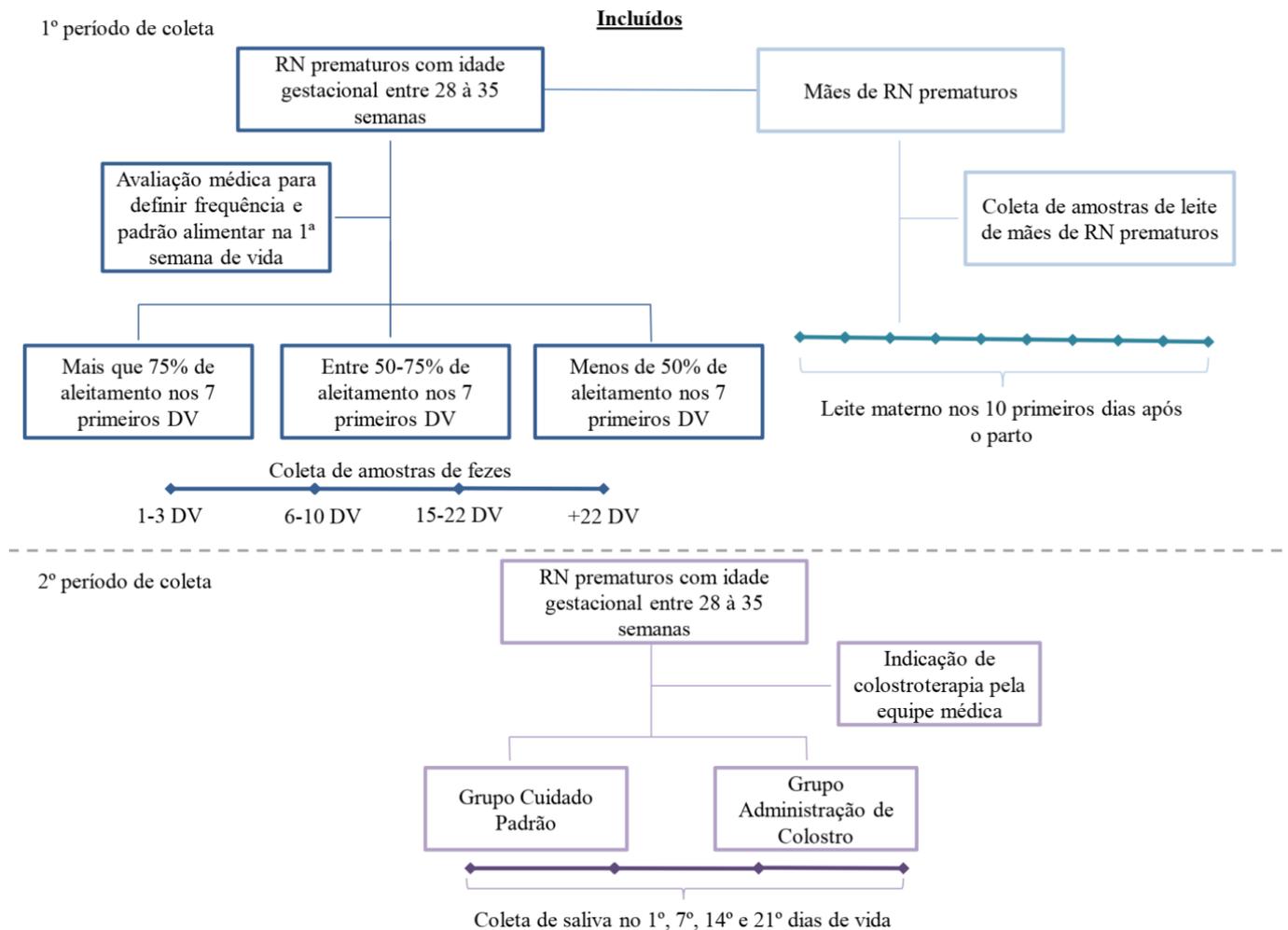
Em relação ao padrão da microbiota do leite materno de mães de recém-nascidos prematuros ao longo do tempo, as amostras foram coletadas durante todo o período de internação materna e em suas visitas na maternidade. Para fins de comparação, foram utilizadas amostras de leite materno coletadas até o décimo dia após o parto, as quais foram divididas de acordo com dia de coleta após o parto:

- Amostras de leite materno coletadas entre o 1º e o 3º dia após o parto;
- Amostras de leite materno coletadas entre o 4º e o 6º dia após o parto;
- Amostras de leite materno coletadas entre o 7º e o 10º dia após o parto.

Os recém-nascidos incluídos na segunda leva de coletas receberam, de acordo com a prescrição da equipe médica do hospital, o protocolo de colostroterapia, com administração orofaríngea de colostro da mãe ou de colostro pasteurizado do banco de leite. No período da coleta, pôde-se estabelecer um grupo de recém-nascidos submetidas à colostroterapia, e um grupo de bebês que permaneceu em jejum oral por um período estendido, segundo prescrição médica, caracterizando o grupo que não recebeu colostroterapia. Para esses dois grupos de bebês, foram coletadas amostras de saliva, coletadas no 1º dia de vida (antes do início do protocolo), ao 7º dia de vida, ao 14º dia de vida e ao 21º dia de vida. Para considerar o efeito da colostroterapia na microbiota oral ao longo do tempo, os grupos foram divididos em:

- Neonatos que receberam o protocolo de colostroterapia, que consiste na administração de 0,2 mL de colostro na mucosa oral com início entre as primeiras 24 a 48 horas de vida a cada 3 horas por, ao menos, 72 horas consecutivas;
- Neonatos que não receberam o protocolo de colostroterapia.

A figura 2 apresenta um fluxograma dos processos de coleta e da composição de grupos de comparação para as diferentes amostras.



**Figura 2.** Fluxograma do processo de coleta.

**Legenda:** RN (Recém-nascidos); DV (Dias de Vida).

## 5.6. Coleta de amostras

### 5.6.1. Amostras de fezes dos recém-nascidos

Para cada recém-nascidos incluído no estudo, foi coletada a primeira amostra de fezes (1-3º dia de vida), uma amostra de fezes entre o 6º e 11º dia de vida, outra entre o 15º e o 22º dia de vida e a última próxima ao 22º dia de vida. Quando não possível coletar a amostra no dia pretendido, a equipe foi instruída a coletar a amostra o mais breve possível. No caso de recém-nascidos que receberam alta hospitalar antes do 22º de vida, quanto possível, foi coleta uma

amostra de fezes na visita de retorno na maternidade após a alta hospitalar. As amostras foram coletadas diretamente das fraldas dos recém-nascidos, imediatamente após a evacuação, pela equipe de enfermagem previamente treinada. Após a coleta, as amostras de fezes foram armazenadas em tubos secos e estéreis. Imediatamente após a coleta, foram armazenadas em congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o envio da amostra ao Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário da USP, o que ocorreu no máximo 24 horas após a coleta. No laboratório, as amostras foram aliquotadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento o uso.

### **5.6.2. Amostras de leite materno**

Amostras de leite foram coletadas durante o período de internação na unidade e, posteriormente, quando disponível, durante as visitas das mães na maternidade. Para este estudo, foram selecionadas amostras até o décimo dia após o parto. Tubos estéreis foram utilizados para armazenar as amostras de leites extraídos manualmente, utilizando luvas estéreis. Antes da coleta, as primeiras gotas foram desprezadas (aproximadamente  $250\ \mu\text{L}$ ). A equipe de nutrição do hospital, ao receber a prescrição de um recém-nascido participante da pesquisa, separou uma alíquota excedente do leite administrado ao recém-nascido e manteve à  $-20^{\circ}\text{C}$  até a amostra ser transportada para o Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP, o que ocorreu em no máximo 24 horas. No laboratório, as amostras de leite foram aliquotadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de DNA.

### **5.6.3. Amostras de saliva dos recém-nascidos**

A primeira amostra de saliva foi coletada nas primeiras 24 horas após o nascimento e as amostras posteriores foram coletadas semanalmente (no 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de nascimento), através de 2 *swabs* cotonetes estéreis, esfregando cuidadosamente as bochechas e a língua do recém-nascido por aproximadamente 30 segundos. O *swab* foi então transferido imediatamente para um tubo contendo  $500\ \mu\text{L}$  de PBS [pH 7,4] e armazenado em congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o envio da amostra ao Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Laboratório Clínico do

Hospital Universitário da USP, o que ocorreu nas 24 horas seguintes à coleta. No laboratório, as amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de DNA.

### **5.7. Extração de DNA**

O DNA total das amostras de fezes coletadas foi extraído com o kit *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany), segundo as normas do fabricante. O DNA total das amostras de leite materno coletadas foi extraído segundo o protocolo *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany), de acordo com protocolo do fabricante para bactérias Gram-positivas, com pequenas adaptações. Primeiramente, 1,5 mL da amostra de leite materno foi centrifugada 15.700 g por 15 min para formar um pellet de células procarióticas. O sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuspendido em 1000  $\mu\text{L}$  de buffer Tris EDTA (10 mM Tris-HCl [pH 7,5], 1 mM EDTA [pH 7,6]). A suspensão foi então centrifugada a 15.700 g por 15 min. As amostras foram então lisadas em 200  $\mu\text{L}$  de buffer TELS (lisozima 20mg/ml: 1M Tris-HCl [pH 7,5], 0,5 M EDTA [pH 8,0], 20% sucrose), e então foram incubadas por 60 minutos à  $37^{\circ}\text{C}$ . Os próximos passos seguiram as instruções do fabricante.

O DNA total das amostras de saliva coletadas foi extraído segundo o protocolo *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany), de acordo com protocolo do fabricante, com pequenas adaptações. Primeiramente, o tubo contendo o *swab* e os 500  $\mu\text{L}$  de PSB [pH 7,4] foi agitado em velocidade máxima por 30 segundos. Então, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de dithiothreitol 0,1% (DTT, Invitrogen) um agente redutor, para diminuir a viscosidade da amostra, agitados em vórtex por 1 minuto e então incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. A suspensão foi então centrifugada a 15.700 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lisado em 200  $\mu\text{L}$  de buffer TELS (lisozima 20mg/ml: 1M Tris-HCl [pH 7,5], 0,5 M EDTA [pH 8,0], 20% sucrose), e então as amostras foram incubadas por 60 minutos à  $37^{\circ}\text{C}$ . Os próximos passos seguiram as instruções do fabricante. Após extração, as amostras de leite materno, fezes e saliva foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da

utilização. Após a extração de DNA total, as amostras foram quantificadas pelo equipamento *Qubit Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

## **5.8. Sequenciamento das amostras**

### **5.8.1. Amplificação do domínio V4 do gene 16S *rRNA***

A caracterização da microbiota fecal dos recém-nascidos foi realizada pela amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, que foi selecionado a partir do trabalho realizado por Kozich e colaboradores (KOZICH et al., 2013). O comprimento total de sequências iniciadoras utilizando a nomenclatura de nucleótidos IUPAC padrão, para seguir o protocolo para esta região são: V4 *forward primer* (5'- TCG TCG GCA GCC AGT GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCCGCG GT - 3') e V4 *reverse primer* (5'- GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT - 3'). Para a amplificação das sequências alvo, foram utilizados 5µl de DNA microbiano (10ng/µl), em volume total de 25µl. A reação foi realizada nas seguintes condições: ativação da enzima 94°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos, extensão 68°C por 45 segundos, 68°C por 2 minutos e mantidos a 4°C. Adicionalmente, um controle negativo da reação de PCR e um controle negativo dos reagentes do kit de extração de DNA foram utilizados. Para verificar se o PCR amplificou o tamanho esperado após utilizar os pares de primer V4 no protocolo, foi utilizado 1µl do produto em eletroforese com gel de agarose à 1%.

A amplificação inicial foi realizada em duas etapas e posteriormente todos os procedimentos foram executados seguindo o protocolo do fabricante (*Illumina-16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*). O tamanho do fragmento alvo é de 250pb e 412pb após a indexação dos adaptadores. Utilizamos os adaptadores Nextera XT e kit de

reagentes para sequenciamento V2 500 ciclos. Posteriormente, as amostras foram sequenciadas utilizando a plataforma Illumina MiSeq®, de acordo com as instruções do fabricante.

### **5.8.2. Amplificação do domínio V3-V4 do gene 16S rRNA**

A caracterização da microbiota da saliva dos recém-nascidos e do leite materno foi realizada pela amplificação do domínio V3- V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, que foi selecionada a partir do trabalho realizado por Klindworth e colaboradores (KLINDWORTH et al., 2013)(KLINDWORTH et al., 2013). O comprimento total de sequências iniciadoras utilizando a nomenclatura de nucleótidos IUPAC padrão, para seguir o protocolo para esta região são: V3-V4 *forward primer* (5' - TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG - 3') e V3-V4 *reverse primer* (5' - GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C - 3'). Para a amplificação das sequências alvo, foram utilizados 5µl de DNA microbiano para as amostras de saliva e 10 µl para as amostras de leite materno (10ng/µl), em volume total de 25µl. A reação foi realizada nas seguintes condições: ativação da enzima 94°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos, extensão 68°C por 45 segundos, 68°C por 2 minutos e mantidos a 4°C. Adicionalmente, um controle negativo da reação de PCR e um controle negativo dos reagentes do kit de extração de DNA foram utilizados. Para verificar se o PCR amplificou o tamanho esperado após utilizar os pares de primer V3-V4 no protocolo, foi utilizado 1µl do produto em eletroforese com gel de agarose à 1%.

Todos os procedimentos foram executados seguindo o protocolo do fabricante (*Illumina-16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*). O tamanho do fragmento de PCR é de 550pb e 630pb após a indexação dos adaptadores. Utilizamos os adaptadores Nextera XT e kit de reagentes para sequenciamento V2 500 ciclos. Posteriormente, as amostras foram

sequenciadas utilizando a plataforma Illumina MiSeq®, de acordo com as instruções do fabricante.

### **5.9. Análise da microbiota por ferramentas de bioinformática**

Após a obtenção das sequências, as bibliotecas 16S rRNA obtidas foram analisadas através do software QIIME v.2-2020.2 (BOLYEN et al., 2019). *Denoising* foi realizado com a ferramenta DADA2 (CALLAHAN et al., 2016). As sequências diretas foram então truncadas na posição 251, enquanto as reversas foram truncadas nos 250 nucleotídeos, a fim de descartar as posições para as quais a qualidade mediana dos nucleotídeos era inferior a Q30. Amostras com menos de 1000 sequências também foram excluídas de análises posteriores. A taxonomia foi atribuída utilizando ASVs (*Amplicon Sequencing Variant*) através do recurso *q2-feature-classifier* (BOKULICH et al., 2018) e o classificador de taxonomia Bayes *naive classify-sklearn*, comparando as ASVs obtidas contra o banco de dados de referência SILVA 132 (QUAST et al., 2013). As análises subsequentes foram realizadas no software SPSS versão 26 e R Studio versão 4.0.4, usando os pacotes *phyloSeq* (MCMURDIE; HOLMES, 2013), *vegan* (OKSANEN et al., 2016), *microbiome* (LAHTI; SHETTY, 2018) e *ggplot2* (HADLEY, 2016).

### **5.10. Análise de IgA**

Os anticorpos IgA totais presentes em amostras de mecônio e fezes de recém-nascidos prematuros foram quantificados por teste imunoenzimático (ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) conforme descrito anteriormente (NAGAO et al., 1998), e os resultados foram expressos em g / L.

### **5.11. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS versão 26 e no R Studio. Análise dos dados descritivos foram realizadas com o *Generalized Linear Model* (GzLM) com distribuição linear para a comparação entre variáveis numéricas e distribuição logística binária

para variáveis categóricas. Nas amostras de fezes e de saliva, foram avaliados os efeitos das variáveis independentes (grupos) sobre as variáveis dependentes, que englobam: índice de riqueza de Chao1, índice de diversidade de Shannon, índice de dominância de Simpson, diversidade filogenética de Faith, assim como a diferença nos 15 gêneros bacterianos mais abundantes em todos os tempos nestas amostras e análise da beta diversidade. Neste contexto, em todas as análises foi avaliado o efeito do tempo e a comparação entre grupos nos tempos. Especificamente em relação à microbiota intestinal, também foi observado a diferença entre grupo/tempo na família Enterobacteriaceae. As amostras de leite materno foram avaliadas em relação ao efeito do tempo na composição destas.

Os cálculos para os índices de alfa diversidade (Chao1, Shannon, Simpson e diversidade filogenética de Faith) foram realizados pela análise com o *Generalized Estimating Equations* (GEE), no qual os modelos foram avaliados como distribuição gamma ou linear e função de ligação *identity*. Além disso, a matriz de correlação variou entre independente, AR(1), *unstructured* e *exchangeable*. Para a escolha do melhor modelo, foi levado em consideração o menor valor de *Quasi likelihood under Independence Criterion* (QIC) e também foi avaliada a melhor aderência dos resíduos segundo o gráfico Q-Q plot (figura suplementar 1, 2 e 3). No caso das amostras de fezes e de saliva, os índices foram ajustados para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e uso de antibióticos (sim ou não); Para as amostras de leite materno, os valores foram ajustados para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e idade materna. Em todos os modelos, os valores de significância foram confirmados com o teste pós-teste de Sidak.

Para comparar as abundâncias relativas de gêneros entre os grupos ao longo do tempo, para as amostras de saliva e fezes, um modelo GAMLSS-BEZI (*Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape with a zero inflated beta family*) foi usado através do pacote *metamicrobiomeR* (HO et al., 2019). Os modelos foram ajustados para variáveis de confusão,

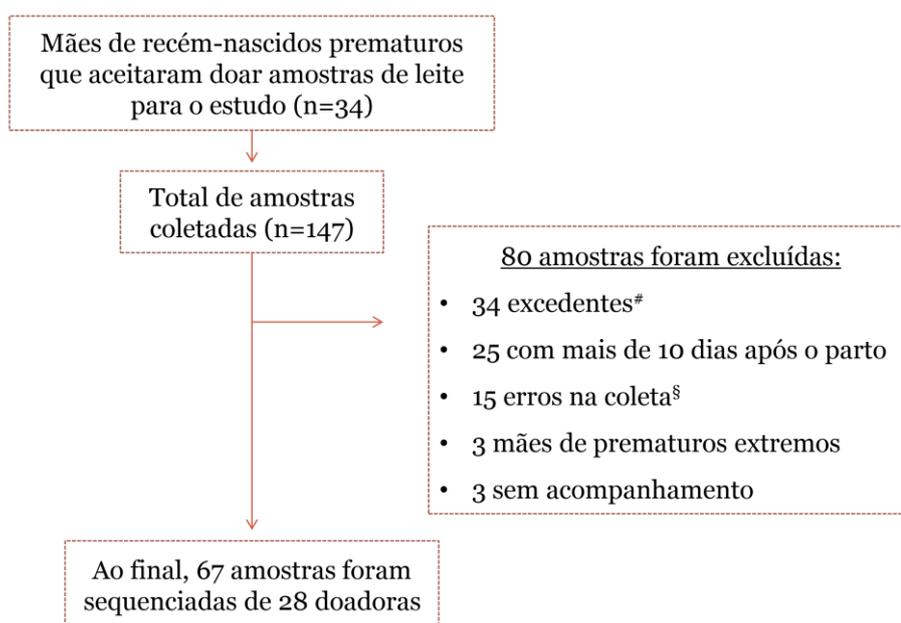
como tipo de parto (cesariana ou vaginal), idade gestacional (semanas) e uso de antibióticos (sim ou não). Para serem contabilizados no modelo, os gêneros foram filtrados para abundância relativa maior que 0,0005 e prevalência maior que 0,05. Múltiplas comparações foram controladas usando um ajuste falso da taxa de descoberta (False Discovery Rate). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Para análise da beta diversidade, foi utilizado o software *Microbiome Analyst* (DHARIWAL et al., 2017) para observar as diferenças intra e entre os grupos, para todas as amostras. O teste PERMANOVA foi realizado para cada variável usando a distância *weighted* e *unweighted* UniFrac. Para cada variável, 999 permutações foram realizadas. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Leite materno

No presente estudo, foram coletadas 147 amostras de colostro materno de um total de 34 mães de recém-nascidos prematuros. Destas, 67 amostras de um total de 28 mães foram sequenciadas e analisadas. Os motivos para a não inclusão das demais amostras podem ser observadas na Figura 3. Após análise de bioinformática, 7 amostras foram excluídas por apresentar baixa qualidade.



**Figura 3.** Fluxograma das amostras de leite incluídas para análise.

**Legenda:** # (mais de uma amostra coletada no mesmo período), § (amostras sem identificação).

#### 6.1.1. Dados descritivos

Os dados descritivos de mães de prematuros participantes deste estudo podem ser observados na Tabela 1. Nestas 28 mulheres, a idade média observada foi de 29 anos, variando entre 16 e 45 anos. Adicionalmente, a maioria destas participantes eram multíparas (75%), e o tipo de parto mais prevalente nesta amostra foi o parto cesáreo (75%). A idade gestacional

média foi de 31,6 semanas (28 – 34,5), fazendo com que 53,6% sejam categorizadas como mães de recém-nascidos muito prematuros (idade gestacional entre 28 e 32 semanas) e 46,4% sejam categorizadas como mães de prematuros moderados a tardio (idade gestacional maior do que 32 semanas e menor do que 37 semanas).

**Tabela 1.** Relação dos dados descritivos das mães doadoras de leite materno (n=28)

<b>Variáveis</b>	
Idade materna (anos) <sup>#</sup>	29,50 ± 6,82 (16 – 45)
Idade gestacional (semanas) <sup>#</sup>	31,60 ± 1,84 (28 – 34,5)
Histórico obstétrico <sup>§</sup>	
Múltiparas	21 (75,0)
Primigestas	7 (25,0)
Tipo de parto <sup>§</sup>	
Cesárias	21 (75,0)
Vaginal	7 (25,0)
Grau de prematuridade	
Muito pré-termo	15 (53,6)
Prematuro moderado a tardio	13 (46,4)

Valores apresentados como <sup>#</sup>média ± desvio padrão (Mínimo-máximo); <sup>§</sup>número (porcentagem). Grau de prematuridade: Muito pré-termo (entre 28-32 semanas); Prematuro moderado a tardio (entre 32-37 semanas).

### 6.1.2. Abundância relativa

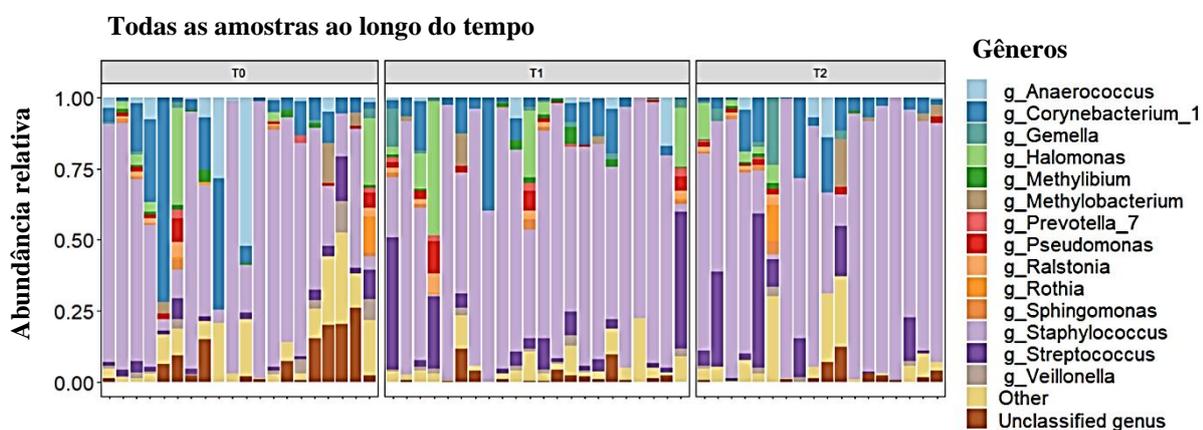
A análise estatística e distribuição dos 15 gêneros bacterianos mais abundantes nas amostras de leite materno em relação ao tempo de coleta (1-3 dias, 4-7 dias e 8-10 dias) podem ser observados na Tabela 2 e na Figura 4.

Os gêneros mais prevalentes foram *Staphylococcus*, *Corynebacterium* 1 e *Streptococcus*, respectivamente. Podemos observar que comparando o leite materno produzido entre os 3 primeiros dias após o parto (T0) em relação à faixa de 4-6 dias (T1), ocorre aumento de *Staphylococcus* (de 51,66% para 62,55%), *Streptococcus* (de 3,09% para 7,80%) e

*Halomonas* (3,52% para 5,05%), com conseqüente diminuição de *Corynebacterium 1* (12,76% para 7,21%) e *Anaerococcus* (5,59% para 1,59%), porém os resultados não alcançaram significância estatística. Adicionalmente, nesta mesma comparação foi possível observar diminuição significativa de *Lactobacillus* (0,83% para 0,19% -  $p = 0,028$ ) e de *Rothia* (0,75% para 0,05% -  $p < 0,001$ ).

Ao compararmos o período de 1-3 dias após o parto com o período de 7-10 dias (T2), observamos o mesmo padrão no aumento da abundância relativa de *Staphylococcus* (de 51,66% para 66,22%) e *Streptococcus* (de 3,09% para 8,63%), porém com diminuição de *Halomonas* (3,52% para 1,49%), enquanto gêneros como *Corynebacterium 1* e *Anaerococcus* permanecem diminuídos em T2. Tais resultados não apresentaram diferença significativa na análise estatística utilizada. Por outro lado, o gênero *Rothia* apresentou diminuição estatística significativa entre T0 (0,754%) e T2 (0,707%) -  $p < 0,001$ .

Na comparação entre T1 e T2, ocorre um pequeno aumento na abundância de *Staphylococcus* e *Streptococcus*, com pequena diminuição de *Anaerococcus* e *Corynebacterium 1*, mas estes resultados não apresentaram significância estatística. Em contraste, foi possível detectar diminuição significativa na prevalência de *Prevotella 7* (0,45% para 0,08% -  $p = 0,014$ ) e aumento significativo na prevalência de *Rothia* (0,05% para 0,70% -  $p < 0,001$ ).



**Figura 4.** Relação dos principais gêneros bacterianos encontrados nas amostras de leite materno com o passar do tempo.

**Legenda:** T0 (amostra coletada entre o 1º ao 3º dia após nascimento), T1 (amostra coletada entre o 4º ao 6º dia após o 27 nascimento), T2 (amostra coletada entre o 7º ao 10º dia após nascimento).

**Tabela 2: Relação dos principais gêneros bacterianos encontrados nas amostras de leite materno entre o 1º ao 10º dia após o nascimento (n=28)**

Gêneros	T0	T1	T2	T0 x T1			T0 x T2			T1 x T2		
				Estimate	P	P ajustado (FDR)	Estimate	P	P ajustado (FDR)	Estimate	P	P ajustado (FDR)
<i>Anaerococcus</i>	5,594	1,592	1,437	-0,373	0,370	0,604	-0,400	0,452	0,870	0,026	0,963	0,963
<i>Corynebacterium_1</i>	12,763	7,215	7,060	-0,390	0,167	0,398	-0,505	0,090	0,320	0,115	0,706	0,912
<i>Gemella</i>	0,396	1,143	1,861	-0,089	0,842	0,870	0,116	0,823	0,881	-0,205	0,619	0,872
<i>Halomonas</i>	3,528	5,056	1,494	0,391	0,445	0,655	-0,356	0,539	0,870	0,747	0,155	0,397
<i>Lactobacillus</i>	0,834	0,199	0,422	-1,169	0,007	0,028*	-0,914	0,019	0,112	-0,255	0,593	0,872
<i>Methylibium</i>	0,776	0,891	0,352	0,239	0,370	0,604	-0,150	0,658	0,870	0,389	0,217	0,476
<i>Methylobacterium</i>	1,128	0,768	1,368	-0,394	0,609	0,727	-0,213	0,754	0,870	-0,181	0,740	0,918
<i>Prevotella_7</i>	0,378	0,459	0,085	0,201	0,469	0,655	-1,111	0,009	0,065	1,312	0,003	0,014*
<i>Pseudomonas</i>	1,153	1,498	0,723	0,354	0,264	0,547	-0,118	0,726	0,870	0,472	0,167	0,397
<i>Ralstonia</i>	0,668	0,813	0,395	0,244	0,471	0,655	-0,191	0,646	0,870	0,435	0,231	0,476
<i>Rothia</i>	0,754	0,054	0,707	-3,095	<0,001	<0,001*	-1,230	<0,001	<0,001*	-1,865	<0,001	<0,001*
<i>Sphingomonas</i>	0,457	0,400	0,527	-0,099	0,732	0,811	-0,084	0,793	0,881	-0,015	0,960	0,963
<i>Staphylococcus</i>	51,660	64,591	66,220	0,335	0,338	0,604	0,625	0,096	0,320	-0,289	0,425	0,699
<i>Streptococcus</i>	3,096	7,807	8,637	0,486	0,137	0,385	0,205	0,569	0,870	0,281	0,428	0,699
<i>Veillonella</i>	1,754	0,818	0,511	-0,213	0,486	0,655	-0,152	0,716	0,870	-0,060	0,888	0,963

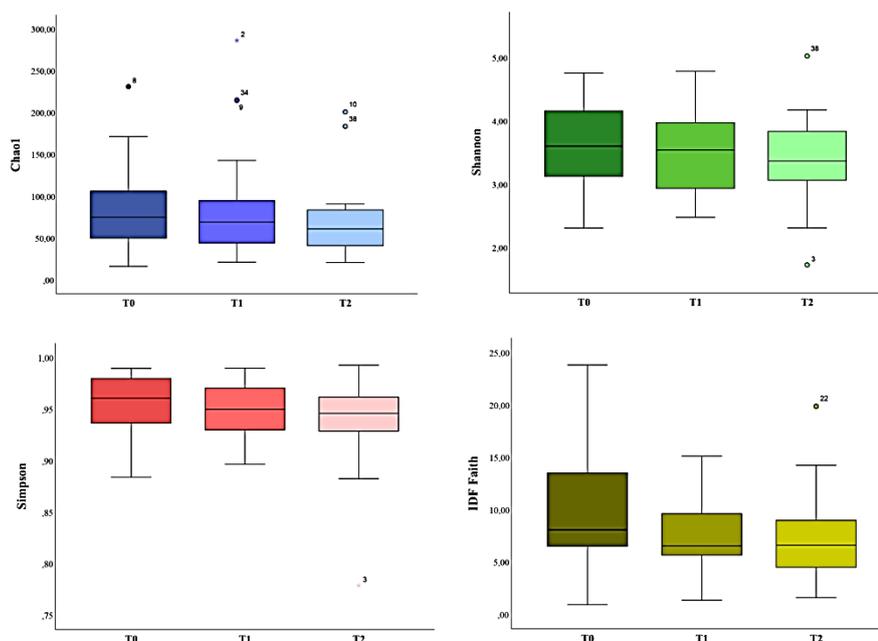
Valores representam a porcentagem dos 15 principais gêneros encontrados nas amostras de leite de mãe de recém-nascidos prematuros. Valor de P baseado no GAMLSS-BEZI (*Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape with a zero inflated beta family*). P (FDR): valor de P ajustado para tipo de parto (cesárea ou vaginal), idade gestacional e uso de antibiótico (sim ou não). \*Significância  $\leq 0.05$  após valor ajustado.

**Legenda:** T0 (amostra coletada entre o 1º ao 3º dia após nascimento), T1 (amostra coletada entre o 4º ao 6º dia após o nascimento), T2 (amostra coletada entre o 7º ao 10º dia após nascimento), *Estimate* (valor do teste), FDR (*False Discover Rate*).

### 6.1.3. Alfa Diversidade

Os resultados dos índices de alfa diversidade em relação ao tempo podem ser observados na Tabela 3 e na Figura 5. Em relação ao índice de riqueza de Chao1, observamos um aumento de  $87,75 \pm 11,11$  (T0) para  $100,73 \pm 17,99$  (T1), com posterior diminuição em T2 ( $68,90 \pm 9,77$ ), porém os resultados não apresentaram significância estatística ( $p = 0,10$ ). No índice de diversidade de Shannon, observamos uma gradual diminuição entre T0 e T2 –  $3,68 \pm 0,15$  em T0,  $3,58 \pm 0,15$  em T1 e  $3,35 \pm 0,18$  em T2. Nas comparações entre os tempos, não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,19$ ).

No índice de Simpson, não foram observadas diferenças marcantes nesta amostragem. Entre T0 e T1, os valores são muito semelhantes ( $0,95 \pm 0,006$  para  $0,95 \pm 0,005$ ), e há sutil diminuição em T2 ( $0,93 \pm 0,012$ ), porém sem diferenças significativas entre os tempos ( $p = 0,13$ ). Na avaliação do índice de diversidade filogenética de Faith, é possível observar diminuição da diversidade ao longo do tempo –  $9,86 \pm 1,22$  em T0,  $7,92 \pm 0,86$  em T1 e  $7,58 \pm 1,12$  em T2, mas sem diferenças significativas ( $p = 0,50$ ).



**Figura 5.** Índices de Alfa diversidade das amostras de leite materno com o passar do tempo.

**Legenda:** T0 (amostra coletada entre o 1º ao 3º dia após nascimento), T1 (amostra coletada entre o 4º ao 6º dia após o nascimento), T2 (amostra coletada entre o 7º ao 10º dia após nascimento).

**Tabela 3. Avaliação dos índices de Alfa diversidade nas amostras de leite materno de mães de recém-nascidos prematuros (n=28)**

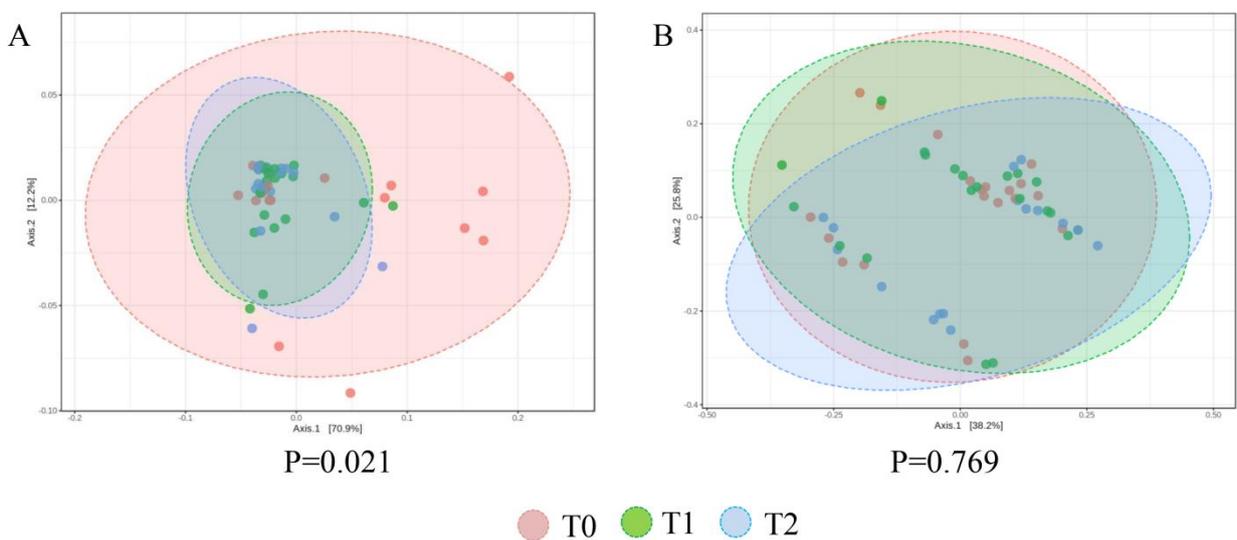
Índices	Média ± erro padrão	Teste de efeitos do modelo		
		Tempo	DF	P
		Wald Chi-Square		
Chao1 <sup>#</sup>		6.241	3	0,10
Tempo 0	87,75 ± 11,11			
Tempo 1	100,73 ± 17,99			
Tempo 2	68,90 ± 9,77			
Shannon <sup>#</sup>		4.731	3	0,19
Tempo 0	3,68 ± 0,15			
Tempo 1	3,58 ± 0,15			
Tempo 2	3,35 ± 0,18			
Simpson <sup>§</sup>		5.511	3	0,13
Tempo 0	0,95 ± 0,006			
Tempo 1	0,95 ± 0,005			
Tempo 2	0,93 ± 0,012			
IDF Faith <sup>#</sup>		2.318	3	0,50
Tempo 0	9,86 ± 1,22			
Tempo 1	7,92 ± 0,86			
Tempo 2	7,58 ± 1,12			

**Legenda:** DF (Grau de Liberdade); IDF Faith (Índice de Diversidade Filogenética de Faith); Tempo 0 (amostra coleta entre o 1º ao 3º dia após nascimento), Tempo 1 (amostra coletada entre o 4º ao 6º dia após nascimento), Tempo 2 (amostra coletada entre o 7º ao 10º dia após nascimento).

O valor de P é derivado da análise com o *Generalized Estimating Equations* (GEE), no qual os modelos foram avaliados com <sup>#</sup>distribuição gamma ou <sup>§</sup>distribuição linear. Todos os índices foram ajustados para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e idade materna.

#### 6.1.4. Beta Diversidade

Os resultados em relação a beta diversidade nas amostras de leite materno podem ser observados na Tabela 4 e na Figura 6. Na análise de coordenadas principais (PCoA) ponderada (Figura 6-A), observamos que as amostras de leite de mães de recém-nascidos prematuros apresentam diferença na estrutura filogenética da comunidade bacteriana ao longo do tempo, onde é possível observar maior compartilhamento / similaridade nas amostras em T1 e T2 em comparação a T0 ( $F=2,9465$ ;  $R\text{-quadrado}=0,098393$ ;  $p=0,021$ ). Na Figura 6-B podemos observar a análise não ponderada em relação ao tempo nas amostras de leite materno. Desta vez, é possível observar que as amostras de leite de mães de recém-nascidos prematuros apresentam uma estrutura filogenética constante ao longo do tempo, não sendo possível observar agrupamento das amostras entre os tempos ( $F=0,62402$ ;  $R\text{-quadrado}=0,02259$ ;  $p=0,769$ ).



**Figura 6.** Beta diversidade nas amostras de leite materno

**Legenda:** T0 (amostra coletada entre o 1° ao 3° dia após nascimento), T1 (amostra coletada entre o 4° ao 6° dia após o nascimento), T2 (amostra coletada entre o 7° ao 10° dia após nascimento), A – análise ponderada, B – análise não ponderada.

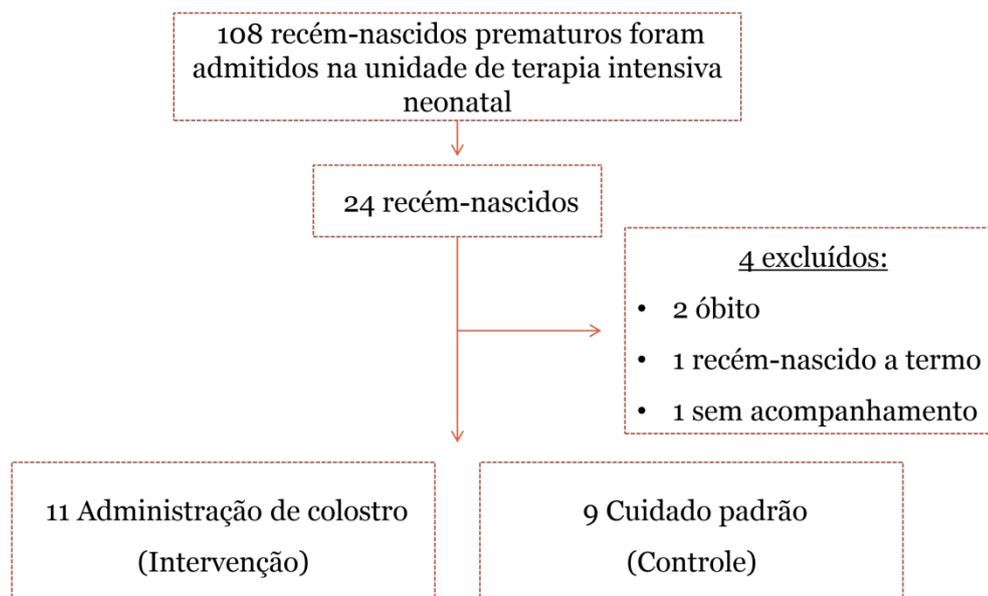
**Tabela 4.** Análise da beta diversidade considerando as amostras de leite materno com o passar do tempo.

	F	R <sup>2</sup>	P
Ponderado	2,9465	0,098393	0,021*
Não ponderado	0,62402	0,02259	0,769

Valores baseado na análise de PERMANOVA.

## 6.2. Microbiota Oral

Nesta etapa do estudo, foram incluídos 24 recém-nascidos prematuros dos 108 que foram admitidos na unidade de terapia intensiva neonatal (UTINN). Destes, 4 foram excluídos, totalizando 20 recém-nascidos para a etapa de análise, 11 no grupo que recebeu a administração de colostro (Grupo AC) e 9 que não receberam a administração de colostro (Grupo cuidado padrão – CP). Foram coletadas 79 amostras desta população, e após análise de bioinformática, 74 foram utilizadas para a análise estatística. Os motivos para exclusão de participantes podem ser observados na Figura 7.



**Figura 7.** Fluxograma relacionando o processo de inclusão dos recém-nascidos prematuros direcionados para avaliação do microbiota oral

### 6.2.1. Dados descritivos

Os dados descritivos dos grupos podem ser observados na Tabela 5. Em relação aos dados maternos, não foi observada diferença estatística entre a idade materna média observada entre os grupos ( $p=0,27$ ) e histórico obstétrico ( $p=0,21$ ). Nos grupos, não foi possível identificar diferenças em relação a idade gestacional de nascimento ( $p=0,39$ ), onde o grupo CP apresentou uma média um pouco maior em relação ao grupo AC. A maior parte dos recém-nascidos do grupo AC era do sexo masculino (54,5%), enquanto 66,7% eram do sexo feminino no grupo CP –  $p=0,34$ . Em ambos os grupos, o parto cesáreo foi o mais prevalente (63,6% no grupo AC e 66,7% no grupo CP,  $p=0,88$ ). A ocorrência de sepse foi maior no grupo AC (45,5%) em relação ao grupo CP (22,2%), assim como no uso de antibioticoterapia (AC = 81,8% e CP = 77,8%) e nos dias de internação na UTINN (44,09 dias no grupo AC e 23,44 dias no grupo CP), porém os resultados não apresentaram significância estatística ( $p=0,28$ ,  $p=0,82$  e  $p=0,09$ , respectivamente). Adicionalmente, o tempo de nutrição parenteral também não apresentou diferença entre os grupos (16,09 dias no grupo AC e 10,67 dias no grupo CP,  $p=0,25$ ).

De maneira interessante, o peso de nascimento foi significativamente maior no grupo CP (1493,33 gramas em média) em relação ao grupo AC (1180,81 gramas em média) –  $p=0,013$ . Além disso, o grupo CP também apresentou peso significativamente maior no 7º dia de vida em relação ao grupo AC (1416,00 x 1140,09, respectivamente –  $p=0,017$ ). Nas demais comparações de pesos entre os grupos, não foram observadas diferenças (14º dia e 21º dia após o nascimento e peso na alta hospitalar).

**Tabela 5: Comparação dos dados descritivos entre os grupos (n=20)**

Variáveis	AC grupo (n=11)	CP grupo (n=9)	Wald Chi-Square	P
Idade materna (anos) <sup>#</sup>	29,91 ± 1,72	27,11 ± 1,91	1,178	0,27
Idade gestacional (semanas) <sup>#</sup>	30,66 ± 0,58	31,41 ± 0,64	0,736	0,39
Histórico obstétrico <sup>§</sup>			1,546	0,21
Múltiparas	9 (81,8)	5 (55,6)		
Primigestas	2 (18,2)	4 (44,4)		
Sexo dos recém-nascidos <sup>§</sup>			0,884	0,34
Feminino	5 (45,5)	6 (66,7)		
Masculino	6 (54,5)	3 (33,3)		
Tipo de parto <sup>§</sup>			0,020	0,88
Cesária	7 (63,6)	6 (66,7)		
Vaginal	4 (36,4)	3 (33,3)		
Sepse <sup>§</sup>			1,135	0,28
Sim	5 (45,5)	2 (22,2)		
Não	6 (54,5)	7 (77,8)		
Uso de antibióticos <sup>§</sup>			0,050	0,82
Sim	9 (81,8)	7 (77,8)		
Não	2 (18,2)	2 (22,2)		
Tempo de nutrição parenteral (dias) <sup>#</sup>	16,09 ± 3,18	10,67 ± 3,51	0,253	0,25
Peso ao nascimento (gramas) <sup>#</sup>	1180,81 ± 84,47	1493,33 ± 93,38	6,159	0,013*
Peso no 7º dia de vida (gramas) <sup>#</sup>	1140,09 ± 77,87	1416,00 ± 86,09	5,649	0,017*
Peso no 14º dia de vida (gramas) <sup>#</sup>	1278,81 ± 86,73	1529,55 ± 95,89	3,760	0,052
Peso no 21º dia de vida (gramas) <sup>¥, #</sup>	1372,18 ± 85,81	1570,14 ± 107,57	2,069	0,15
Peso na alta hospitalar (gramas) <sup>#</sup>	1963,00 ± 62,96	2055,00 ± 62,96	1,067	0,30
Dias na UTINN <sup>#</sup>	44,09 ± 8,17	23,44 ± 9,04	2,868	0,09

Valores apresentados como <sup>#</sup>média ± erro padrão; <sup>§</sup>número (%). Valor de P baseado no *Generalized Linear Model* (GzLM) com <sup>#</sup>distribuição linear e <sup>§</sup>distribuição logística binária. \*Significância ≤ 0.05. **Legenda:** AC (Administração de Colostro); CP (Cuidado Padrão); UTINN (Unidade de Terapia Intensiva Neonatal). <sup>¥</sup> 2 recém-nascidos receberam alta hospitalar antes de completar 21 de internação.

### 6.2.2. Alimentação por via oral

Os resultados referentes à alimentação por via oral realizada durante a primeira semana de vida nos grupos durante a internação hospitalar podem ser observados na Tabela 6. A alimentação oral de ambos os grupos foi constituída majoritariamente por leite pasteurizado, porém com média maior no grupo AC em relação ao grupo CP (57,4 ± 15,3 e 19,4 ± 16,7).

Além de leite pasteurizado, a alimentação dos grupos foi constituída por leite cru, o qual também foi mais prevalente no grupo AC em relação ao grupo CP ( $15,9 \pm 9,4$  e  $2,9 \pm 5,5$ ). No total, a alimentação com leite materno representou 73,3% da alimentação do grupo AC na primeira semana de vida e 22,3% do grupo CP no mesmo período, em relação ao total de oportunidades de alimentação.

**Tabela 6.** Porcentagem de colostroterapia e dieta oral administrada na 1ª semana de vida (n=20).

<b>Tipo de colostro</b>	<b>Grupo administração de colostro (n=11)</b>	<b>Grupo cuidado padrão (n=9)</b>
Leite cru	$15,9 \pm 9,4$	$2,9 \pm 5,5$
Leite pasteurizado	$57,4 \pm 15,3$	$19,4 \pm 16,7$
Média total	73,3%	22,3%

Valores apresentados como porcentagem média  $\pm$  desvio padrão. Os neonatos não receberam fórmula infantil na 1ª semana de vida.

Na tabela 7 é possível observar a alimentação dos grupos após o 7º dia de vida até a alta hospitalar. Neste período, o leite pasteurizado foi a principal fonte de alimentação oral de ambos os grupos, com média maior no grupo CP em relação ao grupo AC ( $14,43 \pm 21,76$  e  $10,22 \pm 16,49$ ). A dieta oral também foi constituída por leite cru, o qual também foi mais prevalente no grupo CP em relação ao grupo AC ( $7,49 \pm 11,35$  e  $2,66 \pm 5,19$ ) e por fórmula infantil, a qual constituiu somente a alimentação do grupo CP ( $2,33 \pm 5,73$ ). No total, a alimentação oral neste período representou 12,88% da alimentação do grupo AC e 24,26% do grupo CP, em relação ao total de oportunidades de alimentação.

**Tabela 7.** Porcentagem de colostroterapia e dieta oral administrada após a 1ª semana de vida (n=19).

<b>Alimentação oral após a 1ª semana (%)</b>	<b>Grupo administração de colostro (n=11)</b>	<b>Grupo cuidado padrão (n=8)</b>
Leite cru	2,66 ± 5,19	7,49 ± 11,35
Leite pasteurizado	10,22 ± 16,49	14,43 ± 21,76
Fórmula infantil	0	2,33 ± 5,73
Média total	12,88%	24,26%

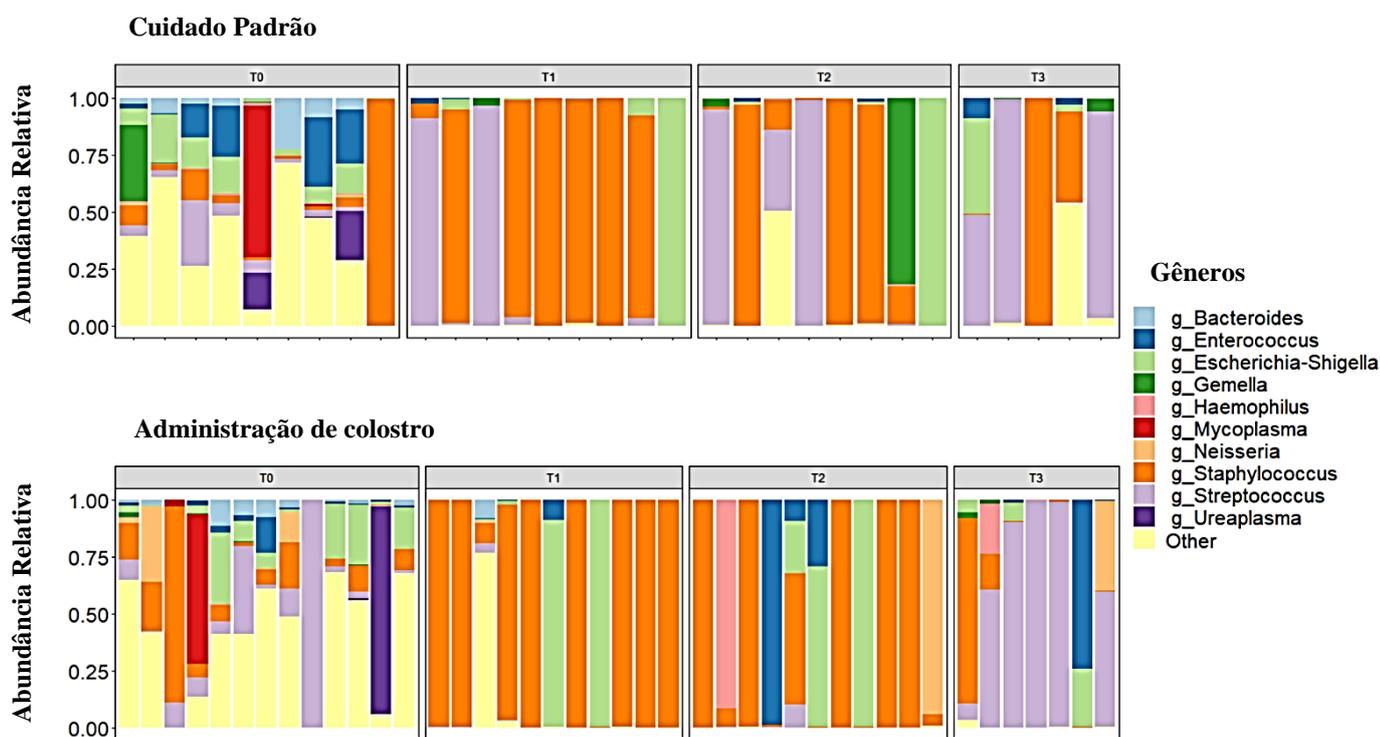
Valores apresentados como porcentagem média ± desvio padrão. Um neonato do grupo de cuidado padrão recebeu alta hospitalar antes de completar 14 dias de internação.

### **6.2.3. Abundância relativa**

A análise estatística e distribuição dos 15 gêneros bacterianos mais abundantes nas amostras de saliva em relação ao tempo de coleta (1º dia, 7º dia, 14º dia e 21º dia) podem ser observados na Tabela 8 e na Figura 8.

Os gêneros mais prevalentes no primeiro dia de vida (T0) foram *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia-Shigella* e *Streptococcus*. Ao compararmos os grupos observamos maior abundância de *Staphylococcus* e *Enterococcus* no grupo CP, enquanto o grupo AC apresenta maior abundância de *Streptococcus* e *Escherichia-Shigella*; no entanto, os resultados não apresentaram significância estatística. Em contrapartida, observamos abundância significativamente maior de *Agathobacter* (p=0,041) e *Blautia* (p=0,013) no grupo AC (4,15% e 4,06%, respectivamente) em comparação ao grupo CP (1,46% e 1,55%, respectivamente) e uma tendência de maior abundância de *Haemophilus* no grupo CP em relação ao grupo AC (0,35% e 0,05%, respectivamente - p = 0,051). Na comparação entre os grupos ao 7º dia de vida (T1), identificamos maior abundância de *Staphylococcus* e *Escherichia-Shigella* no grupo AC e maior abundância de *Streptococcus* no grupo CP, mas os resultados não atingiram significância estatística. No entanto, observamos abundância significativamente maior de *Bifidobacterium* no grupo AC em comparação ao grupo CP (0,36% e 0,002%, respectivamente), com valor de p<0,001.

Ao 14º dia de vida (T2), os gêneros mais dominantes foram *Staphylococcus*, *Escherichia-Shigella* e *Streptococcus* no grupo CP; no grupo AC, *Staphylococcus*, *Escherichia-Shigella* e *Enterococcus* foram os gêneros mais abundantes. Na comparação entre grupos, identificamos abundância significativamente maior de *Haemophilus* no grupo AC em comparação ao grupo CP (8,34% e 0,19%, respectivamente), com valor de  $p < 0,001$ . Ao 21º dia de vida (T3), os gêneros mais dominantes em ambos os grupos foram os mesmos observados em T2. Na comparação entre grupos, identificamos abundância significativamente maior de *Gemella* no grupo CP em comparação ao grupo AC (1,15% e 0,58%, respectivamente), com valor de  $p = 0,001$ .



**Figura 8.** Relação dos principais gêneros bacterianos encontrados nas amostras orais ao longo do tempo

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento).

**Tabela 8: Comparação entre os principais gêneros bacterianos entre os grupos com o passar do tempo (N=20)**

<b>T0</b>	<b>CP grupo (N=9)</b>	<b>AC grupo (N=11)</b>	<i>Estimate</i>	<b>P</b>	<b>P ajustado (FDR)</b>
<i>Agathobacter</i>	1,466	4,155	-1,101	0,008	0,041*
<i>Bacteroides</i>	5,706	3,031	0,384	0,319	0,660
<i>Bifidobacterium</i>	0,397	0,431	-0,497	0,176	0,431
<i>Blautia</i>	1,551	4,061	-1,364	0,002	0,013*
<i>Enterococcus</i>	10,451	2,247	0,183	0,686	0,975
<i>Escherichia-Shigella</i>	9,163	9,617	-0,207	0,573	0,940
<i>Faecalibacterium</i>	3,995	2,848	0,041	0,890	1,000
<i>Gemella</i>	3,889	0,252	0,212	0,655	0,961
<i>Haemophilus</i>	0,359	0,055	0,804	0,012	0,051*
<i>Mycoplasma</i>	7,485	5,308	0,162	0,861	1,000
<i>Neisseria</i>	0,374	3,738	-0,001	0,998	1,000
<i>Prevotella</i>	4,067	2,248	0,479	0,182	0,431
<i>Staphylococcus</i>	15,148	14,668	0,263	0,613	0,961
<i>Streptococcus</i>	6,049	14,912	-0,421	0,416	0,780
<i>Ureaplasma</i>	4,201	7,120	-0,860	0,276	0,614
<i>Veillonella</i>	0,526	0,478	0,040	0,919	1,000
<b>T1</b>	<b>CP grupo (N=9)</b>	<b>AC grupo (N=11)</b>	<i>Estimate</i>	<b>P</b>	<b>P ajustado (FDR)</b>
<i>Agathobacter</i>	0,012	0,474	-0,243	0,822	1,000
<i>Bacteroides</i>	0,026	0,758	-7,843	0,021	0,088
<i>Bifidobacterium</i>	0,002	0,369	-19,508	<0,001	<0,001*
<i>Blautia</i>	0,017	1,110	-1,648	0,147	0,574
<i>Enterococcus</i>	0,300	0,868	0,752	0,474	1,000
<i>Escherichia-Shigella</i>	12,579	17,583	-0,522	0,463	1,000
<i>Faecalibacterium</i>	0,029	0,487	-0,183	0,842	1,000
<i>Gemella</i>	0,357	0,004	0,523	1,000	1,000
<i>Haemophilus</i>	0,008	0,008	-1,668	0,721	1,000
<i>Mycoplasma</i>	0,005	--	--	--	--
<i>Neisseria</i>	0,002	0,099	-2,596	1,000	1,000
<i>Prevotella</i>	0,029	0,027	-0,057	0,947	1,000
<i>Staphylococcus</i>	64,766	73,029	-0,455	0,466	1,000
<i>Streptococcus</i>	21,714	0,417	0,247	0,734	1,000
<i>Ureaplasma</i>	0,004	0,000	2,576	1,000	1,000
<i>Veillonella</i>	0,046	0,012	1,011	0,259	0,974
<b>T2</b>	<b>CP grupo (N=9)</b>	<b>AC grupo (N=11)</b>	<i>Estimate</i>	<b>P</b>	<b>P ajustado (FDR)</b>
<i>Agathobacter</i>	0,003	0,001	0,648	1,000	1,000
<i>Bacteroides</i>	0,059	0,0004	3,024	0,009	0,125
<i>Blautia</i>	0,005	--	--	--	--
<i>Enterococcus</i>	0,364	12,536	-0,462	0,551	1,000
<i>Escherichia-Shigella</i>	12,892	17,586	-0,249	0,758	1,000
<i>Faecalibacterium</i>	0,003	0,000	2,922	1,000	1,000

<i>Gemella</i>	10,607	--	--	--	--
<i>Haemophilus</i>	0,191	8,347	-7,078	<0,001	<0,001*
<i>Mycoplasma</i>	0,005	0,000	4,200	1,000	1,000
<i>Neisseria</i>	0,002	8,569	-4,556	1,000	1,000
<i>Prevotella</i>	0,011	0,004	-0,864	1,000	1,000
<i>Staphylococcus</i>	40,513	51,936	-0,223	0,743	1,000
<i>Streptococcus</i>	28,803	0,957	0,480	0,483	1,000
<i>Ureaplasma</i>	--	0,002	--	--	--
<i>Veillonella</i>	3,229	0,000	1,063	1,000	1,000

<b>T3</b>	<b>CP grupo (N=9)</b>	<b>AC grupo (N=11)</b>	<i>Estimate</i>	<b>P</b>	<b>P ajustado (FDR)</b>
<i>Agathobacter</i>	--	--	--	--	--
<i>Bacteroides</i>	--	--	--	--	--
<i>Blautia</i>	--	--	--	--	--
<i>Enterococcus</i>	2,297	10,905	-0,525	0,548	1,000
<i>Escherichia-Shigella</i>	9,105	5,669	0,155	0,818	1,000
<i>Faecalibacterium</i>	--	0,237	--	--	--
<i>Gemella</i>	1,151	0,581	0,014	<0,001	0,001*
<i>Haemophilus</i>	--	3,164	--	--	--
<i>Mycoplasma</i>	--	0,003	--	--	--
<i>Neisseria</i>	--	5,635	--	--	--
<i>Prevotella</i>	--	0,190	--	--	--
<i>Staphylococcus</i>	28,092	14,163	-2,076	0,634	1,000
<i>Streptococcus</i>	47,594	59,437	0,406	0,644	1,000
<i>Ureaplasma</i>	--	--	--	--	--
<i>Veillonella</i>	10,794	--	--	--	--

Valores representam a porcentagem dos principais gêneros mais abundantes em relação a todas as amostras de saliva dos neonatos. Valor de P baseado no GAMLSS-BEZI (*Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape with a zero inflated beta family*). Os cálculos foram ajustados para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e uso de antibiótico (sim ou não). \*Significância  $\leq 0.05$  após valor ajustado.

**Legenda:** CP (Cuidado Padrão); AC (Administração de Colostro); *Estimate* (valor do teste), FDR (*False Discover Rate*), T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento), -- (ausência do gênero bacteriano no período observado).

#### 6.2.4. Alfa Diversidade

Os resultados dos índices de alfa diversidade nos grupos em relação ao tempo podem ser observados na Tabela 9 e na Figura 9. Em relação ao índice de riqueza de Chao1, observamos uma diminuição significativa na comparação entre o T0 em relação a todos os outros tempos de análise ( $p=0,001$ ). Na interação entre grupos e tempo, é possível identificar

uma tendência de maior riqueza de Chao1 ( $p=0,078$ ). Na comparação em grupo e tempo para o índice de diversidade de Shannon, observamos diminuição entre T0 em comparação a todos os demais tempos de análise ( $p<0,001$ ). Na análise entre grupos, observamos que não há diferenças entre os grupos no T0, mas é possível identificar diminuição significativa neste índice entre T0 e T1 tanto no grupo AC quanto no grupo CP ( $p<0,01$ ). No grupo CP também foi possível constatar diminuição significativa quando comparado o valor observado em T1 comparado a T3 ( $p<0,001$ ). Além disso, houve diferença significativa entre os grupos em T3, com valores maiores do índice de Shannon no grupo CP em relação ao grupo AC ( $p=0,015$ ).

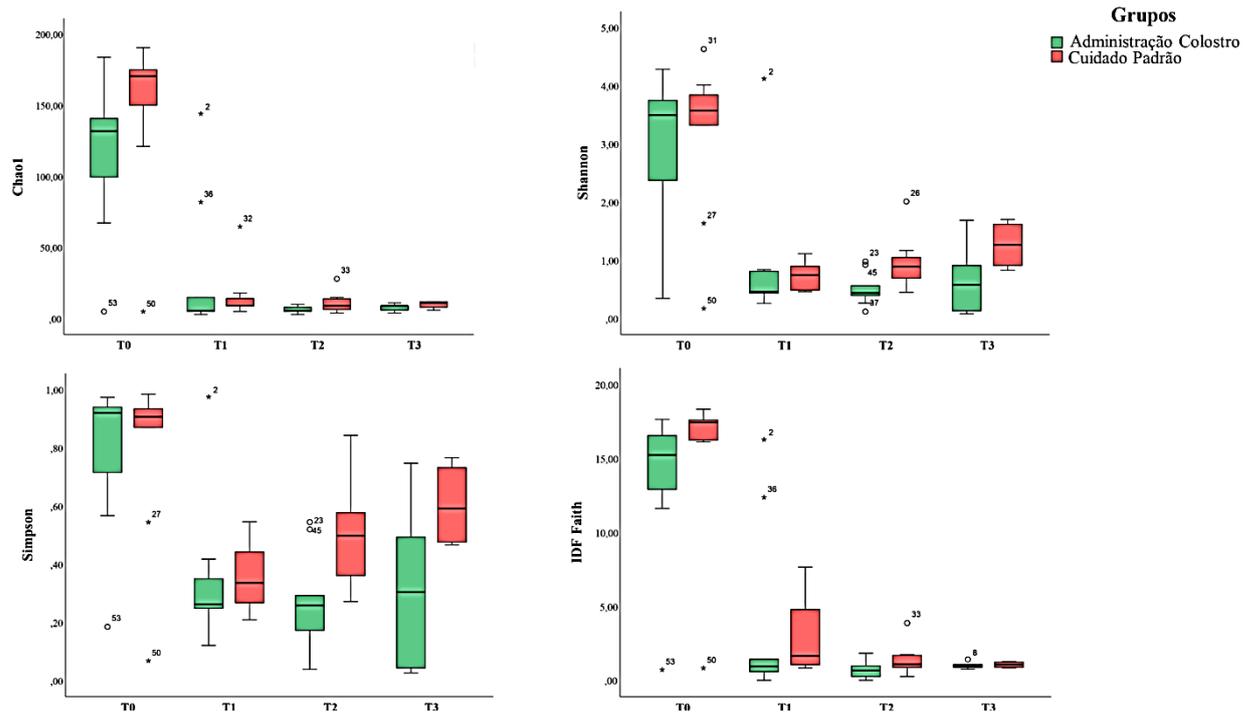
Na análise do índice de Simpson, também identificamos diminuição significativa no T0 em relação aos demais tempos de análise ( $p<0,001$ ). Além disso, houve aumento significativo no T3 em comparação a T2, independente dos grupos. Na interação entre grupo e tempo, não observamos diferenças entre os grupos no T0, e ambos os grupos apresentaram diminuição significativa do T0 ao T1 ( $p<0,001$ ) e do T0 ao T2 ( $p<0,001$  no grupo AC e  $p=0,029$  no grupo CP). No grupo AC, observamos diminuição em T3 em comparação a T0 ( $p=0,015$ ). Por outro lado, o grupo CP apresentou aumento significativo neste índice no T3 em relação ao T1 ( $p<0,001$ ). Na avaliação do índice de diversidade filogenética de Faith, foi possível observar diminuição da diversidade em ambos os grupos ao longo do tempo ( $p <0,001$ ). Na interação entre grupo e tempo, não houve diferenças entre nos grupos no T0, e ambos os grupos apresentaram diminuição significativa do T0 ao T1, T2 e T3 ( $p<0,001$ ).

**Tabela 9.** Índices de alfa diversidade considerando a interação entre grupo/tempo (N=20).

Índices	Média ± erro padrão		Teste de efeitos do modelo					
	AC grupo (n=11)	CP grupo (n=9)	Tempo			Interação		
			Wald <sup>a</sup>	DF	P	Wald <sup>a</sup>	DF	P
Chao1 <sup>#</sup>			63,577	3	<0,0001*	14.165	8	0,078
T0	118,92 ± 15,62	147,31 ± 19,24						
T1	28,59 ± 13,07	16,96 ± 6,09						
T2	6,08 ± 0,71	11,91 ± 3,15						
T3	7,99 ± 1,03	10,04 ± 1,05						
Shannon <sup>#</sup>			27,703	3	<0,0001*	47.600	8	0,0001*
T0	3,01 ± 0,37	3,09 ± 0,46						
T1	0,90 ± 0,34	0,75 ± 0,09						
T2	0,48 ± 0,07	0,93 ± 0,14						
T3	0,62 ± 0,18	1,29 ± 0,07						
Simpson <sup>§</sup>			26,961	3	<0,0001*	40.257	8	0,0001*
T0	0,79 ± 0,07	0,77 ± 0,09						
T1	0,37 ± 0,06	0,35 ± 0,04						
T2	0,25 ± 0,04	0,49 ± 0,06						
T3	0,37 ± 0,06	0,66 ± 0,02						
IDF								
Faith <sup>#</sup>			73,722	3	<0,0001*	15.976	8	0,043*
T0	13,63 ± 1,46	15,20 ± 1,81						
T1	3,62 ± 1,60	3,20 ± 1,07						
T2	0,73 ± 0,16	1,51 ± 0,41						
T3	0,81 ± 0,06	0,97 ± 0,15						

**Legenda:** AC (Administração de Colostro); CP (Cuidado Padrão); DF (Grau de Liberdade); IDF Faith (Índice de Diversidade Filogenética de Faith); T0 (primeira amostra após o nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento); <sup>a</sup> *Wald Chi-Square*.

O valor de P é derivado da análise com o *Generalized Estimating Equations* (GEE), no qual os modelos foram avaliados com <sup>#</sup>distribuição gamma ou <sup>§</sup>distribuição linear. \* Significância foi confirmada com o pós-teste de Sidak. Todos os índices foram ajustados para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e uso de antibióticos (sim ou não).

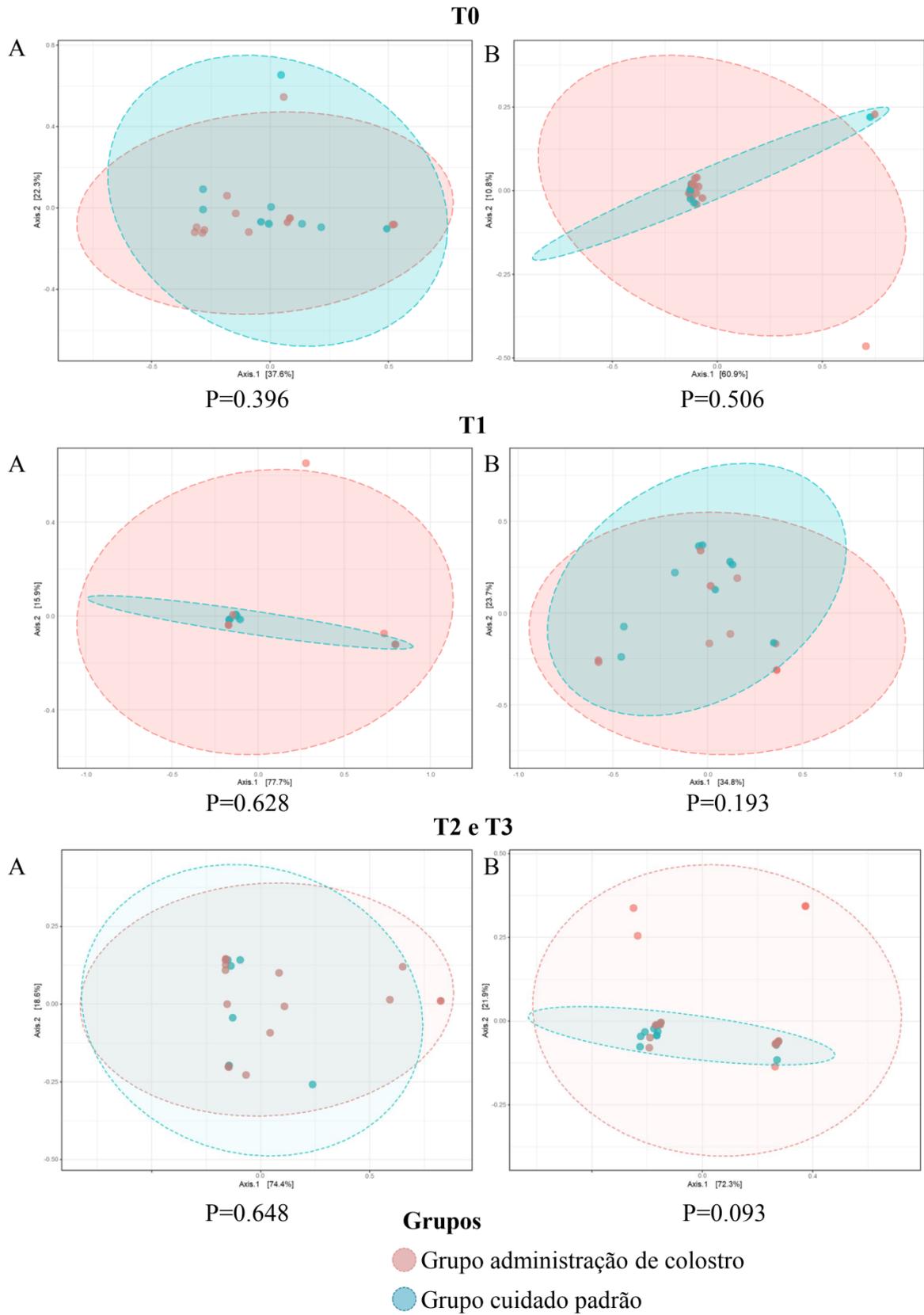


**Figura 9.** Índices de Alfa diversidade em relação ao tempo nas amostras orais

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento).

### 6.2.5. Beta Diversidade

Os resultados em relação a beta diversidade nas amostras de saliva dos recém-nascidos prematuros podem ser observados na Tabelas 10 e 11 e nas Figuras 10 e 11. Na análise de coordenadas principais (PCoA) considerando a diferença entre grupos (Figura 10 e Tabela 10), não observamos diferenças na estrutura filogenética entre os grupos ao longo do tempo, tanto na análise ponderada quanto na análise não ponderada. Na análise de beta diversidade ao longo do tempo dentro de cada grupo (Figura 11 e Tabela 11), observamos em ambos os grupos diferenças significativas na composição da comunidade em cada um dos tempos, na análise ponderada e na análise não ponderada ( $p < 0,001$ ). Adicionalmente, na análise do tempo independente dos grupos, também é possível observar o mesmo padrão, com significância em ambas as análises ( $p < 0,001$ ). Assim, é possível identificar nessa amostra e população como o tempo altera a dinâmica da estrutura dessa comunidade.



**Figura 10.** Beta diversidade entre os grupos ao longo do tempo.

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento), A – análise ponderada, B – análise não ponderada.

**Tabela 10.** Análise da beta diversidade considerando a diferença entre os grupos (AC e CP).

	F	R <sup>2</sup>	P
T0 entre os grupos			
Ponderado	1,0324	0,049086	0,396
Não ponderado	0,8004	0,03848	0,506
T1 entre os grupos			
Ponderado	0,42621	0,02313	0,628
Não ponderado	1,4333	0,073753	0,193
T2-T3 entre os grupos			
Ponderado	0,43115	0,014649	0,648
Não ponderado	2,2452	0,071857	0,093

Valores baseados na análise de PERMANOVA.

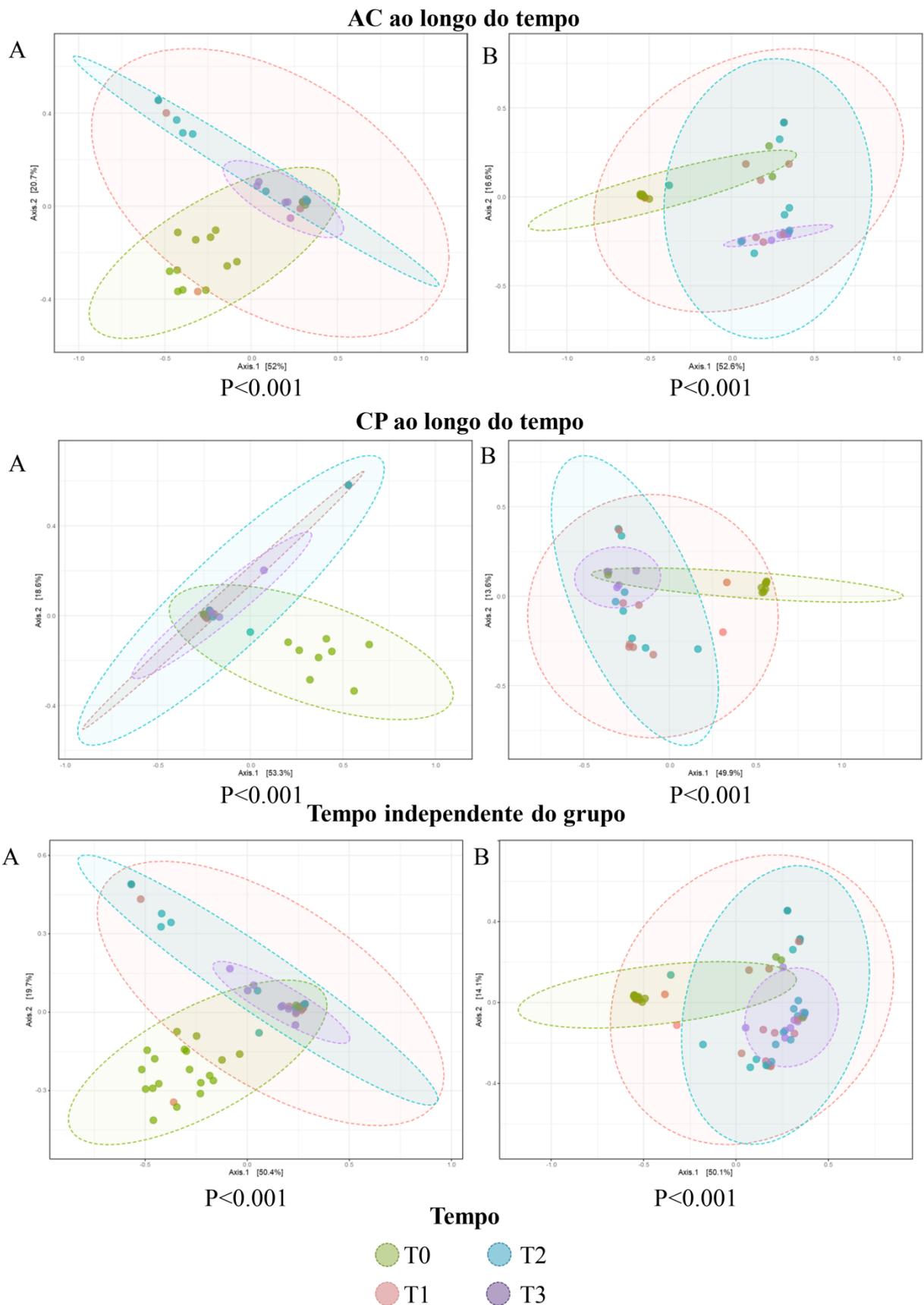
**Legenda:** AC (Administração de Colostro); CP (Cuidado Padrão). T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento).

**Tabela 11.** Análise de beta diversidade considerando a diferença ao longo do tempo, dentro dos grupos (AC e CP).

	F	R <sup>2</sup>	P
AC ao longo do tempo			
Ponderado	4,1664	0,24751	<0,001
Não ponderado	7,0413	0,35728	<0,001
CP ao longo do tempo			
Ponderado	4,1995	0,31816	<0,001
Não ponderado	5,7019	0,38783	<0,001
Tempo independente do grupo			
Ponderado	7,5023	0,24596	<0,001
Não ponderado	11,251	0,32848	<0,001

Valores baseado na análise de PERMANOVA.

**Legenda:** AC (Administração de Colostro); CP (Cuidado Padrão). T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento).

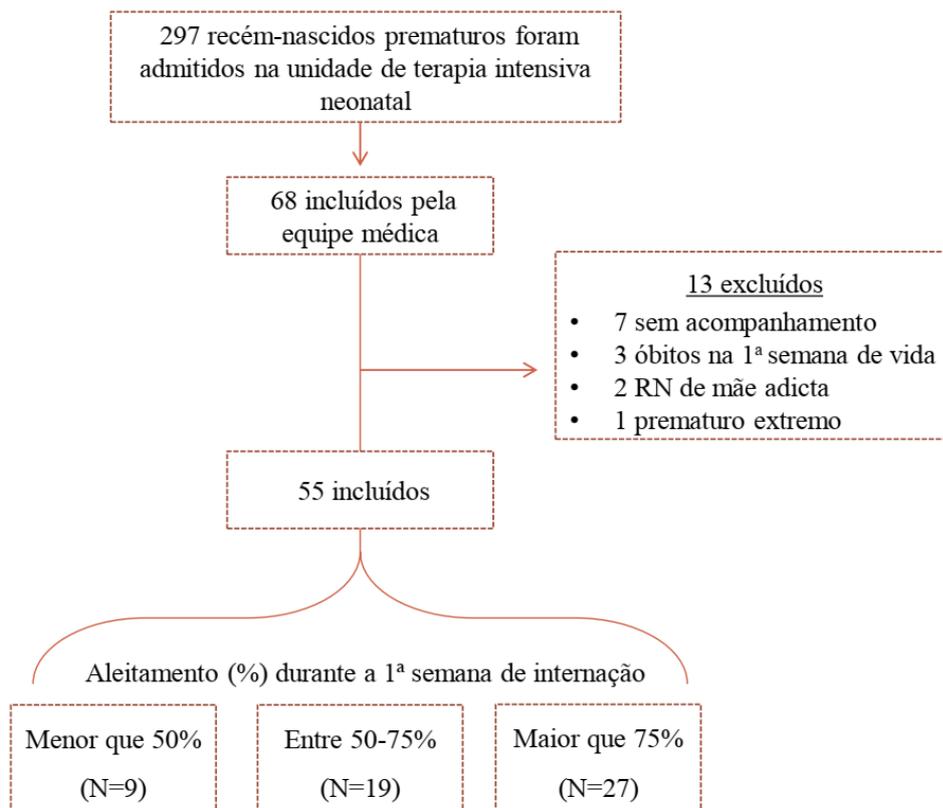


**Figura 11.** Beta diversidade considerando a diferença ao longo do tempo, dentro dos grupos.

**Legenda:** AC (Administração de Colostro), CP (Cuidado Padrão), T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento), A – análise ponderada, B – análise não ponderada.

### 6.3. Microbiota Intestinal

Nesta etapa do estudo, foram incluídos 68 recém-nascidos prematuros dos 297 que foram admitidos na unidade de terapia intensiva neonatal (UTINN). Destes, 13 foram excluídos, totalizando 55 recém-nascidos para a etapa de análise. De acordo com a porcentagem de aleitamento na primeira semana de vida, essa população foi dividida em 3 grupos: o grupo que recebeu menos de 50% de leite materno neste período (grupo < 50% - N=9), o grupo que recebeu entre 50 e 75% de leite materno neste período (grupo 50 – 75% - N=19) e o grupo que recebeu mais de 75% de leite materno neste período (grupo > 75% - N=27). Foram coletadas 150 amostras desta população, e após análise de bioinformática, 141 foram utilizadas para a análise estatística. Os motivos para exclusão de participantes podem ser observados na Figura 12.



**Figura 12.** Fluxograma do processo de coleta das amostras fecais

### 6.3.1. Dados descritivos

Os dados descritivos dos grupos podem ser observados na Tabela 12. Em relação aos dados maternos, não foi observada diferença estatística entre a idade materna média observada entre os grupos ( $p=0,87$ ) e histórico obstétrico ( $p=0,51$ ). Nos grupos, não foi possível identificar diferenças em relação a idade gestacional de nascimento ( $p=0,75$ ), onde os grupos apresentarem médias bem semelhantes (entre 31 e 31 semanas). A maior parte dos recém-nascidos do grupo <50% eram do sexo feminino (55,6%), enquanto a maioria era do sexo masculino no grupo 50–75% e >75% (63,2% e 51,9%, respectivamente) –  $p = 0,60$ ). Em todos os grupos, o parto cesáreo foi o mais prevalente (77,8% no grupo <50%, 84,2% no grupo 50-75% e 77,8% no grupo >75% -  $p=0,85$ ). A ocorrência de sepse foi maior no grupo 50-75% em relação aos demais grupos (15,8%), mas os resultados não apresentarem significância estatística ( $p=0,41$ ). Em relação ao uso de antibioticoterapia, o grupo <50% apresentou porcentagem maior na comparação aos outros grupos (88,9%), mas sem significância estatística ( $p=0,23$ ) Já em relação ao tempo de nutrição parenteral, o grupo <50% apresentou valores significativamente maiores em relação aos demais grupos ( $p<0,001$ ) e o mesmo foi observado na avaliação dos dias de internação na UTINN ( $p=0,03$ )

O peso de nascimento foi maior no grupo 50-75% (1759,36 gramas em média) em relação aos demais grupos, assim como o peso no 7º dia de vida (1645,73 gramas em média) mas os valores não atingiram significância estatística ( $p=0,32$  e  $p=0,08$ , respectivamente). Na comparação de pesos entre os grupos ao 22º dia após o nascimento, observamos que o grupo >75% apresentou maior peso nesse período em comparação aos demais grupos (1646,68 gramas em média), porém os resultados não foram significativos ( $p=0,09$ ).

**Tabela 12. Comparação dos dados descritivos entre os grupos de acordo com a porcentagem de aleitamento durante a primeira semana de internação (N=55)**

Variáveis	Menor que 50% (N=9)	Entre 50-75% (N=19)	Maior que 75% (N=27)	Wald Chi-Square	P
Idade materna (anos) <sup>#</sup>	26,67 ± 2,37	25,79 ± 1,63	26,85 ± 1,36	0,258	0,87
Idade gestacional (semanas) <sup>#</sup>	31,42 ± 0,66	31,95 ± 0,45	31,98 ± 0,38	0,567	0,75
Histórico obstétrico <sup>§</sup>				1,317	0,51
Multíparas	7 (77,8)	12 (63,2)	21 (77,8)		
Primigestas	2 (22,2)	7 (36,8)	6 (22,2)		
Sexo dos recém-nascidos <sup>§</sup>				1,006	0,60
Feminino	5 (55,6)	7 (36,8)	13 (48,1)		
Masculino	4 (44,4)	12 (63,2)	14 (51,9)		
Tipo de parto <sup>§</sup>				0,319	0,85
Cesárias	7 (77,8)	16 (84,2)	21 (77,8)		
Vaginal	2 (22,2)	3 (15,8)	6 (22,2)		
Sepse <sup>§</sup>				1,750	0,41
Sim	1 (11,1)	3 (15,8)	1 (3,7)		
Não	8 (88,9)	16 (84,2)	26 (96,3)		
Use de antibióticos <sup>§</sup>				2,922	0,23
Sim	8 (88,9)	10 (52,6)	16 (59,3)		
Não	1 (11,1)	9 (47,4)	11 (40,7)		
Tempo de nutrição parenteral (dias)	13,78 ± 1,91	3,95 ± 1,31	1,22 ± 1,10	32,378	<0,0001 <sup>**†</sup>
Peso ao nascimento (gramas)	1570,88 ± 124,53	1759,36 ± 85,70	1613,81 ± 71,89	2,265	0,32
Peso no 7º dia de vida (gramas)	1349,11 ± 112,98	1645,73 ± 77,76	1507,59 ± 65,23	4,896	0,08
Peso no 22º dia de vida (gramas) <sup>¥</sup>	1476,25 ± 84,06	1451,50 ± 84,06	1646,68 ± 59,44	4,772	0,09
Dias na UTINN	23,22 ± 3,92	13,32 ± 2,69	11,78 ± 2,26	6,543	0,03 <sup>*</sup>

Valores apresentados como <sup>#</sup>média ± erro padrão; <sup>§</sup>número (porcentagem). Valor de P baseado no *Generalized Linear Model* (GzLM) com <sup>#</sup>distribuição linear e <sup>§</sup>distribuição logística binária. **Legenda:** UTINN (Unidade de Terapia Intensiva Neonatal). <sup>¥</sup>27 recém-nascidos já haviam recebido alta hospitalar antes de completar 22 dias de internação.

\*Diferença significativa na comparação entre o grupo com <50% de aleitamento em comparação com o grupo entre 50-75%.

† Diferença significativa na comparação entre o grupo com <50% de aleitamento em comparação com o grupo com >75%.

£ Diferença significativa na comparação entre o grupo entre 50-75% de aleitamento em comparação com o grupo com >75%.

### 6.3.2. Alimentação enteral

Os resultados referentes à alimentação por via enteral (tanto por via oral quanto por sonda) realizada durante a primeira semana de vida nos grupos durante a internação hospitalar podem ser observados na Tabela 13. A alimentação de todos os grupos foi constituída majoritariamente por leite pasteurizado, porém com valores maiores no grupo >75% (81,8%) em relação aos demais grupos (56,9% no grupo 50-75% e 29,8% no grupo <50%). Além de leite pasteurizado, a alimentação dos grupos foi constituída por leite cru, o qual foi mais prevalente no grupo 50-75% (8,2%) em relação aos demais grupos (5,5% no grupo >75% e 1,3% no grupo <50%). Além disso, fórmula infantil foi administrada somente nos grupos 50-75% e >75%, com maior prevalência no grupo 50-75% (8,9%). No total, a alimentação enteral representou apenas 31,1% da alimentação do grupo <50% na primeira semana de vida, 74% da alimentação do grupo 50-75% e 87,7% do grupo >75% no mesmo período, em relação ao total de oportunidades de alimentação.

**Tabela 13.** Porcentagem de aleitamento enteral durante os sete primeiros dias de vida (n=55).

<b>Tipo de aleitamento</b>	<b>Grupo menos que 50% de aleitamento (n=9)</b>	<b>Grupo entre 50-75% de aleitamento (n=19)</b>	<b>Grupo com mais de 75% de aleitamento (n=27)</b>
Leite cru	1,3 ± 1,5	8,2 ± 8,6	5,5 ± 7,8
Leite pasteurizado	29,8 ± 7,6	56,9 ± 7,9	81,8 ± 8,6
Fórmula infantil	0	8,9 ± 11,8	0,4 ± 1,9
Média total	31,1%	74,0%	87,7%

Valores apresentados como porcentagem média ± desvio padrão.

Na tabela 14 é possível observar a alimentação dos grupos após o 7º dia de vida até a alta hospitalar. Neste período, o leite pasteurizado foi a principal fonte de alimentação em todos os grupos, com média maior no grupo 50-75% (81,2%) em relação ao grupo <50% (61,7%) e ao grupo >75% (69,5%). A alimentação enteral neste período também foi constituída por leite cru, o qual foi mais prevalente no grupo 50-75% (8,6%) em relação ao grupo <50% (4,17%) e ao grupo >75% (7,5%), e por fórmula infantil, a qual constituiu 14,5% da alimentação do grupo

<50%, 7,4% do grupo 50-75% e 17,4% da alimentação do grupo >75%. No total, a alimentação enteral neste período representou 80,3% da alimentação do grupo <50%, 97,3% do grupo 50-75% e 94,5% do grupo >75%, em relação ao total de oportunidades de alimentação.

**Tabela 14.** Porcentagem de aleitamento enteral após a 1ª semana de vida (n=36).

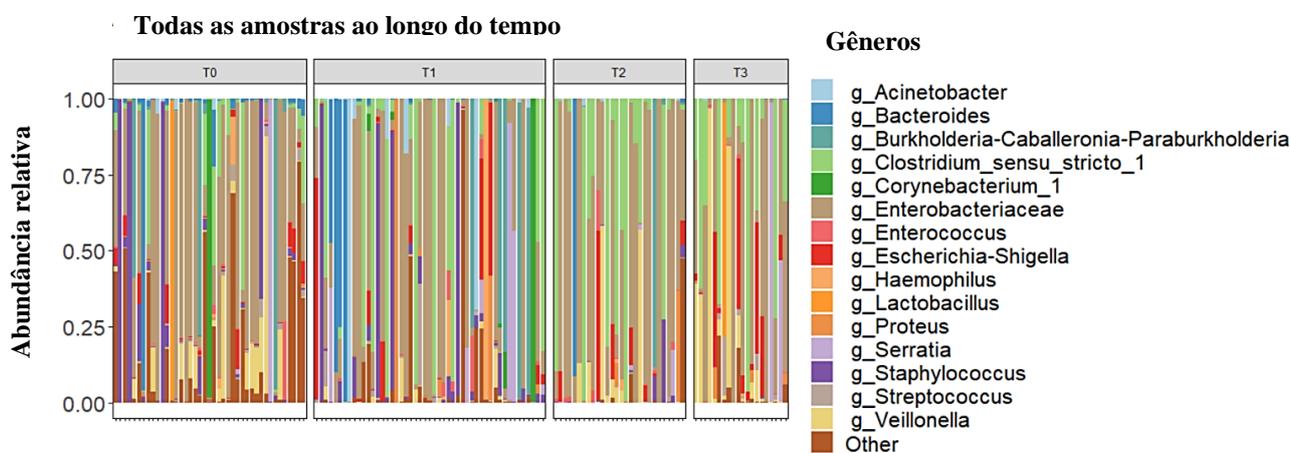
Tipo de aleitamento	Grupo menos que 50% de aleitamento (n=8)	Grupo entre 50-75% de aleitamento (n=7)	Grupo com mais de 75% de aleitamento (n=21)
Leite cru	4,1 ± 6,2	8,6 ± 9,2	7,5 ± 10,1
Leite pasteurizado	61,7 ± 29,5	81,2 ± 22,8	69,5 ± 23,9
Fórmula infantil	14,5 ± 26,0	7,4 ± 18,2	17,4 ± 19,0
Média total	80,3%	97,3%	94,5%

Valores apresentados como porcentagem média ± desvio padrão. Da amostra total, 19 crianças receberam alta antes de completar 14 dias de internação.

### 6.3.3. Abundância relativa

#### Comparação entre os grupos

A análise estatística e distribuição dos 15 gêneros bacterianos mais abundantes nas amostras de fezes entre os grupos em relação aos tempos de coleta (1-5 dias de vida, 6-11 dias de vida, 15-22 dias de vida e mais de 22 dias de vida) podem ser observados nas Tabelas 15 a 18 e nas Figuras 13 e 14.



**Figura 13.** Relação dos principais gêneros observados na população ao longo do tempo

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento).

**Tabela 15. Comparação entre os principais gêneros bacterianos intestinais observados no T0 (N=55)**

1ª amostra de fezes	<50% <sup>A</sup> (N=9)	50-75% <sup>B</sup> (N=19)	>75% <sup>C</sup> (N=27)	A x B			A x C			B x C		
				<i>Estimate</i>	P	P (FDR)	<i>Estimate</i>	P	P (FDR)	<i>Estimate</i>	P	P (FDR)
<i>Acinetobacter</i>	0,034	0,337	0,542	0,393	0,60	1,00	0,659	0,30	1,00	0,266	0,60	1,00
<i>Bacteroides</i>	14,905	0,893	1,607	-1,487	0,02	0,29	-1,351	0,02	0,42	0,136	0,73	1,00
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0,090	5,242	8,321	1,357	0,14	1,00	1,387	0,07	1,00	0,030	0,96	1,00
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	9,886	4,366	6,167	-0,523	0,37	1,00	-0,169	0,74	1,00	0,353	0,37	1,00
<i>Corynebacterium_1</i>	0,024	7,567	0,011	0,944	0,46	1,00	0,335	0,72	1,00	0,135	0,76	1,00
<i>Enterobacteriaceae#</i>	34,796	41,175	40,423	-0,173	0,79	1,00	-0,039	0,95	1,00	-0,233	0,55	1,00
<i>Enterococcus</i>	0,177	2,149	0,275	0,086	0,88	1,00	-0,146	0,79	1,00	0,045	0,91	1,00
<i>Escherichia-Shigella</i>	2,114	1,849	2,068	0,029	0,96	1,00	0,073	0,89	1,00	0,053	0,90	1,00
<i>Haemophilus</i>	0,060	0,106	1,014	0,125	0,83	1,00	0,178	0,74	1,00	-0,005	0,99	1,00
<i>Lactobacillus</i>	0,037	0,048	4,730	0,083	0,93	1,00	0,078	0,93	1,00	-0,895	0,14	0,86
<i>Proteus</i>	0,009	0,054	0,059	0,361	0,76	1,00	-0,534	0,64	1,00	0,036	0,96	1,00
<i>Serratia</i>	0,031	0,074	4,844	1,372	0,31	1,00	1,408	0,21	1,00	0,009	0,98	1,00
<i>Staphylococcus</i>	15,005	8,639	10,047	-0,073	0,91	1,00	-0,064	0,91	1,00	-0,027	0,94	1,00
<i>Streptococcus</i>	0,258	0,737	0,934	0,202	0,70	1,00	0,175	0,73	1,00	-0,039	0,93	1,00
<i>Veillonella</i>	4,139	10,957	5,257	0,032	0,96	1,00	-0,007	0,99	1,00	-0,609	0,46	1,00

Valores representam a porcentagem dos 15 principais gêneros encontrados nas amostras fecais dos neonatos. Valor de P baseado no GAMLSS-BEZI (*Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape with a zero inflated beta family*). P (FDR): valor de P ajustado para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e uso de antibiótico (sim ou não). \*Significância  $\leq 0.05$  após valor ajustado.

**Legenda:** A (Grupo com menos de 50% de aleitamento), B (Grupo entre 50-75% de aleitamento), C (Grupo com mais de 75% de aleitamento). *Estimate* (valor do teste), FDR (*False Discovery Rate*), -- (ausência do gênero bacteriano no período observado); # Família Enterobacteriaceae.

**Tabela16. Comparação entre os principais gêneros bacterianos intestinais observados em T1 (N=55)**

6 - 11 dias após o nascimento	<50% <sup>A</sup> (N=9)	50-75% <sup>B</sup> (N=19)	>75% <sup>C</sup> (N=27)	A x B			A x C			B x C		
				<i>Estimate</i>	P	P (FDR)	<i>Estimate</i>	P	P (FDR)	<i>Estimate</i>	P	P (FDR)
<i>Acinetobacter</i>	0,084	0,880	8,290	-0,233	0,76	1,00	0,025	0,97	1,00	0,2584	0,63	1,00
<i>Bacteroides</i>	18,572	5,666	3,151	-0,116	0,85	1,00	-0,269	0,63	1,00	-0,1526	0,76	1,00
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	10,505	4,625	10,717	0,083	0,94	1,00	0,894	0,24	1,00	0,8117	0,42	1,00
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	1,497	19,127	20,301	0,277	0,69	1,00	0,216	0,72	1,00	-0,0610	0,90	1,00
<i>Corynebacterium_1</i>	14,036	0,254	0,240	-1,099	0,34	1,00	-1,881	0,07	0,61	-0,7820	0,47	1,00
<i>Enterobacteriaceae#</i>	15,776	36,495	27,627	0,942	0,10	0,70	0,711	0,17	1,00	-0,2305	0,56	1,00
<i>Enterococcus</i>	0,029	0,487	1,613	0,317	0,72	1,00	0,389	0,68	1,00	0,0721	0,87	1,00
<i>Escherichia-Shigella</i>	7,849	6,264	2,304	-1,161	0,10	0,70	-1,592	0,02	0,22	-0,4301	0,32	1,00
<i>Haemophilus</i>	12,388	0,093	1,020	-0,611	0,48	1,00	-0,744	0,38	1,00	-0,1335	0,84	1,00
<i>Lactobacillus</i>	0,026	0,002	0,005	-0,417	0,65	1,00	0,173	0,88	1,00	0,5898	0,61	1,00
<i>Proteus</i>	5,187	6,774	0,134	-1,029	0,53	1,00	-2,062	0,20	1,00	-1,0329	0,12	1,00
<i>Serratia</i>	4,720	3,544	4,973	-2,295	1,00	1,00	-2,385	1,00	1,00	-0,0909	0,95	1,00
<i>Staphylococcus</i>	0,694	13,078	9,929	0,350	0,57	1,00	0,236	0,67	1,00	-0,1133	0,77	1,00
<i>Streptococcus</i>	0,141	0,947	1,503	-0,241	0,74	1,00	-0,298	0,68	1,00	-0,0574	0,89	1,00
<i>Veillonella</i>	1,737	1,343	0,410	-0,298	0,60	1,00	-0,603	0,29	1,00	-0,3055	0,47	1,00

Valores representam a porcentagem dos 15 principais gêneros encontrados nas amostras fecais dos neonatos. Valor de P baseado no GAMLSS-BEZI (*Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape with a zero inflated beta family*). P (FDR): valor de P ajustado para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e uso de antibiótico (sim ou não). \*Significância  $\leq 0.05$  após valor ajustado.

**Legenda:** A (Grupo com menos de 50% de aleitamento), B (Grupo entre 50-75% de aleitamento), C (Grupo com mais de 75% de aleitamento). *Estimate* (valor do teste), FDR (*False Discover Rate*), -- (ausência do gênero bacteriano no período observado); # Família Enterobacteriaceae.

**Tabela 17. Comparação entre os principais gêneros bacterianos intestinais observados em T2 (N=55)**

15 - 22 dias após o nascimento	<50% <sup>A</sup> (N=9)	50-75% <sup>B</sup> (N=19)	>75% <sup>C</sup> (N=27)	A x B			A x C			B x C		
				<i>Estimate</i>	P	P (FDR)	<i>Estimate</i>	P	P (FDR)	<i>Estimate</i>	P	P (FDR)
<i>Acinetobacter</i>	0,058	0,002	0,241	-1,228	0,35	1,00	0,514	0,53	1,00	1,741	0,11	0,58
<i>Bacteroides</i>	15,454	0,010	0,010	-5,980	<0,001	<0,001*	-3,399	<0,001	0,01*	2,581	0,01	0,11
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	14,838	0,381	0,008	-0,422	0,77	1,00	-1,992	0,13	0,42	-1,570	0,08	0,50
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	2,156	32,253	31,202	-0,103	0,91	1,00	0,463	0,46	1,00	0,566	0,44	1,00
<i>Corynebacterium_1</i>	0,014	0,001	0,001	-1,251	1,00	1,00	-2,131	1,00	1,00	-0,880	1,00	1,00
<i>Enterobacteriaceae#</i>	49,654	57,344	50,121	1,075	0,22	1,00	0,336	0,59	1,00	-0,739	0,31	1,00
<i>Enterococcus</i>	0,239	0,970	1,154	0,932	0,22	1,00	-0,107	0,85	1,00	-1,039	0,08	0,50
<i>Escherichia-Shigella</i>	6,198	0,005	4,319	-1,708	1,00	1,00	1,145	0,00	0,02*	2,853	1,00	1,00
<i>Haemophilus</i>	0,024	0,005	0,302	-5,086	0,47	1,00	-1,287	0,77	1,00	3,799	0,17	0,80
<i>Lactobacillus</i>	0,011	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Proteus</i>	--	--	2,628	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Serratia</i>	0,015	3,026	0,202	7,163	<0,001	<0,001*	2,893	<0,001	<0,001*	-4,270	<0,001	<0,001*
<i>Staphylococcus</i>	2,002	5,973	0,154	1,069	0,19	1,00	-0,802	0,20	0,59	-1,871	0,01	0,07
<i>Streptococcus</i>	0,068	0,00018	0,156	-0,586	0,68	1,00	0,125	0,85	1,00	0,711	0,54	1,00
<i>Veillonella</i>	1,013	0,011	8,879	-1,031	0,37	1,00	0,188	0,79	1,00	1,220	0,21	0,85

Valores representam a porcentagem dos 15 principais gêneros encontrados nas amostras fecais dos neonatos. Valor de P baseado no GAMLSS-BEZI (*Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape with a zero inflated beta family*). P (FDR): valor de P ajustado para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e uso de antibiótico (sim ou não). \*Significância  $\leq 0.05$  após valor ajustado.

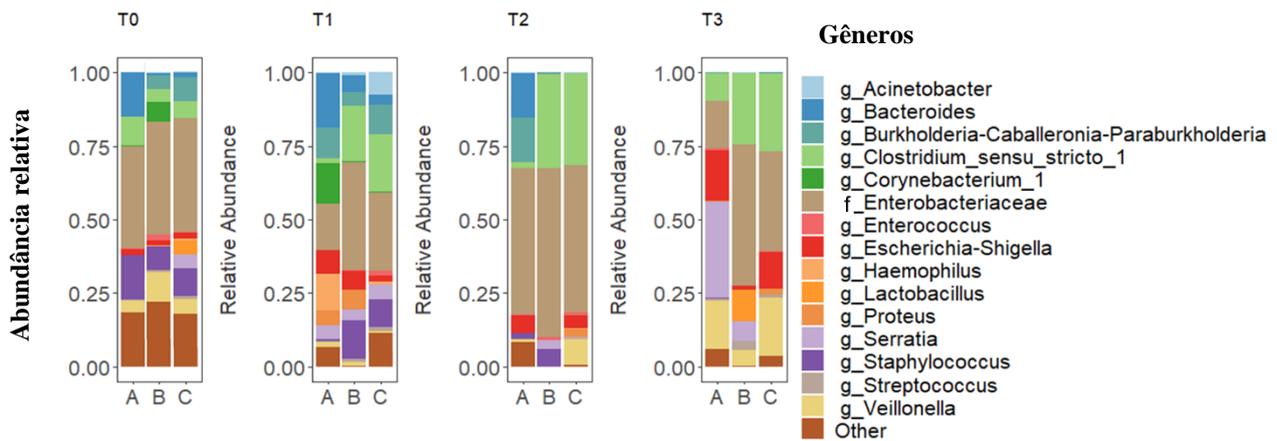
**Legenda:** A (Grupo com menos de 50% de aleitamento), B (Grupo entre 50-75% de aleitamento), C (Grupo com mais de 75% de aleitamento). *Estimate* (valor do teste), FDR (*False Discover Rate*), -- (ausência do gênero bacteriano no período observado); # Família Enterobacteriaceae.

**Tabela 18. Comparação entre os principais gêneros bacterianos intestinais observados em T3 (N=55)**

+22 dias após o nascimento	<50% <sup>A</sup> (N=9)	50-75% <sup>B</sup> (N=19)	>75% <sup>C</sup> (N=27)	A x B			A x C			B x C		
				<i>Estimate</i>	P	P (FDR)	<i>Estimate</i>	P	P (FDR)	<i>Estimate</i>	P	P (FDR)
<i>Acinetobacter</i>	--	0,097	0,025	--	--	--	--	--	--	-33,188	<0,001	0,04*
<i>Bacteroides</i>	0,040	0,008	0,034	0,289	0,81	1,00	0,577	0,74	1,00	0,288	0,89	1,00
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0,087	0,044	--	0,126	<0,001	<0,001*	--	--	--	--	--	--
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	9,638	24,219	26,837	-0,769	0,52	1,00	-0,859	0,48	1,00	-0,089	0,91	1,00
<i>Corynebacterium_1</i>	--	--	0,003	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Enterobacteriaceae#</i>	16,054	47,970	33,799	0,965	0,33	1,00	0,004	1,00	1,00	-0,961	0,18	1,00
<i>Enterococcus</i>	0,472	0,069	0,200	-1,835	0,20	1,00	-0,606	0,63	1,00	1,229	0,03	0,25
<i>Escherichia-Shigella</i>	17,260	1,292	12,689	-1,921	0,09	1,00	0,183	0,85	1,00	2,105	0,01	0,11
<i>Haemophilus</i>	--	0,001	0,060	--	--	--	--	--	--	-7,764	0,01	0,11
<i>Lactobacillus</i>	--	11,022	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Proteus</i>	0,359	--	1,795	--	--	--	0,221	<0,001	<0,001*	--	--	--
<i>Serratia</i>	32,758	6,628	0,051	-5,046	1,00	1,00	-2,399	1,00	1,00	2,647	0,52	1,00
<i>Staphylococcus</i>	0,072	0,019	0,052	0,073	0,93	1,00	0,098	0,92	1,00	0,026	0,97	1,00
<i>Streptococcus</i>	0,656	3,039	0,958	3,066	<0,001	0,01*	2,654	0,01	0,23	-0,412	0,56	1,00
<i>Veillonella</i>	16,585	5,406	20,010	-0,355	0,71	1,00	0,253	0,80	1,00	0,608	0,42	1,00

Valores representam a porcentagem dos 15 principais gêneros encontrados nas amostras fecais dos neonatos. Valor de P baseado no GAMLSS-BEZI (*Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape with a zero inflated beta family*). P (FDR): valor de P ajustado para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e uso de antibiótico (sim ou não). \*Significância  $\leq 0.05$  após valor ajustado.

**Legenda:** A (Grupo com menos de 50% de aleitamento), B (Grupo entre 50-75% de aleitamento), C (Grupo com mais de 75% de aleitamento). *Estimate* (valor do teste), FDR (*False Discover Rate*), -- (ausência do gênero bacteriano no período observado); # Família Enterobacteriaceae.



**Figura 14.** Relação dos principais gêneros bacterianos observados nos grupos e nos tempos.

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento), A (Grupo menos de 50%), B (Grupo entre 50-75%), C (Grupo mais de 75%).

Os gêneros mais prevalentes nos grupos na variação do 1º ao 5º dia de vida (T0) foram *Staphylococcus*, com maior abundância no grupo <50% (15,00%); *Veillonella*, com maior abundância no grupo 50-75% (10,95%); *Clostridium sensu stricto 1*, com maior abundância no grupo <50% (9,88%), e *Bacteroides*, mais abundante no grupo <50% (14,90%). Além disso, a família Enterobacteriaceae (onde alguns gêneros não foram diferenciados através da análise realizada) apresentou grande prevalência em todos os grupos, com maior abundância no grupo 50-75%. Após a análise estatística, somente a maior abundância de *Bacteroides* apresentou significância estatística em relação aos demais grupos ( $p=0,02$ ), que não se manteve com o valor de  $p$  ajustado ( $p=0,29$  na comparação com o grupo 50-75% e  $p=0,42$  em comparação com o grupo >75%). As demais análises não apresentaram significância estatística (Tabela 15). Na comparação entre os grupos entre 6-11 dias de vida (T1) (Tabela 16), identificamos maior abundância de *Bacteroides* (18,57%), *Corynebacterium 1* (14,03%) e *Haemophilus* (12,38%) no grupo <50%, *Staphylococcus* (13,07%), Enterobacteriaceae (36,49%) e *Proteus* (6,77%) no grupo 50-75% e *Clostridium sensu stricto 1* (20,30%), *Acinetobacter* (8,29%) e *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (10,71%) no grupo >75%. Após análise estatística, os

resultados não atingiram significância estatística. Vale ressaltar que a abundância de *Escherichia-Shigella* apresentou valores maiores no grupo <50% (7,84%) em relação ao grupo >75% (2,30%) –  $p=0,02$ , mas o resultado significativo não se manteve após ajuste do valor de  $p$  ( $p=0,22$ ).

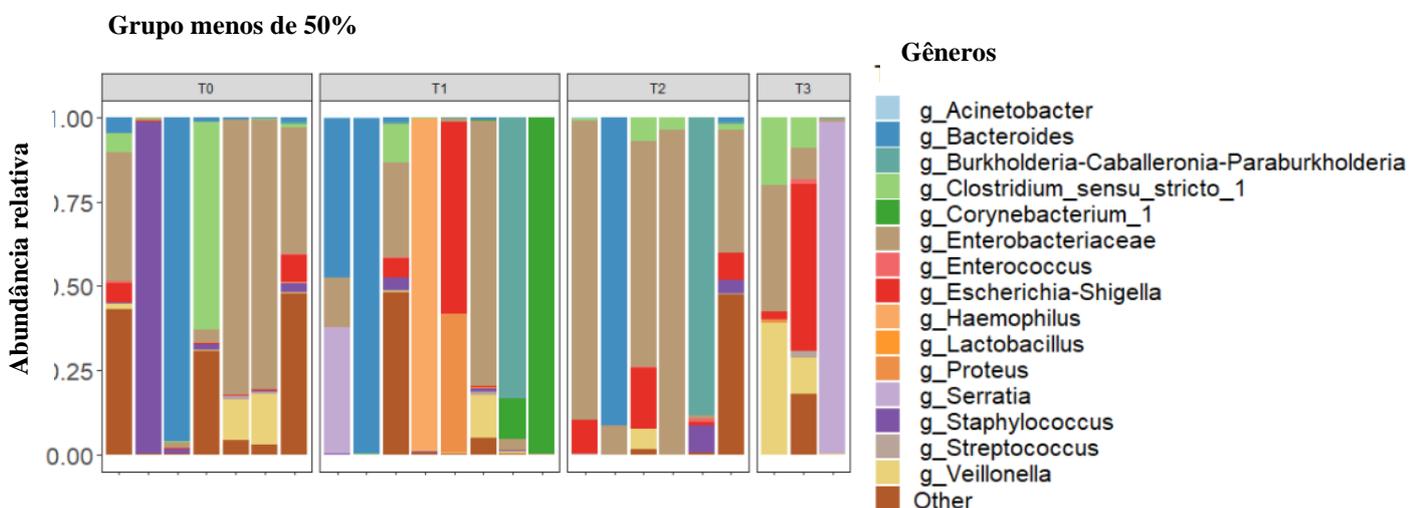
Em T2 (15 a 22 dias de vida) (Tabela 17), a maior abundância foi de Enterobacteriaceae em todos os grupos, com maior prevalência no grupo 50-75% (57,34%), mas sem significância nas comparações entre os grupos ( $p=1,00$  para todas as comparações). Identificamos uma abundância significativamente maior de *Bacteroides* no grupo <50% (15,45%) na comparação com o grupo 50-75% ( $p<0,001$ ) e na comparação com o grupo >75% ( $p<0,01$ ). Adicionalmente, observamos uma prevalência menor de *Serratia* no grupo <50% (0,015%) na comparação com o grupo 50-75% ( $p<0,001$ ) e com o grupo >75% ( $p<0,001$ ), e maior prevalência do mesmo gênero no grupo 50-75% (3,02%) em comparação com o grupo >75% (0,20%) –  $p<0,001$ . A abundância de *Staphylococcus* foi significativamente maior no grupo 50-75% (5,97%) em relação ao grupo >75% (0,15%) –  $p=0,01$ , mas a significância não se manteve após o ajuste do valor de  $p$  ( $p=0,07$ ).

Após o 22º dia de vida (T3) (Tabela 18), o gênero mais dominante no grupo <50% foi *Serratia* (32,75%), enquanto no grupo 50-75% e >75% foi Enterobacteriaceae (47,97% e 33,79%, respectivamente), mas os resultados não atingiram significância estatística. Além disso, identificamos uma maior abundância de *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* no grupo <50% em relação ao grupo 50-75% (0,087% e 0,044%, respectivamente –  $p<0,001$ ). No grupo 50-75%, observamos maior prevalência de *Streptococcus* em relação ao grupo <50% (3,03% e 0,65%, respectivamente –  $p <0,01$ ) e maior abundância de *Acinetobacter* em relação ao grupo >75% (0,097% e 0,025%, respectivamente –  $p=0,04$ ). No grupo >75%, foi possível observar maior abundância de *Proteus* em relação ao grupo <50% (1,79% e 0,35%, respectivamente –  $p<0,001$ ) e de *Streptococcus* (0,95% e 0,65%, respectivamente), mas o

resultado não manteve a significância estatística ( $p=0,23$ ). Adicionalmente, identificamos maiores abundâncias de *Esterococcus*, *Escherichia-Shigella* e *Haemophilus* no grupo >75% em comparação com o grupo 50-75%, mas a significância estatística não se manteve com os valores de  $p$  ajustado ( $p=0,25$ ,  $p=0,11$  e  $p=0,11$ , respectivamente).

### Efeito do tempo em cada um dos grupos

A análise para comparar o efeito do tempo nos principais gêneros bacterianos do grupo <50% pode ser observada na Figura 15 e Tabela 19. Podemos observar que, no T1 em relação ao T0 ocorreu aumento de *Proteus* (5,18% e 0,009%, respectivamente –  $p<0,01$ ); o mesmo é observado ao compararmos o T3 com o T0 (0,35% e 0,009%, respectivamente –  $p<0,01$ ). Adicionalmente, ao observarmos o T3 em relação ao T0, observamos aumento de *Serratia* (32,75% e 0,03%, respectivamente –  $p=0,03$ ).



**Figura 15.** Relação dos principais gêneros bacterianos observados no grupo com menos de 50% de aleitamento considerando os momentos de avaliação.

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento).

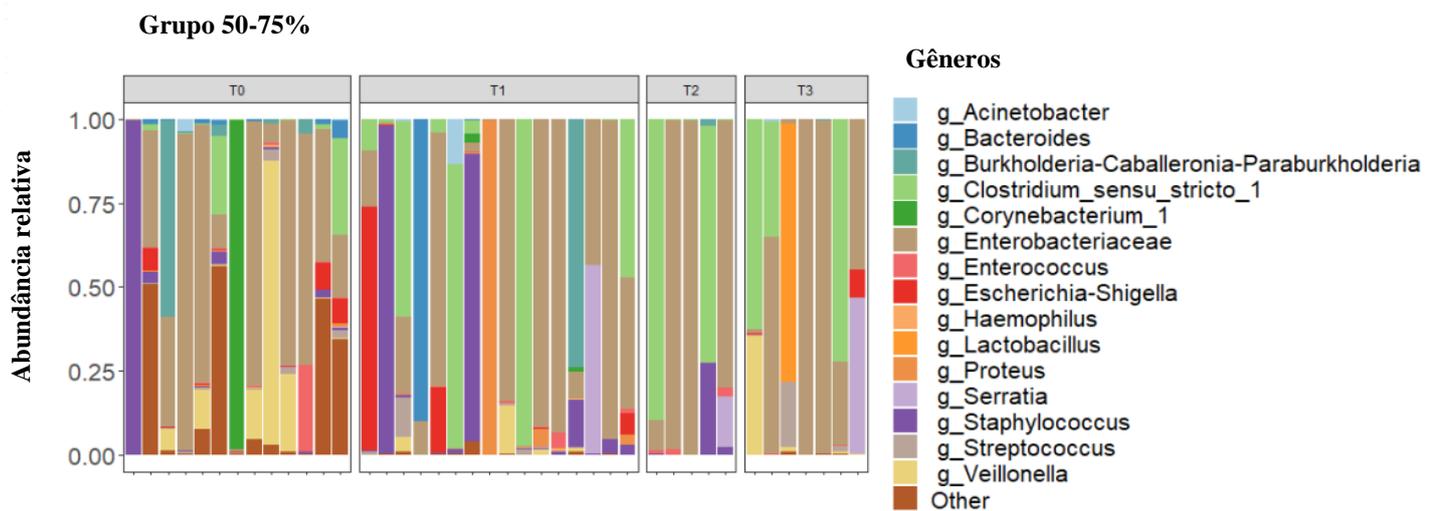
**Tabela 19. Comparação entre os principais gêneros bacterianos no grupo com menos de 50% de aleitamento com o passar do tempo (N=9)**

Grupo com menos de 50% de aleitamento	T0	T1	T2	T3	T0 x T1			T0 x T2			T0 x T3		
					Estimate	P	P (FDR)	Estimate	P	P (FDR)	Estimate	P	P (FDR)
<i>Acinetobacter</i>	0,034	0,084	0,058	--	0,804	0,32	1,00	1,033	0,26	0,77	--	--	--
<i>Bacteroides</i>	14,905	18,572	15,454	0,040	-0,514	0,42	1,00	-0,416	0,63	1,00	-0,992	0,31	1,00
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0,090	10,505	14,838	0,087	0,617	0,44	1,00	1,189	0,19	0,68	-0,327	0,81	1,00
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	9,886	1,497	2,156	9,638	-0,169	0,78	1,00	0,049	0,93	1,00	1,207	0,13	1,00
<i>Corynebacterium_1</i>	0,024	14,036	0,014	--	1,674	0,09	0,48	-0,013	0,99	1,00	--	--	--
<i>Enterobacteriaceae#</i>	34,796	15,776	49,654	16,054	-0,746	0,21	0,88	1,070	0,10	0,47	-0,542	0,49	1,00
<i>Enterococcus</i>	0,177	0,029	0,239	0,472	-0,339	0,65	1,00	0,345	0,49	0,96	0,161	0,81	1,00
<i>Escherichia-Shigella</i>	2,114	7,849	6,198	17,260	0,877	0,24	0,97	0,924	0,16	0,65	1,416	0,09	1,00
<i>Haemophilus</i>	0,060	12,388	0,024	--	0,474	0,57	1,00	-0,051	0,95	1,00	--	--	--
<i>Lactobacillus</i>	0,037	0,026	0,011	--	0,062	0,93	1,00	-0,405	0,69	1,00	--	--	--
<i>Proteus</i>	0,009	5,187	--	0,359	7,217	<0,01	<0,01*	--	--	--	4,453	<0,01	<0,01*
<i>Serratia</i>	0,031	4,720	0,015	32,758	0,720	0,48	1,00	0,060	0,96	1,00	5,304	<0,01	0,03*
<i>Staphylococcus</i>	15,005	0,694	2,002	0,072	-0,427	0,50	1,00	-0,202	0,80	1,00	-0,852	0,28	1,00
<i>Streptococcus</i>	0,258	0,141	0,068	0,656	0,212	0,72	1,00	-0,545	0,32	0,77	0,065	0,93	1,00
<i>Veillonella</i>	4,139	1,737	1,013	16,585	-0,164	0,80	1,00	-0,413	0,59	1,00	1,063	0,10	1,00

Valores representam a porcentagem dos 15 principais gêneros mais abundantes em relação a todas as amostras fecais dos neonatos. Valor de P baseado no GAMLSS-BEZI (*Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape with a zero inflated beta family*). P (FDR): valor de P ajustado para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e uso de antibiótico (sim ou não). \*Significância  $\leq 0.05$  após valor ajustado.

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento). *Estimate* (valor do teste), FDR (*False Discover Rate*); -- (ausência do gênero bacteriano no período observado); # Família Enterobacteriaceae.

Os dados da comparação onde observamos o efeito do tempo nos principais gêneros bacterianos do grupo 50-75% pode ser observada na Figura 16 e Tabela 20. Podemos observar que, no T1 em relação ao T0 ocorreu aumento de *Acinetobacter* (0,88% e 0,33%, respectivamente –  $p=0,05$ ); também é possível observar aumento na abundância de *Bacteroides* no mesmo período ( $p=0,02$ ), mas a significância não se mantém após o ajuste para variáveis confundidoras ( $p=0,27$ ). Entre T2 e T0, observamos diminuição na abundância de *Bacteroides* ( $p=0,03$ ), que não é mantida após ajustes ( $p=0,91$ ). Já na comparação entre T3 e T0, identificamos aumento de *Lactobacillus* (11,02 e 0,048%, respectivamente –  $p=0,01$ ).



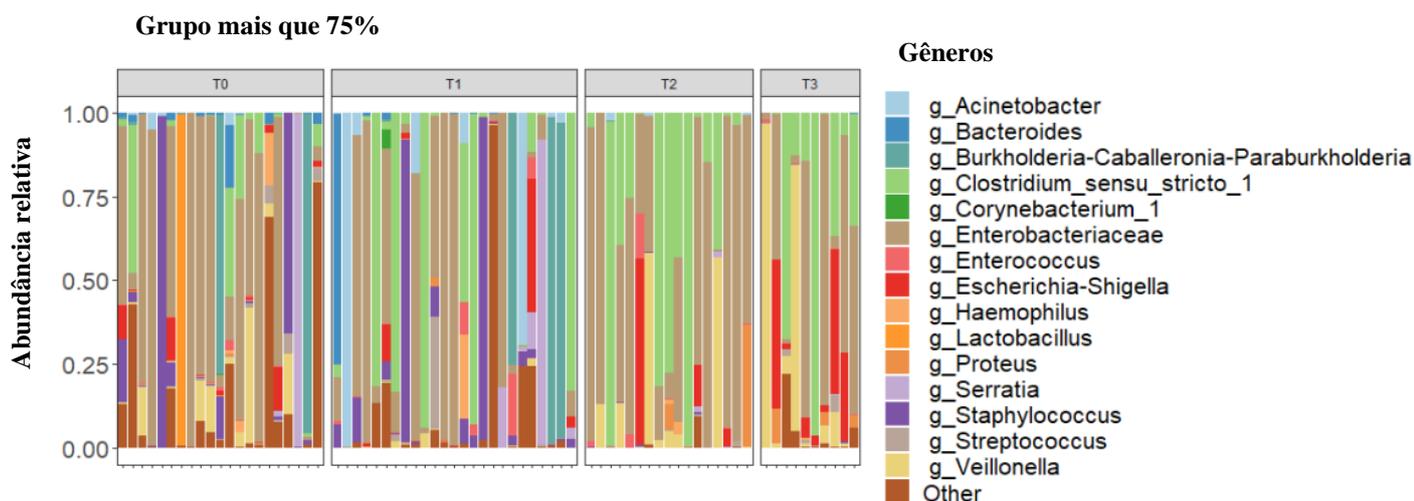
**Tabela 20. Comparação entre os principais gêneros bacterianos nos grupos com o passar do tempo (N=19)**

Grupo entre 50-75% de aleitamento	T0	T1	T2	T3	T0 x T1			T0 x T2			T0 x T3		
					Estimate	P	P (FDR)	Estimate	P	P (FDR)	Estimate	P	P (FDR)
<i>Acinetobacter</i>	0,337	0,880	0,002	0,097	-1,699	<0,001	0,05*	-14,936	1,00	1,00	-9,456	1,00	1,00
<i>Bacteroides</i>	0,893	5,666	0,010	0,008	-4,519	0,02	0,27	-4,946	0,03	0,91	-3,643	0,06	0,55
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	5,242	4,625	0,381	0,044	0,163	0,74	1,00	0,402	0,52	1,00	-0,596	0,34	1,00
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	4,366	19,127	32,253	24,219	0,130	0,87	1,00	-0,740	0,36	1,00	-0,534	0,54	1,00
<i>Corynebacterium_1</i>	7,567	0,254	0,001	--	0,712	0,16	0,75	1,177	0,10	1,00	--	--	--
<i>Enterobacteriaceae#</i>	41,175	36,495	57,344	47,970	0,333	0,45	1,00	-1,155	0,31	1,00	0,050	0,94	1,00
<i>Enterococcus</i>	2,149	0,487	0,970	0,069	-0,161	0,75	1,00	-0,341	0,72	1,00	-0,474	0,70	1,00
<i>Escherichia-Shigella</i>	1,849	6,264	0,005	1,292	-0,449	0,37	1,00	-0,947	0,27	1,00	-0,520	0,39	1,00
<i>Haemophilus</i>	0,106	0,093	0,005	0,001	0,124	0,78	1,00	0,332	0,68	1,00	-0,690	0,27	1,00
<i>Lactobacillus</i>	0,048	0,002	--	11,022	-1,029	0,13	0,69	--	--	--	8,177	<0,001	0,01*
<i>Proteus</i>	0,054	6,774	--	--	-0,218	0,65	1,00	--	--	--	--	--	--
<i>Serratia</i>	0,074	3,544	3,026	6,628	-0,314	0,37	1,00	-0,202	0,84	1,00	-1,967	0,06	0,55
<i>Staphylococcus</i>	8,639	13,078	5,973	0,019	-0,529	0,44	1,00	-0,366	0,75	1,00	-0,197	0,80	1,00
<i>Streptococcus</i>	0,737	0,947	0,000	3,039	-0,452	0,26	1,00	-0,470	0,66	1,00	1,106	0,03	0,41
<i>Veillonella</i>	10,957	1,343	0,011	5,406	-0,823	1,00	1,00	-0,364	0,75	1,00	-3,265	1,00	1,00

Valores representam a porcentagem dos 15 principais gêneros mais abundantes em relação a todas as amostras fecais dos neonatos. Valor de P baseado no GAMLSS-BEZI (*Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape with a zero inflated beta family*). P (FDR): valor de P ajustado para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e uso de antibiótico (sim ou não). \*Significância  $\leq 0.05$  após valor ajustado.

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento), *Estimate* (valor do teste), FDR (*False Discover Rate*); -- (ausência do gênero bacteriano no período observado); # Família Enterobacteriaceae.

A análise para comparar o efeito do tempo nos principais gêneros bacterianos do grupo >75% pode ser observada na Figura 17 e Tabela 21. Podemos observar que, no T1 em relação ao T0 ocorreu aumento considerável nos gêneros *Acinetobacter* e *Clostridium sensu stricto 1*, e diminuição considerável em Enterobacteriaceae, *Veillonella* e *Lactobacillus*, porém os resultados não foram estatisticamente significativos. Entre T2 e T0, observamos aumento significativo na abundância de *Proteus* (2,62% e 0,05%, respectivamente -  $p < 0,001$ ), além de aumento em *Clostridium sensu stricto 1* ( $p = 0,03$ ) e *Escherichia-Shigella* ( $p = 0,02$ ), que não se mantém após ajustes ( $p = 0,58$  para ambos os testes). Já na comparação entre T3 e T0, identificamos aumento significativo de *Proteus* (1,79% e 0,05%, respectivamente -  $p < 0,001$ ) e de *Escherichia-Shigella* (12,68% e 2,06%, respectivamente -  $p = 0,03$ ).



**Figura 17.** Relação dos principais gêneros bacterianos observados no grupo com mais de 75% de aleitamento considerando os momentos de avaliação.

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento).

**Tabela 21. Comparação entre os principais gêneros bacterianos no grupo com mais de 75% de aleitamento com o passar do tempo (N=27)**

Grupo com mais de 75% de aleitamento	T0	T1	T2	T3	T0 x T1			T0 x T2			T0 x T3		
					Estimate	P	P (FDR)	Estimate	P	P (FDR)	Estimate	P	P (FDR)
<i>Acinetobacter</i>	0,542	8,290	0,241	0,025	0,400	0,34	0,83	0,035	0,95	1,00	0,101	0,90	1,00
<i>Bacteroides</i>	1,607	3,151	0,010	0,034	-0,311	0,38	0,83	-0,858	0,17	1,00	-0,536	0,27	1,00
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	8,321	10,717	0,008	--	0,324	0,64	0,91	-1,182	0,24	1,00	--	--	--
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	6,167	20,301	31,202	26,837	0,297	0,44	0,86	0,947	0,03	0,58	0,653	0,19	1,00
<i>Corynebacterium_1</i>	0,011	0,240	0,001	0,003	-0,069	0,92	1,00	-0,391	0,75	1,00	-0,396	0,77	1,00
Enterobacteriaceae#	40,423	27,627	50,121	33,799	-0,524	0,17	0,77	0,160	0,71	1,00	-0,319	0,52	1,00
<i>Enterococcus</i>	0,275	1,613	1,154	0,200	0,237	0,52	0,89	-0,188	0,63	1,00	0,113	0,82	1,00
<i>Escherichia-Shigella</i>	2,068	2,304	4,319	12,689	-0,432	0,25	0,80	1,431	0,02	0,58	1,408	<0,001	0,03*
<i>Haemophilus</i>	1,014	1,020	0,302	0,060	-0,313	0,48	0,89	0,447	0,48	1,00	-0,163	0,80	1,00
<i>Lactobacillus</i>	4,730	0,005	--	--	-0,772	0,40	0,83	--	--	--	--	--	--
<i>Proteus</i>	0,059	0,134	2,628	1,795	0,060	0,90	1,00	4,125	<0,001	<0,001*	2,520	<0,001	<0,001*
<i>Serratia</i>	4,844	4,973	0,202	0,051	0,289	0,65	0,91	-0,065	0,94	1,00	-0,043	0,96	1,00
<i>Staphylococcus</i>	10,047	9,929	0,154	0,052	-0,052	0,88	1,00	-0,638	0,13	1,00	-0,583	0,35	1,00
<i>Streptococcus</i>	0,934	1,503	0,156	0,958	-0,360	0,30	0,83	-0,417	0,31	1,00	0,183	0,67	1,00
<i>Veillonella</i>	5,257	0,410	8,879	20,010	-0,365	0,39	0,83	0,003	1,00	1,00	0,474	0,30	1,00

Valores representam a porcentagem dos 15 principais gêneros mais abundantes em relação a todas as amostras fecais dos neonatos. Valor de P baseado no GAMLSS-BEZI (*Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape with a zero inflated beta family*). P (FDR): valor de P ajustado para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e uso de antibiótico (sim ou não). \*Significância  $\leq 0.05$  após valor ajustado.

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento), *Estimate* (valor do teste), FDR (*False Discover Rate*); -- (ausência do gênero bacteriano no período observado); # Família Enterobacteriaceae.

#### **6.3.4. Alfa Diversidade**

Os resultados dos índices de alfa diversidade nos grupos em relação ao tempo podem ser observados na Tabela 22 e na Figura 18. Em relação ao índice de riqueza de Chao1, observamos aumento significativo na comparação entre o T0 em relação a todos os outros tempos de análise ( $p=0,03$ ). Na comparação em grupo e tempo para o índice de diversidade de Shannon, não foi possível observar diferença significativa na amostra observada. O mesmo ocorreu na análise do índice de Simpson, onde a variação não uniforme do índice ao longo do tempo não permitiu a detecção de diferenças significativas.

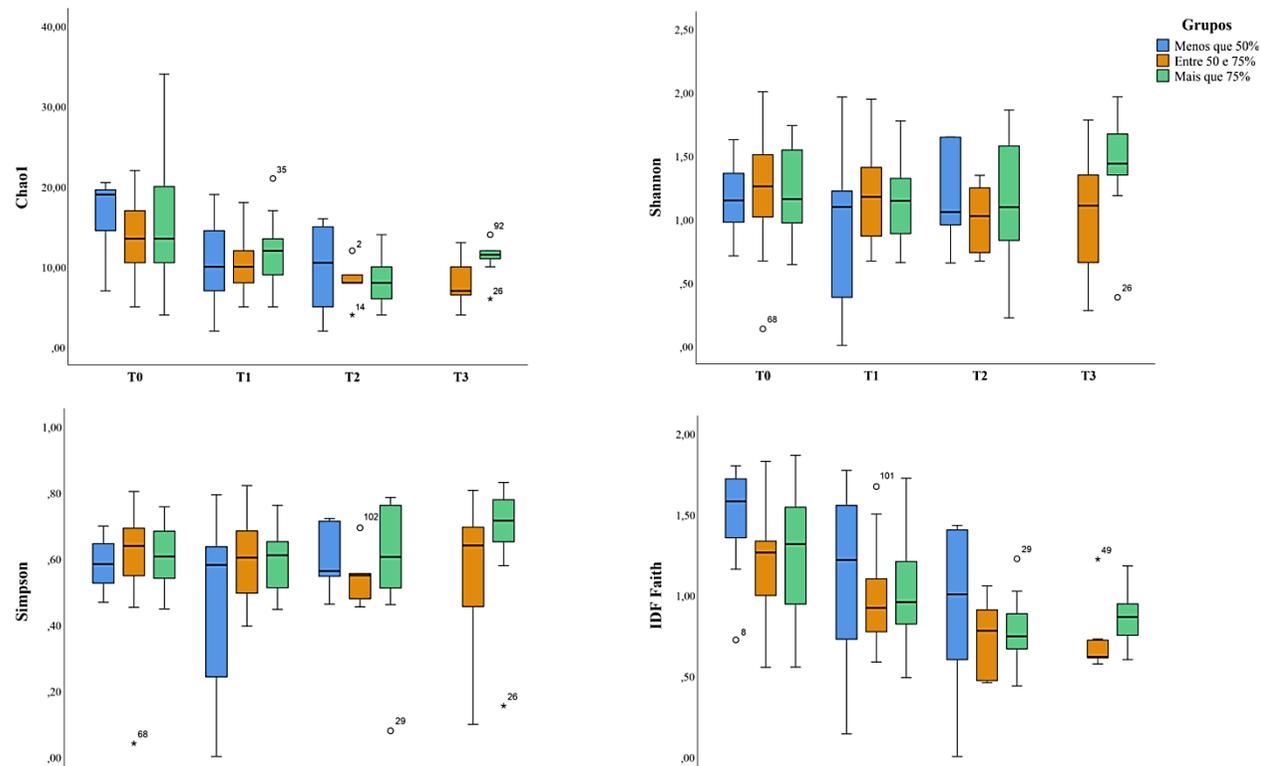
Na avaliação do índice de diversidade filogenética de Faith, foi possível observar diminuição significativa na comparação entre o T0 em relação a todos os outros tempos de análise ( $p=0,01$ ). Na interação entre grupo e tempo, não houve diferenças entre grupos no T0, porém observamos que todos os grupos apresentaram diminuição significativa entre T0 e T1 (grupo <50%  $p=0,043$ ; grupo 50-75  $p=0,003$ ; grupo >75%  $p=0,019$ ).

**Tabela 22.** Índices de Alfa diversidade considerando a interação entre grupo/tempo (N=55).

Índices	<u>Média ± erro padrão</u>			<u>Teste de efeitos do modelo</u>					
	Menos que 50% (N=9)	Entre 50-75% (N=19)	Maior que 75% (N=27)	Tempo			Interação		
				<i>Wald Chi-Square</i>	DF	P	<i>Wald Chi-Square</i>	DF	P
Chao1				8.775	3	0,03*	14.008	11	0,23
Tempo 0	18,18 ± 3,06	13,78 ± 1,20	14,74 ± 1,73						
Tempo 1	11,55 ± 4,02	10,21 ± 0,90	11,44 ± 0,81						
Tempo 2	11,63 ± 3,72	8,95 ± 0,86	8,43 ± 0,65						
Tempo 3	--	8,11 ± 1,26	11,04 ± 0,86						
Shannon				1.026	3	0,79	10.065	11	0,52
Tempo 0	1,36 ± 0,20	1,12 ± 0,14	1,21 ± 0,08						
Tempo 1	1,11 ± 0,40	1,17 ± 0,07	1,16 ± 0,07						
Tempo 2	1,36 ± 0,26	0,89 ± 0,12	1,15 ± 0,10						
Tempo 3	--	1,11 ± 0,17	1,40 ± 0,14						
Simpson				0,323	3	0,95	9.647	11	0,56
Tempo 0	0,63 ± 0,05	0,55 ± 0,06	0,62 ± 0,02						
Tempo 1	0,47 ± 0,18	0,60 ± 0,02	0,59 ± 0,02						
Tempo 2	0,64 ± 0,06	0,48 ± 0,04	0,60 ± 0,04						
Tempo 3	--	0,55 ± 0,08	0,64 ± 0,07						
IDF Faith				11.107	3	0,01*	58.680	11	<0,001*
Tempo 0	1,60 ± 0,23	1,26 ± 0,06	1,27 ± 0,10						
Tempo 1	0,97 ± 0,39	0,96 ± 0,08	1,00 ± 0,06						
Tempo 2	0,91 ± 0,39	0,79 ± 0,06	0,76 ± 0,04						
Tempo 3	--	0,73 ± 0,07	0,91 ± 0,05						

**Legenda:** DF (Grau de Liberdade), Tempo 0 (primeira amostra após o nascimento), Tempo 1 (7 dias após o nascimento), Tempo 2 (14 dias após o nascimento), Tempo 3 (21 dias após o nascimento), IDF Faith (Índice de Diversidade Filogenética de Faith), -- (apenas duas crianças do grupo com menos que 50% permaneceram internadas até o T3).

O valor de P é derivado da análise com o *Generalized Estimating Equations* (GEE), no qual os modelos foram avaliados com distribuição linear. \* Significância confirmada com o pós-teste de Sidak. Todos os índices foram ajustados para tipo de parto (cesária ou vaginal), idade gestacional e uso de antibióticos (sim ou não).



**Figura 18.** Índices de Alfa diversidade entre os grupos nos tempos.

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento).

### 6.3.5. Beta Diversidade

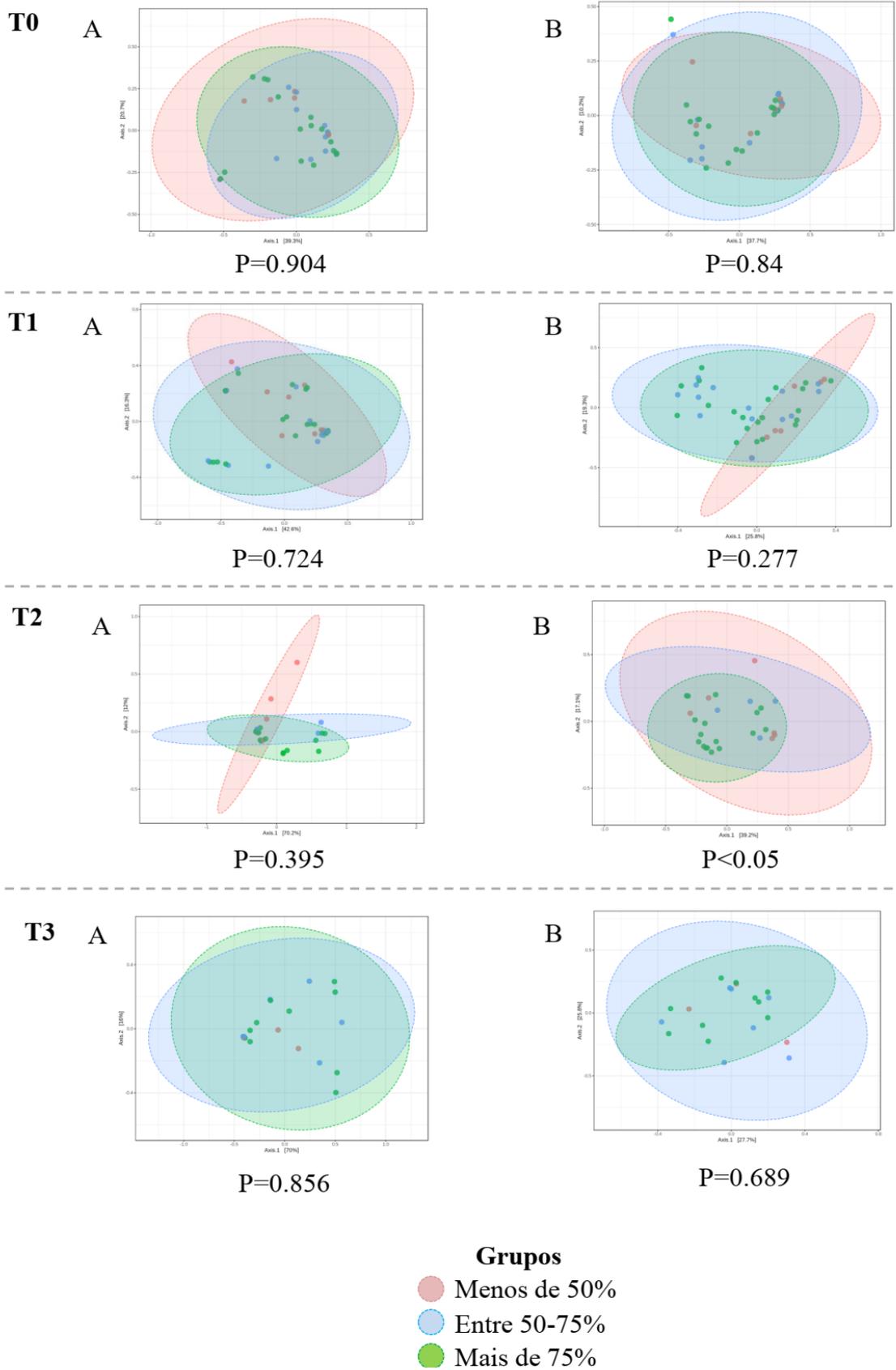
Os resultados em relação a beta diversidade nas amostras de fezes dos recém-nascidos prematuros podem ser observados nas Tabelas 23 e 24 e nas Figuras 19 e 20. Na análise de coordenadas principais (PCoA) considerando a diferença entre grupos (Figura 19 e Tabela 23), somente observamos diferenças na análise não ponderada entre os grupos no T2 ( $p < 0,05$ ). Para as demais análises, não observamos diferenças na estrutura filogenética entre os grupos ao longo do tempo, tanto na análise ponderada quanto na análise não ponderada.

**Tabela 23.** Análise da Beta diversidade nas amostras fecais considerando a diferença entre os grupos (A, B e C) nos tempos.

Comparação entre os grupos	F	R <sup>2</sup>	P
<b>T0</b>			
Ponderado	0,54436	0,031938	0,904
Não ponderado	0,66605	0,038801	0,84
<b>T1</b>			
Ponderado	0,67714	0,03356	0,724
Não ponderado	1,1797	0,057048	0,277
<b>T2</b>			
Ponderado	0,9829	0,0729	0,395
Não ponderado	1,8955	0,13168	<0,05*
<b>T3</b>			
Ponderado	0,36397	0,041062	0,856
Não ponderado	0,80889	0,086894	0,689

Valores baseado na análise de PERMANOVA.

**Legenda:** A (Grupo com menos de 50% de aleitamento), B (Grupo entre 50-75% de aleitamento), C (Grupo com mais de 75% de aleitamento). T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento).



**Figura 19.** Beta diversidade entre os grupos nos tempos.

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento), A – análise ponderada, B – análise não ponderada.

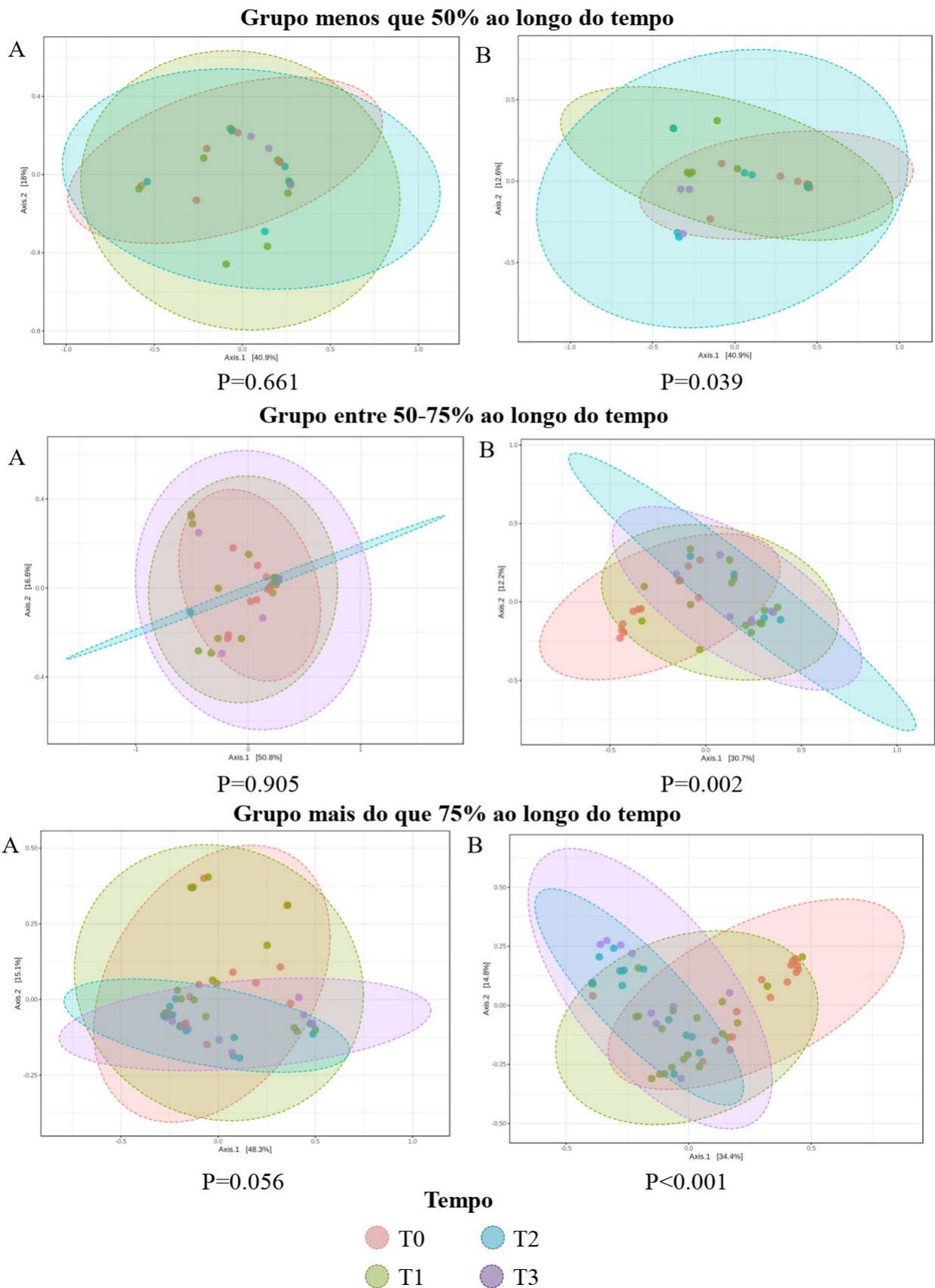
Na análise de beta diversidade ao longo do tempo dentro de cada grupo (Figura 20 e Tabela 24), observamos em todos os grupos diferenças significativas na composição da comunidade em cada um dos tempos, porém somente na análise não ponderada (grupo <50%  $p=0,039$ ; grupo 50-75  $p=0,002$ ; grupo >75%  $p<0,001$ ).

**Tabela 24.** Análise de beta diversidade nas amostras fecais considerando a diferença ao longo do tempo, dentro dos grupos (A, B e C).

Comparação dentro dos grupos	F	R <sup>2</sup>	P
<b>Menos de 50% (A)</b>			
Ponderado	0,81379	0,10879	0,661
Não ponderado	1,8381	0,21612	0,039*
<b>Entre 50-75% (B)</b>			
Ponderado	0,51913	0,045067	0,905
Não ponderado	2,3277	0,17465	0,002*
<b>Mais do que 75% (C)</b>			
Ponderado	1,7793	0,088467	0,056
Não ponderado	5,4644	0,22962	<0,001*

Valores baseado na análise de PERMANOVA.

**Legenda:** A (Grupo com menos de 50% de aleitamento), B (Grupo entre 50-75% de aleitamento), C (Grupo com mais de 75% de aleitamento). T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento).



**Figura 20.** Beta diversidade nos grupos e nos tempos.

**Legenda:** T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento), A – análise ponderada, B – análise não ponderada.

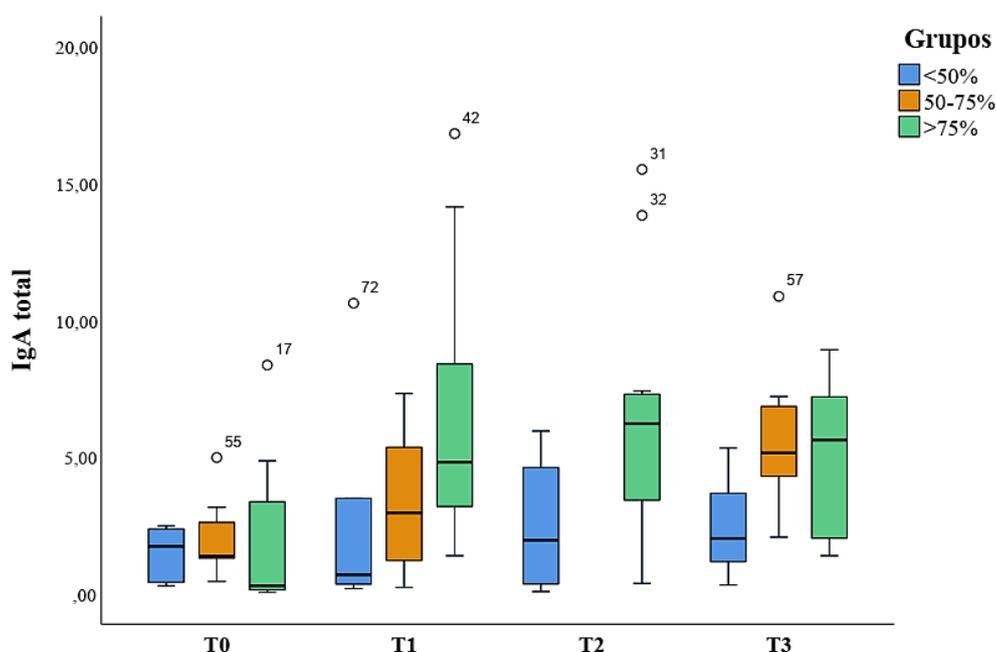
### 6.3.6. Análise de IgA total nas fezes

Os resultados em relação a dosagem de IgA total nas amostras de fezes dos recém-nascidos prematuros podem ser observados na Figura 21 e na Tabela 25. É possível observar que houve aumento significativo no nível de IgA com o passar do tempo, independente do grupo ( $p < 0,001$ ). Na análise de interação entre grupo e tempo, foi possível observar que houve uma tendência de significância ( $p = 0,059$ ).

**Tabela 25.** Nível de IgA encontrado nas amostras de fezes dos neonatos com o passar do tempo.

Tempo	N	Grupo		Grupo entre		Grupo >75% de aleitamento	Tempo		Interação	
		<50% de aleitamento	N	50-75% de aleitamento	N		Wald <sup>a</sup>	P	Wald <sup>a</sup>	P
IgA							21.002	<0,001*	10.648	0.059
T0	5	1,45 ± 0,41	9	2,00 ± 0,45	12	1,84 ± 0,74				
T1	5	3,06 ± 1,77	8	3,32 ± 0,84	17	6,33 ± 1,03				
T2	4	2,48 ± 1,16	1	--	12	6,49 ± 1,21				
T3	3	2,55 ± 1,20	7	5,76 ± 0,98	5	5,03 ± 1,30				

Valores apresentados como porcentagem média ± erro padrão. IgA (Imunoglobulina A), N (número de amostras por grupo em cada tempo), T0 (primeira amostra após o nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento), -- (N amostral insuficiente para realização de cálculo estatístico); <sup>a</sup> Wald Chi-Square.



**Figura 21.** Nível de IgA total nos grupos e nos tempos.

**Legenda:** IgA (Imunoglobulina A), T0 (amostra coletada no dia do nascimento), T1 (7 dias após o nascimento), T2 (14 dias após o nascimento), T3 (21 dias após o nascimento).

## 7. DISCUSSÃO

O início da vida e os fatores envolvidos nesta etapa são de extrema relevância para o desenvolvimento de recém-nascidos, sejam prematuros ou a termo. Hoje em dia sabe-se que o ganho de peso, a alimentação e também o tipo de parto da gestante influenciam diretamente na saúde do recém-nascido. Neste sentido, a amamentação participa no desenvolvimento do sistema imune e também na colonização do trato gastrointestinal dos recém-nascidos, através das bactérias presentes no leite materno e oligossacarídeos. Neste contexto, a importância do leite materno para a saúde de recém-nascidos já foi bem documentada. Entretanto, neonatos prematuros muitas vezes não conseguem ser amamentados, pois precisam ficar internados em unidades de terapia intensiva e a alimentação oral é limitada.

O leite materno é considerado um dos alimentos mais completos, sendo a primeira escolha para a nutrição de recém-nascidos, exceto em raras situações. Apresenta em sua composição proteína, células imunes, incluindo IgA, lactoferrina, leucócitos e fatores de crescimento. Além disso, contém comunidades microbianas complexas que se acredita colonizar o trato gastrointestinal de bebês e, assim, moldar a saúde a curto e a longo prazo (DZIDIC et al., 2020; FITZSTEVENS et al., 2017; LACKEY et al., 2019; TOGO et al., 2019). No entanto, a compreensão da microbiota do leite materno é geralmente derivada de mães saudáveis de bebês nascidos a termo, o que não pode ser transferido para estudos com mães de prematuros, visto que essas mulheres frequentemente apresentam dificuldade em produzir leite materno, seja por complicações associadas ao parto prematuro, estresse psicossocial, retardo da lactogênese e até mesmo a separação materno-infantil por longos períodos (LAU, 2018). Sendo assim, é relevante estudos que avaliem a composição do leite materno de mães de recém-nascidos prematuros.

Em nosso estudo, os principais gêneros encontrados nas amostras de leite materno foram *Staphylococcus*, *Corynebacterium* 1 e *Streptococcus*. *Staphylococcus*, o gênero mais abundante

nesta amostragem, aumentou no decorrer do tempo e o mesmo pode ser observado com o gênero *Streptococcus*. Por outro lado, o gênero *Corynebacterium* 1 diminuiu ao longo do tempo. Além disso, observamos que os gêneros *Lactobacillus* e *Rothia*, presentes no colostro dos três primeiros dias (T0), diminuem significativamente após esse período e voltam a aumentar entre 7 e 10 dias após o parto. No entanto, trata-se de gêneros com abundância inferior a 1% neste estudo, o que pode estar associado a grande individualidade e variabilidade na composição do leite materno nos primeiros dias de vida.

Diversos estudos identificaram *Staphylococcus* e *Streptococcus* como os gêneros mais abundantes na microbiota do leite humano (HUNT et al., 2011; JIMÉNEZ et al., 2015; MOOSSAVI et al., 2019; PADILHA et al., 2019), apesar de serem feitos com mães de recém-nascidos a termo e utilizarem metodologias diferentes. Adicionalmente, o gênero *Corynebacterium* também foi reportado em outros estudos (CABRERA-RUBIO et al., 2012; JOST et al., 2014; MURPHY et al., 2017). Em 2020, Asbury e colaboradores realizaram um estudo para caracterizar a microbiota do leite materno de 86 mães de bebês prematuros nas primeiras 8 semanas pós-parto, observando como características maternas, incluindo o IMC pré-gestacional e o tipo de parto, estão associadas à mudança temporal da microbiota do leite materno. Como resultado, observaram que *Staphylococcus* foi o gênero mais predominante identificado nas amostras ao longo das semanas (ASBURY et al., 2020). Outros estudos com leite materno de mães de prematuros mostraram alta abundância de *Staphylococcus*, particularmente no primeiro mês após o parto (BIAGI et al., 2018; CACHO et al., 2017; URBANIAK et al., 2016). Da mesma forma, o aumento da abundância de *Streptococcus* foi relatado no leite prematuro após o início da amamentação direta (BIAGI et al., 2018).

Estudo publicado por Ruiz e colaboradores em 2019 avaliou a composição do pré-colostro, coletado de gestantes a termo antes do nascimento, e observaram que *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram os gêneros mais abundantes nessas amostras (RUIZ et al., 2019). Essas

bactérias normalmente estão presentes na pele e na microbiota oral, e a hipótese mais aceita para a presença destas bactérias no leite materno seria de um fluxo retrógrado das bactérias presentes na pele da puérpera e/ou da cavidade oral do recém-nascido, contribuindo para o estabelecimento da microbiota do leite materno (JEURINK et al., 2013); porém, os achados presentes neste recente estudo (RUIZ et al., 2019) contestam tal hipótese, pois as amostras foram coletadas antes do parto, ou seja, sem contato prévio com a microbiota oral do recém-nascido, sendo também realizada assepsia da auréola e mamilo com solução de clorexidina. Em nosso estudo, as mães participantes não tiveram contato com a microbiota oral dos recém-nascidos durante o período de coleta e não foi realizada assepsia do mamilo e auréola por não fazer parte da rotina adotada na maternidade. De fato, os perfis microbianos nessas amostras coletadas sem assepsia prévia do mamilo e auréola refletem as práticas clínicas do mundo real e capturam com mais precisão a composição bacteriana do leite que um bebê prematuro consumiria (ASBURY et al., 2020).

Visto a importância do leite materno para a nutrição de recém-nascidos prematuros, práticas como a colostroterapia, neste sentido, auxiliam no desenvolvimento da imunidade e na colonização oral desta população. Estudos recentes demonstraram que a colostroterapia é uma prática segura (SNYDER et al., 2017) que diminui o tempo de internação (ROMANO-KEELER et al., 2017) e o risco para o desenvolvimento de enterocolite necrosante (GAROFALO; CAPLAN, 2019).

Nas amostras de saliva coletadas dos recém-nascidos prematuros, observamos que no primeiro dia de vida os grupos apresentaram maior diversidade dos gêneros bacterianos, sem grande predomínio de nenhum gênero específico, como pode ser observado nos resultados dos índices de alfa diversidade. Após a colostroterapia (T1 – 7º dia) observamos que houve aumento de *Staphylococcus* em ambos os grupos em relação ao T0. Este resultado corrobora o conceito da transferência das bactérias do leite materno para o recém-nascido, visto que o gênero mais

abundante observado nas amostras de leite materno foi *Staphylococcus*. Dentro desse contexto, a microbiota oral tem papel importante para contribuir com a colonização da microbiota intestinal, sendo passagem obrigatória para que o leite materno atinja o trato gastrointestinal (BIAGI et al., 2018). A microbiota oral de recém-nascidos saudáveis e a termo geralmente é dominada por *Streptococcus* e *Staphylococcus* e pode apresentar em menores proporções gêneros como *Gemella*, *Actinomyces* e *Veillonella* (SAMPAIO-MAIA; MONTEIRO-SILVA, 2014). A cavidade oral está constantemente exposta ao meio ambiente, sofrendo variações a todo o momento, juntamente com a constante produção de saliva que cria um fluxo contínuo. Dessa forma, a formação de biofilme na superfície oral facilita a colonização e formação da microbiota oral (KOLENBRANDER et al., 2010).

Além de *Staphylococcus*, um dos gêneros mais abundantes observados nas amostras desta população de recém-nascidos foi *Streptococcus*, desde o primeiro dia de vida, mas principalmente ao 21º de vida, onde ocupa metade da abundância relativa observada em ambos os grupos, se tornando o gênero mais prevalente nesse ambiente. Os *Streptococcus* presentes na mucosa oral são conhecidos como um dos principais grupos de colonizadores iniciais e sua adesão à cavidade oral promove o estabelecimento de colonizadores posteriores, por sua produção de polissacarídeos e adesinas (KOLENBRANDER et al., 2010). Evidências mostram que existe semelhança na composição da microbiota oral e da microbiota intestinal de recém-nascidos, o que sugere que as bactérias que não conseguem aderir à superfície oral e são deglutidas participam da colonização intestinal (COSTELLO et al., 2013; DING; SCHLOSS, 2014).

Especificamente para prematuros, poucos foram os estudos que avaliaram o desenvolvimento da microbiota oral desta população, a maioria através de métodos de cultura. Estudo realizado por Hendricks-Muñoz e colaboradores (2015) com recém-nascidos prematuros, observou que a microbiota oral após 1 mês de vida era dominada pelo gênero

*Streptococcus*, associando a presença de outros gêneros bacterianos com o contato pele-a-pele após o nascimento (HENDRICKS-MUÑOZ et al., 2015); no entanto, o estudo não observou o efeito da amamentação ou da colostroterapia.

Estudo realizado por Sohn et al. (2015) avaliou o efeito da administração oral da colostroterapia na microbiota oral de recém-nascidos de muito baixo peso. Como resultado, observaram diferença na microbiota oral do nascimento até o 4º dia de vida, com prevalência da família Moraxellaceae ao nascimento e da família Planococcaceae após a colostroterapia. No grupo que não realizou colostroterapia, observaram maior abundância da família Staphylococcaceae no 4º dia de vida (SOHN et al., 2016). No entanto, este estudo não avaliou a composição da microbiota do colostro administrado e apenas considerou os resultados a nível filogenético de família. Resultados contrastantes foram observados no nosso estudo, onde o gênero mais abundante em ambos os grupos foi *Staphylococcus*, que pertence à família Staphylococcaceae. As diferenças encontradas podem ser pela metodologia utilizada ou devido a alguma característica específica da população. No estudo de Ruiz e colaboradores foi observada, além da composição do pré-colostro, a microbiota oral dos recém-nascidos 5 a 7 dias após o nascimento. Como resultado, observaram *Staphylococcus* e *Streptococcus* como os gêneros mais abundantes na microbiota oral dos recém-nascidos (RUIZ et al., 2019), o que vai de encontro com os achados do presente trabalho.

Ao 7º dia de vida, no grupo que fez uso de colostroterapia foi encontrado aumento nos gêneros *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, ambos conhecidos como colonizadores iniciais da microbiota intestinal. Espécies de *Bifidobacterium* são responsáveis pela metabolização de oligossacarídeos (WARD et al., 2006), componentes importantes para uma colonização saudável no ambiente intestinal, e *Bacteroides* são responsáveis pela quebra de moléculas complexas dentro do intestino, ajudando o sistema imune contra possíveis patógenos (GREGORY et al., 2015). Em nossa amostra, foi possível observar que tais gêneros

colonizaram de maneira transitória o ambiente oral. Este achado pode se dar ao fato de que, em nossa população, os neonatos do grupo colostroterapia receberam grande quantidade de estímulo oral na primeira semana de vida, enquanto o grupo controle apresentou baixa proporção de estímulo oral durante todo o período de internação.

No período após a colostroterapia, observamos aumento de *Neisseria* e *Haemophilus* no grupo que realizou colostroterapia. No grupo controle, identificamos aumento significativo de *Gemella* no T3 (21º dia de vida). *Neisseria*, *Haemophilus* e *Gemella* são gêneros bacterianos comumente identificados na microbiota oral, seja em recém-nascidos ou em populações adultas. No entanto, tais gêneros não foram reportados no trabalho realizado por Young et al. (2020) com 7 recém-nascidos prematuros extremos (idade gestacional média de 23,6 semanas), o qual identificou maior abundância de *Staphylococcus* e *Escherichia-Shigella* na 3-4 semana de vida (YOUNG et al., 2020).

Romano-Keeler e colaboradores, em 2017, realizaram estudo com recém-nascidos prematuros (<32 semanas completas de gestação) para observar o efeito de um ‘*priming*’ de colostro oral, protocolo que consistiu na administração de 100µL de colostro da própria mãe em cada bochecha a cada 6 horas por 5 dias, iniciando nas primeiras 48 horas de vida (ROMANO-KEELER et al., 2017). Em seus resultados, observaram que não houve diferença entre os grupos no índice de Shannon, mas que a diversidade diminuiu ao longo do tempo, entre o 1º e o 30º dia de vida. Adicionalmente, não observaram diferenças na beta diversidade em relação ao tratamento, mas identificaram que o perfil da comunidade muda ao longo do tempo (ROMANO-KEELER et al., 2017). Resultados semelhantes foram observados em nosso estudo, no qual os índices de alfa diversidade diminuíram entre o 1º e o 7º dia de vida, o que se estendeu até o 21º dia de vida. Além disso, não observamos diferenças entre os grupos na análise da beta diversidade, mas foi possível constatar o efeito do tempo no perfil filogenético das amostras orais.

Como mencionado, o leite materno apresenta grande importância para a colonização saudável não só da cavidade oral, mas principalmente do intestino, visto que promove um estado de ativação imune importante para o equilíbrio e interação dos microrganismos com o epitélio intestinal (GROER et al., 2015). No caso de recém-nascidos prematuros, além da ativação imune, também contribui para a integridade da barreira intestinal, que ainda é imatura (STOCKINGER; HORNEF; CHASSIN, 2011). Estes bebês costumam apresentar uma microbiota intestinal caracterizada por baixa diversidade microbiana e alta abundância de bactérias potencialmente patogênicas (UNGER et al., 2015); embora isso seja parcialmente consequência do trato gastrointestinal e sistema imune imaturo do bebê, práticas como o uso frequente de antibióticos e o isolamento em incubadoras podem agravar ainda mais a microbiota intestinal (HARTZ; BRADSHAW; BRANDON, 2015; UNGER et al., 2015) e assim interferir no desenvolvimento saudável dos neonatos prematuros. Neste contexto, bebês prematuros tendem a apresentar composição bem diferente da observada em bebês a termo, considerando o tempo internados em UTIN e às intervenções médicas. Dessa forma, redução da diversidade da microbiota intestinal e aumento em patógenos potenciais, como Enterobacteriaceae e Proteobacteria são comumente observados em recém-nascidos prematuros (STEWART et al., 2017). De fato, neste estudo observamos nas amostras dos primeiros dias de vida alta abundância da família Enterobacteriaceae em todos os grupos, além da presença de gêneros como *Staphylococcus*, *Veillonella*, *Clostridium sensu stricto 1* e *Bacteroides*, com abundância variada em cada um dos grupos.

Aproximadamente após uma semana de vida, identificamos mudança na dinâmica da microbiota intestinal, onde os principais gêneros em relação ao T0 são mantidos, mas ocorrem variações nas proporções em cada um dos grupos. Por exemplo, as maiores mudanças foram observadas no grupo que recebeu menos de 50% de leite materno na primeira semana de vida (<50%), onde é possível observar aumento de *Bacteroides*, *Corynebacterium 1*, *Burkholderia-*

*Caballeronia-Paraburkholderia* e *Haemophilus*, enquanto os demais grupos apresentaram aumento de *Clostridium sensu stricto 1* e mantiveram altas proporções de Enterobacteriaceae. Além disso, O grupo que recebeu mais de 75% de alimentação com leite materno na primeira semana de vida apresentou aumento de *Acinetobacter* neste mesmo período. O gênero *Clostridium sensu stricto 1* inclui mais de 20 espécies, sendo que algumas delas apresentam potencial patogênico e outras possuem características comensais (WIEGEL; TANNER; RAINEY, 2006). Estudos já observaram que bebês que realizaram dieta mista à base de leite materno ou leite pasteurizado, apresentaram bactérias da família Clostridiaceae (CONG et al., 2017; DAHL et al., 2018).

Dentro desse contexto, estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar a tolerância alimentar e a saúde intestinal de recém-nascidos prematuros e, conseqüentemente, alterar a composição microbiana do trato gastrointestinal. As intervenções incluem o uso de probióticos, prebióticos e o uso de leite materno fresco ao invés das opções de congeladas de leite materno ou leite de doadora (ALFALEH; ANABREES, 2014; ATHALYE-JAPE et al., 2014; MODI et al., 2010; QUIGLEY; MCGUIRE, 2014; WESTERBEEK et al., 2010).

O leite de doadora pasteurizado é a alimentação preconizada para recém-nascidos prematuros na ausência do leite da própria mãe, ou quando as quantidades são insuficientes (WHO, 2011). Acredita-se que o uso de leite pasteurizado de doadoras provavelmente apresenta um impacto diferente na microbiota intestinal do bebê quando comparado ao leite cru da própria mãe (GRANGER et al., 2021). As técnicas de pasteurização por calor, incluindo a técnica *holder*, frequentemente diminuem as concentrações de IgA secretora (sIgA), lactoferrina, lisozima, fatores de crescimento, vitaminas solúveis em água e lipases. No entanto, os oligossacarídeos, lactose, fator de crescimento e vitaminas solúveis tendem a não a ser reduzidos e o impacto sobre as citocinas é variável (ARSLANOGLU et al., 2013). Neste contexto, um estudo realizado em 2018 por Castro e colaboradores observou que a

pasteurização não reduziu significativamente a quantidade de macronutrientes e conteúdo energético no leite materno; porém, o método de administração impactou significativamente a entrega final de energia e gordura (CASTRO et al., 2019).

Considerando os fatores benéficos da administração do leite materno, neste estudo escolhemos diferenciar os grupos de acordo com a porcentagem da administração de leite materno na primeira semana de vida, podendo ser da própria mãe (cru) ou de doadoras (pasteurizado). Nesta amostragem, todos os grupos provenientes deste desenho apresentaram dieta composta predominantemente por leite pasteurizado, mesmo o grupo que recebeu menos de 50% de dieta com leite materno e permaneceu mais tempo em jejum na primeira semana de vida.

Em nossa população, observamos que os níveis de IgA total quantificado nas amostras de fezes apresentou relação com a quantidade de leite materno recebido na primeira semana de vida, visto que o grupo onde mais de 75% da dieta foi composta por leite materno apresentou quantidades de IgA total maiores em comparação aos demais grupos a partir do 7º dia de vida. Ao 22º dia de vida, o grupo que recebeu pelo menos 50% da dieta composta por leite materno apresentou média equivalente ao grupo >75%, mas em ambos os grupos os valores representavam mais do que o dobro da média observada no grupo <50%. A IgA secretora (sIgA) é produzida por células plasmáticas na lâmina própria e translocada para o lúmen intestinal, onde se liga a bactérias patogênicas e promove a eliminação bacteriana. As bactérias comensais são transferidas para o tecido linfóide associado ao intestino, tanto ligadas como não ligadas a IgA e induzem a produção de sIgA (GRANGER et al., 2021). O leite materno da própria mãe é a fonte primária de sIgA no primeiro mês de vida, o que molda a relação hospedeiro-microbiota do bebê prematuro (GOPALAKRISHNA; HAND, 2020).

Considerando o efeito em longo prazo da administração de leite na abundância relativa desta população, Ford e colaboradores (2019) realizam estudo com 125 recém-nascidos

prematturos de muito baixo peso para comparar o desenvolvimento, crescimento e tolerância alimentar de acordo com o tipo de dieta: majoritariamente composta por leite da própria mãe ou majoritariamente composta por leite de doadora. Após o curso de 6 semanas de estudo, observaram que a diversidade da microbiota intestinal foi maior no grupo com dieta composta por leite da própria mãe. Adicionalmente, identificaram que na 4ª e 6ª semana de vida os bebês alimentados com leite da própria mãe apresentavam abundância aumentada de gêneros como *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, enquanto que os bebês alimentados com leite de doadora apresentavam abundância aumentada de *Staphylococcus* (FORD et al., 2019). Em nosso estudo, após o 22º dia de vida (T3), observamos que *Staphylococcus* se mostrou o gênero mais abundante somente no grupo que recebeu menos de 50% de dieta com leite materno na primeira semana de vida. Os demais grupos, os quais receberam maiores quantidades de leite materno na primeira semana, apresentaram ao 22º dia abundância aumentada da família Enterobacteriaceae e do gênero *Clostridium sensu stricto* 1.

Outro estudo, realizado por Butcher et al. (2018) observou que recém-nascidos de muito baixo peso e amamentados exclusivamente com leite da própria mãe apresentavam uma microbiota intestinal personalizada, com baixa abundância de *Bifidobacterium*. Além disso, observaram que a riqueza (o número de espécies em uma comunidade) diminuiu ao longo do tempo, mas que a uniformidade (a medida de como estas espécies estão distribuídas) aumentou (BUTCHER et al., 2018). Neste trabalho, observamos diminuição em todos os índices ao longo do tempo, principalmente no índice de riqueza de Chao1 e na diversidade filogenética de Faith, os quais permaneceram reduzidos durante todo o período de coleta. Já em relação a beta diversidade, não encontramos diferenças entre os grupos, mas identificamos mudanças ao longo do tempo, principalmente na análise não ponderada. Dessa forma, é possível perceber como o perfil filogenético é variável ao longo do tempo, não sendo influenciado por gêneros mais abundantes.

Poucos foram os estudos que avaliaram a ingestão de proporções de leite pasteurizado no desenvolvimento da microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros. Este modelo de estudo é relevante por evidenciar um cenário factível de maternidades com banco de leite humano e que estimulam o aleitamento materno.

O presente estudo apresentou algumas limitações. O fato deste estudo ser observacional e composto por uma amostra de conveniência não permitiu a divisão de grupos de maneira mais clara nas amostras de fezes dos recém-nascidos; além disso, por esse motivo não conseguimos apresentar grupos que fizeram uso exclusivo de leite cru ou de leite pasteurizado. Da mesma forma, não foi possível apresentar um grupo que somente recebeu colostroterapia com leite cru, visto que é extremamente difícil controlar ou prever a alimentação que será oferecida para recém-nascidos prematuros em uma UTINN. A perda de acompanhamento de algumas amostras, assim como o pequeno tamanho amostral, são outros fatores que precisam ser citados, visto que impactam o poder estatístico do estudo. Devido a pandemia de coronavírus, o sequenciamento do transcriptoma das amostras de fezes não pode ser realizado.

## 8. CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstrou que o leite materno de mães de recém-nascidos prematuros apresenta composição que muda ao longo do tempo, com aumento de *Staphylococcus* e *Streptococcus* e diminuição de *Corynebacterium 1*, porém sem diferença estatística. Intervenções como a colostroterapia possuem efeito benéfico sobre a microbiota oral de recém-nascidos prematuros e são importantes para a colonização inicial e transferência de bactérias, como *Staphylococcus*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, que auxiliam na manutenção de um ambiente saudável para esta população. Além disso, existe diferença no perfil da microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros quando diferentes proporções de leite materno são oferecidas durante a primeira semana de vida, onde foi possível identificar aumento de *Clostridium sensu stricto 1* e Enterobacteriaceae nos grupos que receberam maiores proporções de leite materno. Foram identificados maiores níveis de IgA total nas amostras de fezes de neonatos que receberam maiores proporções de leite materno nos primeiros sete dias de vida. Adicionalmente, tanto a microbiota oral quanto a intestinal possuem comunidades microbianas que sofrem ação do tempo, além da dieta e protocolos administrados.

## 9. REFERÊNCIAS

ADLERBERTH, I.; WOLD, A. Establishment of the gut microbiota in Western infants. **Acta Paediatrica**, v. 98, n. 2, p. 229–238, 12 jan. 2009.

AL-SHEHRI, S. S. et al. Deep sequencing of the 16S ribosomal RNA of the neonatal oral microbiome: a comparison of breast-fed and formula-fed infants. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 38309, 6 dez. 2016.

ALBENZIO, M. et al. Lactoferrin Levels in Human Milk after Preterm and Term Delivery. **American Journal of Perinatology**, v. 33, n. 11, p. 1085–1089, 7 set. 2016.

ALFALEH, K.; ANABREES, J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 4, 10 abr. 2014.

ALMEIDA, J. A. G. Capítulo 17 – Pasteurização. In: **Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos**. 1 edição ed. Brasília: Anvisa, 2007. p. 156.

ANTONY, K. M. et al. The preterm placental microbiome varies in association with excess maternal gestational weight gain. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 212, n. 5, p. 653.e1-653.e16, 1 maio 2015.

ANVISA. **Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos**. Disponível em: <<https://rblh.fiocruz.br/media/blhanv2008.pdf>>.

ARRIETA, M.-C. et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 307, p. 307ra152-307ra152, 30 set. 2015.

ARSLANOGLU, S. et al. Donor human milk for preterm infants: Current evidence and

research directions. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 57, n. 4, p. 535–542, out. 2013.

ASBURY, M. R. et al. Mothers of Preterm Infants Have Individualized Breast Milk Microbiota that Changes Temporally Based on Maternal Characteristics. **Cell Host & Microbe**, v. 28, n. 5, p. 669- 682.e4, 11 nov. 2020.

ATHALYE-JAPE, G. et al. Benefits of probiotics on enteral nutrition in preterm neonates: a systematic review. **The American journal of clinical nutrition**, v. 100, n. 6, p. 1508–1519, 1 dez. 2014.

BERTINO, E. et al. Effects of Holder Pasteurization on Human Milk Oligosaccharides. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 381–385, abr. 2008.

BIAGI, E. et al. Microbial Community Dynamics in Mother’s Milk and Infant’s Mouth and Gut in Moderately Preterm Infants. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2512, 22 out. 2018.

BODE, L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, v. 22, n. 9, p. 1147–1162, 1 set. 2012.

BOKULICH, N. A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2’s q2-feature-classifier plugin. **Microbiome** 2018 6:1, v. 6, n. 1, p. 1–17, 17 maio 2018.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology** 2019 37:8, v. 37, n. 8, p. 852–857, 24 jul. 2019.

BÖTTCHER, M. F.; JENMALM, M. C.; BJÖRKSTÉN, B. Cytokine, chemokine and

secretory IgA levels in human milk in relation to atopic disease and IgA production in infants.

**Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of**

**Pediatric Allergy and Immunology**, v. 14, n. 1, p. 35–41, fev. 2003.

BOYD, C. A.; QUIGLEY, M. A.; BROCKLEHURST, P. Donor breast milk versus infant formula for preterm infants: systematic review and meta-analysis. **Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition**, v. 92, n. 3, p. F169–F175, 1 maio 2007.

BUTCHER, J. et al. Independent of Birth Mode or Gestational Age, Very-Low-Birth-Weight Infants Fed Their Mothers' Milk Rapidly Develop Personalized Microbiotas Low in Bifidobacterium. **The Journal of Nutrition**, v. 148, n. 3, p. 326–335, 1 mar. 2018.

CABRERA-RUBIO, R. et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 3, p. 544–551, 1 set. 2012.

CACHO, N. T. et al. Personalization of the Microbiota of Donor Human Milk with Mother's Own Milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 0, n. AUG, p. 1470, 3 ago. 2017.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 23 maio 2016.

CASTELLOTE, C. et al. Premature Delivery Influences the Immunological Composition of Colostrum and Transitional and Mature Human Milk. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 6, p. 1181–1187, 1 jun. 2011.

CASTRO, M. et al. Energy and Fat Intake for Preterm Infants Fed Donor Milk Is Significantly Impacted by Enteral Feeding Method. **JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 43, n. 1, p. 162–165, 1 jan. 2019.

CHICHOŁSKI, M. et al. The Influence of Milk Oligosaccharides on Microbiota of Infants: Opportunities for Formulas. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 331–351, 10 abr. 2011.

CLAUD, E. C.; SAVIDGE, T.; WALKER, W. A. Modulation of Human Intestinal Epithelial Cell IL-8 Secretion by Human Milk Factors. **Pediatric Research**, v. 53, n. 3, p. 419–425, mar. 2003.

CLEMENTE, J. . et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258–1270, 16 mar. 2012.

COLLADO, M. C. et al. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 22 mar. 2016.

CONG, X. et al. Influence of Feeding Type on Gut Microbiome Development in Hospitalized Preterm Infants. **Nursing research**, v. 66, n. 2, p. 123–133, 1 mar. 2017.

CORPELEIJN, W. E. et al. Intake of Own Mother’s Milk during the First Days of Life Is Associated with Decreased Morbidity and Mortality in Very Low Birth Weight Infants during the First 60 Days of Life. **Neonatology**, v. 102, n. 4, p. 276–281, 2012.

CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 4, p. e73, abr. 2016.

COSTELLO, E. K. et al. Microbiome Assembly across Multiple Body Sites in Low-Birthweight Infants. **mBio**, v. 4, n. 6, p. e00782-13, 29 out. 2013.

DAHL, C. et al. Preterm infants have distinct microbiomes not explained by mode of delivery, breastfeeding duration or antibiotic exposure. **International journal of**

**epidemiology**, v. 47, n. 5, p. 1658–1669, 1 out. 2018.

DAMACENO, Q. S. et al. Evaluation of Potential Probiotics Isolated from Human Milk and Colostrum. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 4, p. 371–379, 3 dez. 2017.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691–6, 17 ago. 2010.

DE GOFFAU, M. C. et al. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. **Nature**, v. 572, n. 7769, p. 329–334, 31 jul. 2019.

DHARIWAL, A. et al. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic acids research**, v. 45, n. W1, p. W180–W188, 3 jul. 2017.

DING, T.; SCHLOSS, P. D. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 357–360, 16 maio 2014.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20–32, 26 jan. 2016.

DUNCAN, S. H. et al. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 2112–2122, ago. 2009.

DZIDIC, M. et al. Allergy development is associated with consumption of breastmilk with a reduced microbial richness in the first month of life. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 31, n. 3, p. 250–257, 1 abr. 2020.

EVANS, J. M.; MORRIS, L. S.; MARCHESI, J. R. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. **Journal of Endocrinology**, v. 218, n. 3, p. R37–R47,

set. 2013.

EWASCHUK, J. B. et al. Effect of pasteurization on selected immune components of donated human breast milk. **Journal of Perinatology**, v. 31, n. 9, p. 593–598, 17 set. 2011.

FITZSTEVENS, J. L. et al. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. **Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 354–364, 1 jun. 2017.

FORD, S. L. et al. Improved feeding tolerance and growth are linked to increased gut microbial community diversity in very-low-birth-weight infants fed mother's own milk compared with donor breast milk. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 109, n. 4, p. 1088–1097, 1 abr. 2019.

FROST, B. L. et al. Maternal breast milk transforming growth factor-beta and feeding intolerance in preterm infants. **Pediatric Research**, v. 76, n. 4, p. 386–393, 4 out. 2014.

GABRIELLI, O. et al. Preterm Milk Oligosaccharides During the First Month of Lactation. **PEDIATRICS**, v. 128, n. 6, p. e1520–e1531, 1 dez. 2011.

GALLAND, L. The Gut Microbiome and the Brain. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 12, p. 1261–1272, dez. 2014.

GAROFALO, N. A.; CAPLAN, M. S. Oropharyngeal Mother's Milk. **Clinics in Perinatology**, v. 46, n. 1, p. 77–88, mar. 2019.

GEPHART, S. M.; WELLER, M. Colostrum as Oral Immune Therapy to Promote Neonatal Health. **Advances in Neonatal Care**, v. 14, n. 1, p. 44–51, fev. 2014.

GERMAN, J. B. et al. Human Milk Oligosaccharides: Evolution, Structures and Bioselectivity as Substrates for Intestinal Bacteria. In: **Personalized Nutrition for the**

**Diverse Needs of Infants and Children.** Basel: KARGER, 2008. v. 62p. 205–222.

GOPALAKRISHNA, K. P.; HAND, T. W. Influence of Maternal Milk on the Neonatal Intestinal Microbiome. **Nutrients** **2020, Vol. 12, Page 823**, v. 12, n. 3, p. 823, 20 mar. 2020.

GOSALBES, M. J. et al. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 43, n. 2, p. 198–211, fev. 2013.

GRANGER, C. L. et al. Maternal breastmilk, infant gut microbiome and the impact on preterm infant health. **Acta Paediatrica**, v. 110, n. 2, p. 450–457, 1 fev. 2021.

GREGORY, K. E. et al. Mode of Birth Influences Preterm Infant Intestinal Colonization with Bacteroides Over the Early Neonatal Period. **Advances in neonatal care : official journal of the National Association of Neonatal Nurses**, v. 15, n. 6, p. 393, 1 dez. 2015.

GRITZ, E. C.; BHANDARI, V. The Human Neonatal Gut Microbiome: A Brief Review. **Frontiers in Pediatrics**, v. 0, p. 17, 5 mar. 2015.

GROER, M. W. et al. The very low birth weight infant microbiome and childhood health. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 105, n. 4, p. 252–264, dez. 2015.

HADLEY, W. **ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis**. 2nd editio ed. [s.l.] Springer, 2016.

HARTZ, L. E.; BRADSHAW, W.; BRANDON, D. H. Potential NICU Environmental Influences on the Neonate's Microbiome: A Systematic Review. **Advances in neonatal care : official journal of the National Association of Neonatal Nurses**, v. 15, n. 5, p. 324–335, 25 out. 2015.

HENDRICKS-MUÑOZ, K. et al. Skin-to-Skin Care and the Development of the Preterm Infant Oral Microbiome. **American Journal of Perinatology**, v. 32, n. 13, p. 1205–1216, 22 maio 2015.

HO, N. T. et al. metamicrobiomeR: an R package for analysis of microbiome relative abundance data using zero-inflated beta GAMLSS and meta-analysis across studies using random effects models. **BMC Bioinformatics** 2019 **20:1**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 16 abr. 2019.

HOLGERSON, P. L. et al. Oral Microbial Profile Discriminates Breast-fed From Formula-fed Infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 56, n. 2, p. 127–136, fev. 2013.

HUNT, K. M. et al. Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21313, 17 jun. 2011.

JEURINK, P. V. et al. Human milk: a source of more life than we imagine. **Beneficial Microbes**, v. 4, n. 1, p. 17–30, 1 mar. 2013.

JIMÉNEZ, E. et al. Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. **Journal of Human Lactation**, v. 31, n. 3, p. 406–415, 6 ago. 2015.

JOHNSON, T. J. et al. Cost Savings of Human Milk as a Strategy to Reduce the Incidence of Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Infants. **Neonatology**, v. 107, n. 4, p. 271–276, 3 mar. 2015.

JOST, T. et al. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2891–2904, set. 2014.

KENNEDY, K. M. et al. Fetal meconium does not have a detectable microbiota before birth. **Nature Microbiology** 2021 **6:7**, v. 6, n. 7, p. 865–873, 10 maio 2021.

KHODAYAR-PARDO, P. et al. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **Journal of Perinatology**, v. 34, n. 8, p. 599–605, 27 ago. 2014.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. e1–e1, 1 jan. 2013.

KOH, A. et al. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332–1345, 2 jun. 2016.

KOLENBRANDER, P. E. et al. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 471–480, 1 jul. 2010.

KOZICH, J. J. et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112–5120, 2013.

LACKEY, K. A. et al. What’s Normal? Microbiomes in Human Milk and Infant Feces Are Related to Each Other but Vary Geographically: The INSPIRE Study. **Frontiers in Nutrition**, v. 0, p. 45, 17 abr. 2019.

LAHTI, L.; SHETTY, S. **Introduction to the microbiome R package**. Disponível em: <<http://bioconductor.statistik.tu-dortmund.de/packages/3.6/bioc/vignettes/microbiome/inst/doc/vignette.html>>.

LAU, C. Breastfeeding Challenges and the Preterm Mother-Infant Dyad: A Conceptual Model. **Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine**, v. 13, n. 1, p. 8–17, 1 jan. 2018.

LEBOUDER, E. et al. Modulation of Neonatal Microbial Recognition: TLR-Mediated Innate Immune Responses Are Specifically and Differentially Modulated by Human Milk. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3742–3752, 15 mar. 2006.

LEE, J. et al. Oropharyngeal Colostrum Administration in Extremely Premature Infants: An RCT. **PEDIATRICS**, v. 135, n. 2, p. e357–e366, 1 fev. 2015.

LÖNNERDAL, B. Bioactive proteins in breast milk. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 49, p. 1–7, mar. 2013.

MARTIN, R. et al. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0158498, 30 jun. 2016.

MATAMOROS, S. et al. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 167–173, abr. 2013.

MCGUIRE, W.; ANTHONY, M. Y. Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: systematic review. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 88, n. 1, p. F11-4, jan. 2003.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.

MEEHAN, C. J.; BEIKO, R. G. A Phylogenomic View of Ecological Specialization in the Lachnospiraceae, a Family of Digestive Tract-Associated Bacteria. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 3, p. 703–713, mar. 2014.

MODI, N. et al. A Randomized, Double-Blind, Controlled Trial of the Effect of Prebiotic

Oligosaccharides on Enteral Tolerance in Preterm Infants (ISRCTN77444690). **Pediatric Research** 2010 **68:5**, v. 68, n. 5, p. 440–445, nov. 2010.

MOOSSAVI, S. et al. Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. **Cell host & microbe**, v. 25, n. 2, p. 324–335.e4, 13 fev. 2019.

MORENO-FERNANDEZ, J. et al. Enhancement of immune response mediated by oropharyngeal colostrum administration in preterm neonates. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 30, n. 2, p. pai.13008, 13 dez. 2018.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 189–200, 3 maio 2016.

MURPHY, K. et al. The Composition of Human Milk and Infant Faecal Microbiota Over the First Three Months of Life: A Pilot Study. **Scientific reports**, v. 7, p. 40597, 2017.

NAGAO et al. Placental Transfer of IgG and IgG Subclass Antibodies Anti-Purified Escherichia coli LPS O16, O6 and O111. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 47, n. 6, p. 609–614, 1 jun. 1998.

NARAYANAN, I. et al. Randomised controlled trial of effect of raw and holder pasteurised human milk and of formula supplements on incidence of neonatal infection. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8412, p. 1111–3, 17 nov. 1984.

NEU, J. The microbiome during pregnancy and early postnatal life. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 21, n. 6, p. 373–379, dez. 2016.

OKSANEN, J. et al. **Vegan: Community Ecology Package**, 2016. Disponível em:  
<<https://github.com/vegandevs/vegan/issues>>

0Ahttps://github.com/vegandevs/vegan/issues>

PADILHA, M. et al. The Human Milk Microbiota is Modulated by Maternal Diet.

**Microorganisms**, v. 7, n. 11, 1 nov. 2019.

PALMER, C. et al. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. e177, 26 jun. 2007.

PANCHAL, H.; ATHALYE-JAPE, G.; PATOLE, S. Oropharyngeal Colostrum for Preterm Infants: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 6, p. 1152–1162, 1 nov. 2019.

PANNARAJ, P. S. et al. Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 7, p. 647, 1 jul. 2017.

PATEL, A. L. et al. Impact of early human milk on sepsis and health-care costs in very low birth weight infants. **Journal of Perinatology**, v. 33, n. 7, p. 514–519, 31 jul. 2013.

PATEL, A. L. et al. Influence of own mother’s milk on bronchopulmonary dysplasia and costs. **Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition**, v. 102, n. 3, p. F256–F261, maio 2017.

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 2017 5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–19, 28 abr. 2017.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, p. D590, 2013.

QUIGLEY, M.; EMBLETON, N. D.; MCGUIRE, W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 6, p. CD002971, 20 jun. 2018.

QUIGLEY, M.; MCGUIRE, W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 2014, n. 4, 22 abr. 2014.

RAUTAVA, S. Early microbial contact, the breast milk microbiome and child health. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 7, n. 1, p. 5–14, 8 fev. 2016.

RICHARDS, J. L. et al. Dietary metabolites and the gut microbiota: an alternative approach to control inflammatory and autoimmune diseases. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 5, p. e82, 13 maio 2016.

RODRIGUEZ, N. A. et al. A Pilot Study to Determine the Safety and Feasibility of Oropharyngeal Administration of Own Mother's Colostrum to Extremely Low-Birth-Weight Infants. **Advances in Neonatal Care**, v. 10, n. 4, p. 206–212, ago. 2010.

ROMANO-KEELER, J. et al. Oral colostrum priming shortens hospitalization without changing the immunomicrobial milieu. **Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association**, v. 37, n. 1, p. 36–41, 2017.

RUIZ, L. et al. Microbiota of human precolostrum and its potential role as a source of bacteria to the infant mouth. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8435, 10 dez. 2019.

SAMPAIO-MAIA, B.; MONTEIRO-SILVA, F. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: An update. **Dental research journal**, v. 11, n. 3, p. 291–301, maio 2014.

SINGH, R. K. et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 73, 8 dez. 2017.

SNYDER, R. et al. Early provision of oropharyngeal colostrum leads to sustained breast milk feedings in preterm infants. **Pediatrics & Neonatology**, v. 58, n. 6, p. 534–540, dez. 2017.

SOHN, K. et al. Buccal administration of human colostrum: impact on the oral microbiota of premature infants. **Journal of Perinatology**, v. 36, n. 2, p. 106–111, 10 fev. 2016.

STEWART, C. J. et al. Longitudinal development of the gut microbiome and metabolome in preterm neonates with late onset sepsis and healthy controls. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 75, 12 jul. 2017.

STOCKINGER, S.; HORNEF, M. W.; CHASSIN, C. Establishment of intestinal homeostasis during the neonatal period. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 22, p. 3699–3712, 28 nov. 2011.

SWEENEY, E. L. et al. The effect of breastmilk and saliva combinations on the in vitro growth of oral pathogenic and commensal microorganisms. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15112, 11 dez. 2018.

TADDEI, C.; BRANDT, K.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. *Microbiologia Humana*. In: **Microbiologia**. 6 edição ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2015.

TAO, J. et al. Effects of oropharyngeal administration of colostrum on the incidence of necrotizing enterocolitis, late-onset sepsis, and death in preterm infants: a meta-analysis of RCTs. **European Journal of Clinical Nutrition** 2020 **74:8**, v. 74, n. 8, p. 1122–1131, 3 jan. 2020.

THEIS, K. R. et al. Does the human placenta delivered at term have a microbiota? Results of

cultivation, quantitative real-time PCR, 16S rRNA gene sequencing, and metagenomics.

**American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 220, n. 3, p. 267.e1-267.e39, 1 mar. 2019.

TOGO, A. et al. Repertoire of human breast and milk microbiota: a systematic review.

**Future Microbiol. / Future microbiology.**, v. 14, n. 7, p. 623–641, 1 maio 2019.

TURIN, C. G. et al. Lactoferrin concentration in breast milk of mothers of low-birth-weight newborns. **Journal of Perinatology**, v. 37, n. 5, p. 507–512, 26 maio 2017.

UNDERWOOD, M. A. Human milk for the premature infant. **Pediatric clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 189–207, fev. 2013.

UNGER, S. et al. Gut microbiota of the very-low-birth-weight infant. **Pediatric Research** **2015 77:1**, v. 77, n. 1, p. 205–213, 13 out. 2015.

URBANIAK, C. et al. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 1, 6 dez. 2016.

WAGNER, J.; HANSON, C.; ANDERSON BERRY, A. Donor Human Milk for Premature Infants. **ICAN: Infant, Child, & Adolescent Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 71–77, 8 abr. 2013.

WALKER, A. Breast Milk as the Gold Standard for Protective Nutrients. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 2, p. S3–S7, fev. 2010.

WANG, M. et al. Fecal Microbiota Composition of Breast-Fed Infants Is Correlated With Human Milk Oligosaccharides Consumed. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 60, n. 6, p. 825–833, jun. 2015.

WARD, R. E. et al. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 6, p.

4497–4499, jun. 2006.

WESTERBEEK, E. A. et al. Neutral and acidic oligosaccharides in preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 3, p. 679–686, 1 mar. 2010.

WHO. **Guidelines on Optimal feeding of low birthweight infants in low-and middle-income countries**. Disponível em:

<[https://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/documents/9789241548366.pdf?ua=1](https://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9789241548366.pdf?ua=1)>.

Acesso em: 11 out. 2019.

WHO, W. H. O. **Preterm birth**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>>. Acesso em: 11 out. 2019.

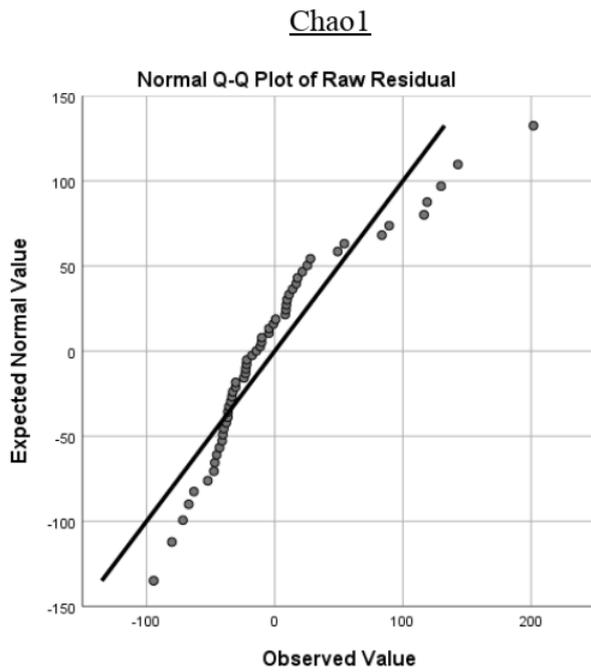
WIEGEL, J.; TANNER, R.; RAINEY, F. A. An Introduction to the Family Clostridiaceae. In: **The Prokaryotes**. New York: Springer, New York, NY, 2006. p. 654–678.

WOPEREIS, H. et al. The first thousand days – intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 25, n. 5, p. 428–438, 1 ago. 2014.

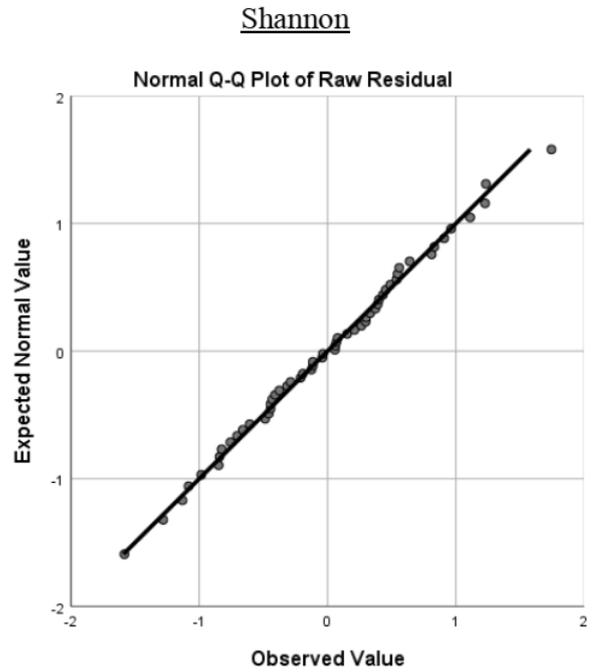
YOUNG, G. R. et al. Acquisition and Development of the Extremely Preterm Infant Microbiota Across Multiple Anatomical Sites. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 70, n. 1, p. 12–19, 1 jan. 2020.

ZAURA, E. et al. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 85, 2014.

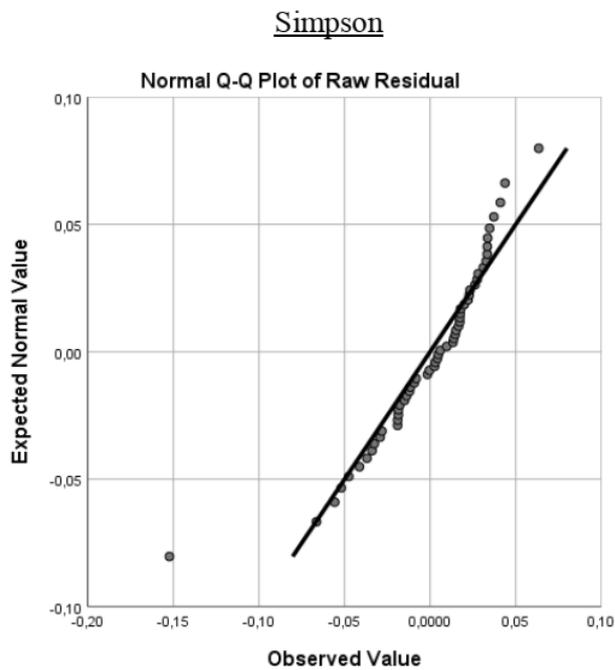
## 10. MATERIAL SUPLEMENTAR



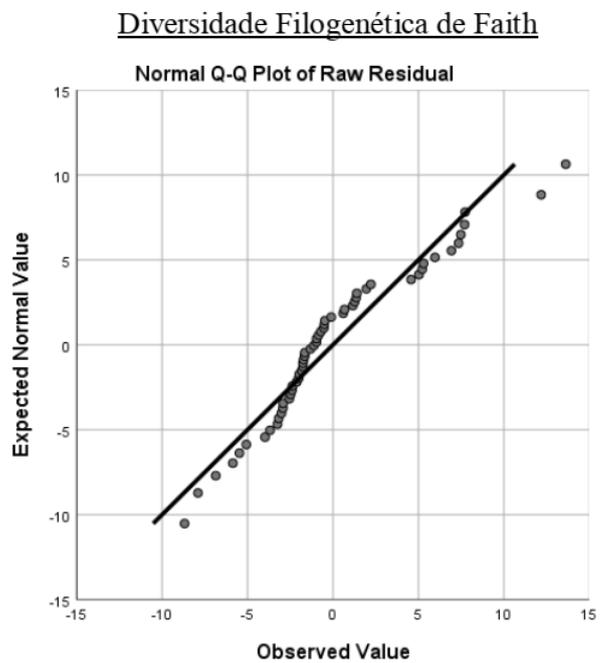
Distribuição: Gamma  
Matriz de correlação: *Unstructured*



Distribuição: Gamma  
Matriz de correlação: *Exchangeable*



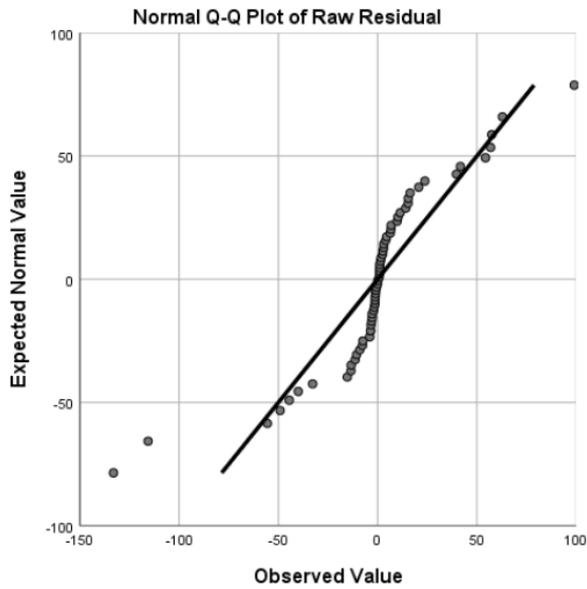
Distribuição: Normal  
Matriz de correlação: *Exchangeable*



Distribuição: Gamma  
Matriz de correlação: *Exchangeable*

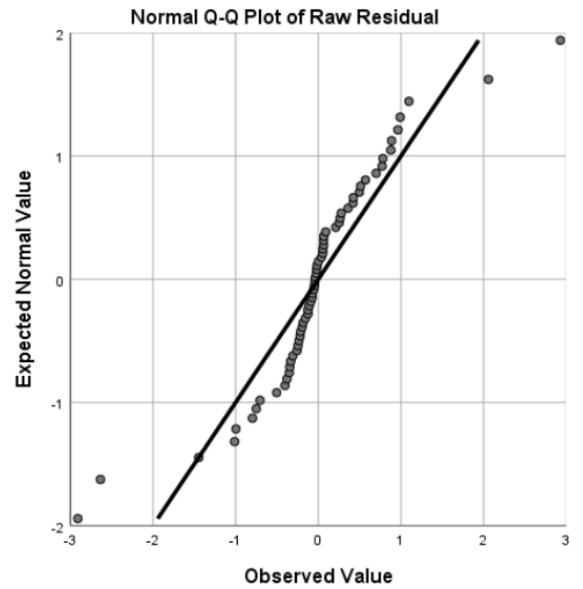
**Figura suplementar 1.** Gráfico Q-Q plot em relação aos resíduos de aderência dos índices de alfa diversidade para análise das amostras de leite materno.

### Chao1



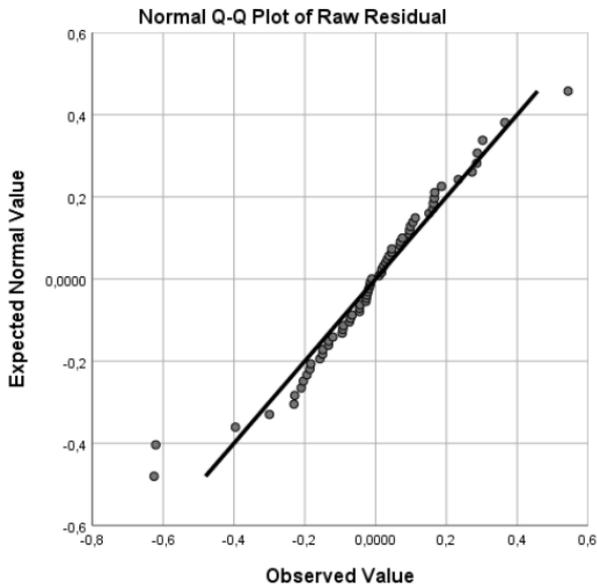
Distribuição: Gamma  
Matriz de correlação: *Independent*

### Shannon



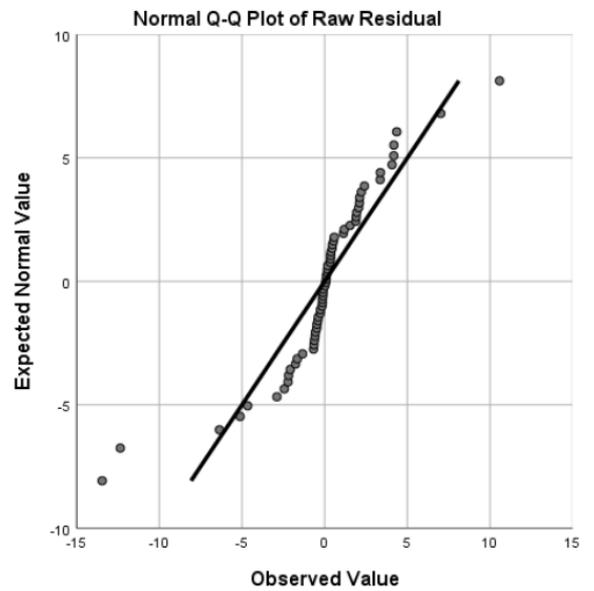
Distribuição: Normal  
Matriz de correlação: AR(1)

### Simpson



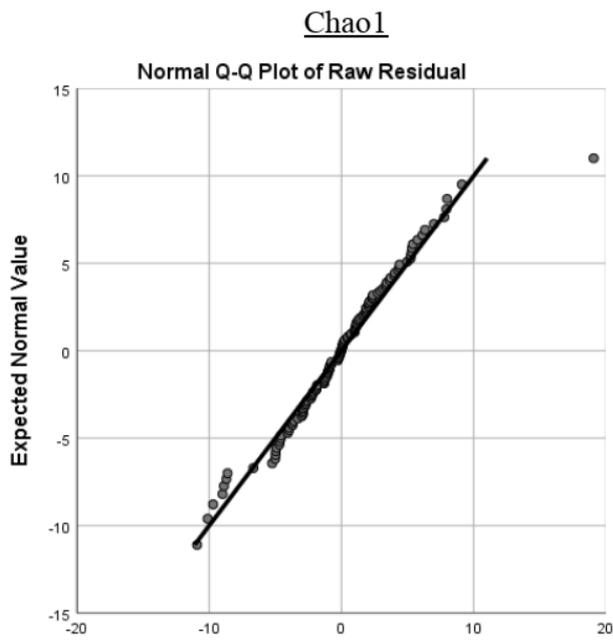
Distribuição: Normal  
Matriz de correlação: *Unstructured*

### Diversidade Filogenética de Faith

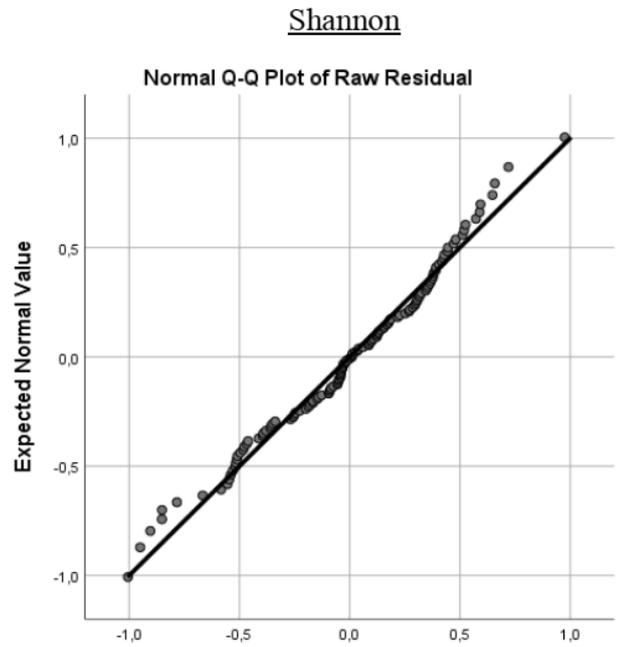


Distribuição: Gamma  
Matriz de correlação: *Exchangeable*

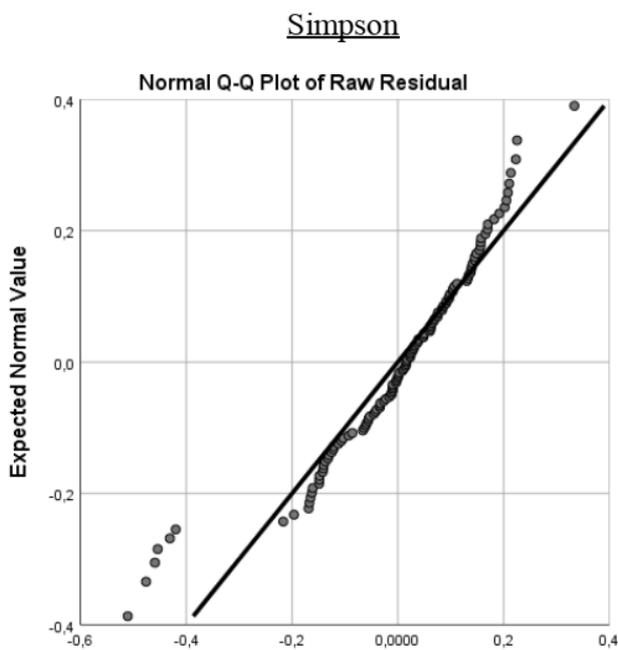
**Figura suplementar 2.** Gráfico Q-Q plot em relação aos resíduos de aderência dos índices de alfa diversidade para análise da microbiota oral.



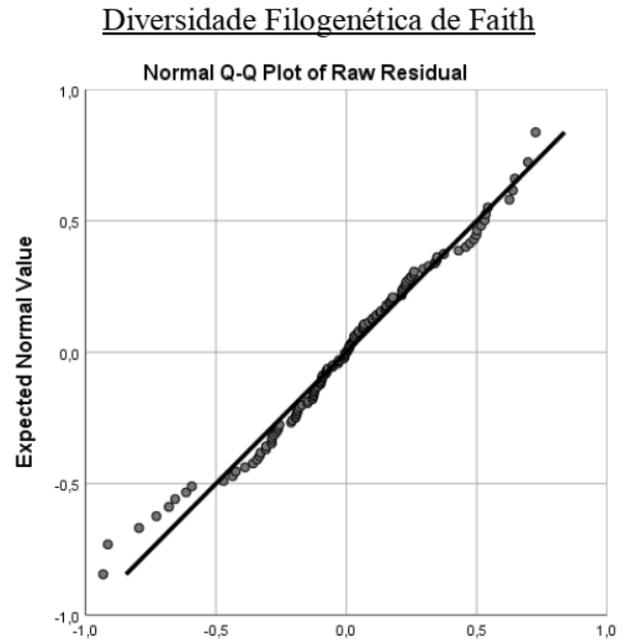
Distribuição: Normal  
Matriz de correlação: *Exchangeable*



Distribuição: Normal  
Matriz de correlação: *Unstructured*



Distribuição: Normal  
Matriz de correlação: *Unstructured*

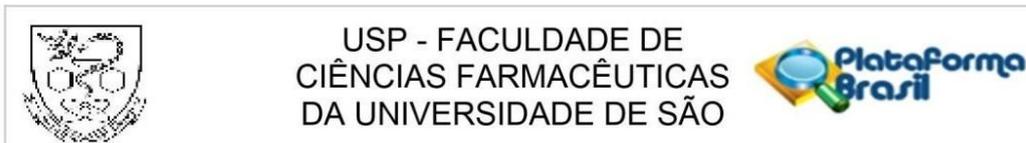


Distribuição: Normal  
Matriz de correlação: *Unstructured*

**Figura suplementar 3.** Gráfico Q-Q plot em relação aos resíduos de aderência dos índices de alfa diversidade para análise da microbiota intestinal.

## 11. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da microbiota de recém - nascidos submetidos a colostroterapia

**Pesquisador:** Carla Taddei de Castro Neves

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 76151717.0.0000.0067

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.542.854

#### Apresentação do Projeto:

A colonização inicial da microbiota intestinal humana é de suma importância, desempenhando papel fundamental no desenvolvimento imunológico, nutricional, metabólico e neurológico. Recém-nascidos prematuros e de baixo peso muitas vezes precisam permanecer internados em unidades de terapia intensiva, e frequentemente a dieta enteral trófica é limitada em consequência da imaturidade do sistema digestivo ou estado clínico do recém-nascido. Dentro deste contexto, a colostroterapia é uma prática segura, viável e bem tolerada até mesmo pelos menores prematuros. Evidências preliminares defendem o efeito da colostroterapia em reduzir o tempo de alimentação enteral total. Sendo assim, o objetivo deste projeto é avaliar o estabelecimento da microbiota intestinal em neonatos prematuros submetidos à colostroterapia. Para isso, será realizado um ensaio clínico, longitudinal, onde serão recrutados 30 neonatos prematuros, onde 15 serão alocados no grupo que receberá colostro de origem direta (cru) e 15 serão alocados no grupo que receberá colostro proveniente do banco de leite (pasteurizado). Serão coletadas amostras de fezes dos neonatos, colostro materno e colostro do banco de leite no período de estudo (3 a 4 semanas), para análise metagenômica das fezes e do leite e metatranscriptômica das fezes, além de dosagem de ácidos graxos de cadeia curta e IgA nas fezes e no colostro. Para análise estatística, será utilizado o teste linear geral (GLM),

**Endereço:** Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112  
**Bairro:** Butantã **CEP:** 05.508-000  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 2.542.854

no software SPSS, com significância de 5%. A hipótese do presente estudo é que a microbiota intestinal de prematuros graves que receberem colostro materno cru apresentará diferenças, ou seja, será melhor modulada, quando comparados com prematuros graves que receberem colostro pasteurizado.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

O presente estudo tem como objetivo avaliar o estabelecimento da microbiota intestinal em neonatos prematuros submetidos à colostroterapia de origem direta (cru) e neonatos prematuros submetidos à colostroterapia proveniente do banco de leite (pasteurizado).

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

A colostroterapia é uma rotina já realizada, e não implica em riscos para o recém-nascido. A pesquisa de microbiota em pacientes submetidos à colostroterapia terá risco mínimo.

Benefícios:

Os resultados da pesquisa poderão evidenciar os benefícios da colostroterapia na microbiota de neonatos prematuros. Desta forma, novas práticas terapêuticas poderão ser difundidas em centros neonatais, com objetivo de modular positivamente a microbiota intestinal.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é importante, pois os resultados poderão contribuir para a implementação de terapias acessórias no acompanhamento de recém-nascidos prematuros, objetivando a diminuição de intercorrências clínicas como a sepse.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE foi corrigido conforme indicação e os termos substituídos por outros mais simples. Foi incluído o termo "riscos mínimos" conforme exigência da legislação e as anuências e outros documentos estão corretos e inclusos na Plataforma.

#### **Recomendações:**

Sem recomendações e pendências.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O proponente cumpriu as exigências anteriores, logo considero o projeto aprovado.

**Endereço:** Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112  
**Bairro:** Butantã **CEP:** 05.508-000  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcb@usp.br



Continuação do Parecer: 2.542.854

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este CEP entende que o projeto está em conformidade com a legislação.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_977792.pdf	08/03/2018 21:50:57		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final.pdf	08/03/2018 20:59:07	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	08/03/2018 20:58:28	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLELeonorModeloFCF.pdf	07/03/2018 19:40:42	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Equipe.pdf	29/11/2017 08:37:46	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Participacao_Andrea.pdf	06/09/2017 15:46:15	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia2_leonor.pdf	05/09/2017 19:42:09	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia1_leonor.pdf	05/09/2017 19:41:20	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Participacao_Ramon.pdf	23/08/2017 14:34:48	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Participacao_Luana.pdf	23/08/2017 14:30:55	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia_dep.pdf	23/08/2017 14:28:36	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Pj_colostro.pdf	23/08/2017 14:26:50	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_ass.pdf	22/08/2017 09:09:51	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112  
**Bairro:** Butantã **CEP:** 05.508-000  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



USP - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.542.854

SAO PAULO, 14 de Março de 2018

---

**Assinado por:**  
**Cristina Northfleet de Albuquerque**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112  
**Bairro:** Butantã **CEP:** 05.508-000  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

## Anexo 2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros.

HOSPITAL MATERNIDADE  
LEONOR MENDES DE  
BARROS - UGA IV



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da microbiota de recém - nascidos submetidos a colostroterapia

**Pesquisador:** Carla Taddei de Castro Neves

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 76151717.0.3001.0063

**Instituição Proponente:** Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.558.782

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa dentro dos padrões habituais de estilo.

#### Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem como objetivo avaliar o estabelecimento da microbiota intestinal em neonatos prematuros submetidos à colostroterapia de origem direta (cru) e neonatos prematuros submetidos à colostroterapia proveniente do banco de leite (pasteurizado).

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Projeto com riscos mínimos. Os benefícios advindos da pesquisa podem ajudar na escolha da colostroterapia a ser instituída.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para a comunidade acadêmica.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este projeto de pesquisa encontra-se com alguns itens faltantes ou fora do padrão, portanto inserimos nas recomendações abaixo algumas alterações que poderiam melhorar o aspecto final do projeto.

#### Recomendações:

1 - Inserir os dados do CEP Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros no TCLE.

**Endereço:** Av. Celso Garcia 2477

**Bairro:** Belenzinho

**CEP:** 03.015-000

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2292-4188

**Fax:** (11)2693-4736

**E-mail:** cep.leonor@gmail.com

HOSPITAL MATERNIDADE  
LEONOR MENDES DE  
BARROS - UGA IV



Continuação do Parecer: 2.558.782

2 - inserir no TCLE o tempo de duração da coleta das amostras e especificar quantas vezes serão coletadas.

3 - Na metodologia não consta que a pesquisa durará três anos, como está escrito no TCLE.

4 - incluir na metodologia que serão comparados os resultados das coletas entre os dois grupos.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

SOLICITAMOS O ENVIO A ESTE CEP DE RELATÓRIOS SEMESTRAIS, DURANTE A REALIZAÇÃO DA PESQUISA, E O RELATÓRIO FINAL COM OS RESULTADOS OBTIDOS, CONFORME DETERMINA A RESOLUÇÃO Nº 466/12, ITEM II, SUBITENS II.19 E II.20.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final.pdf	08/03/2018 20:59:07	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	08/03/2018 20:58:28	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLELeonorModeloFCF.pdf	07/03/2018 19:40:42	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Equipe.pdf	29/11/2017 08:37:46	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia2_leonor.pdf	05/09/2017 19:42:09	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia1_leonor.pdf	05/09/2017 19:41:20	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Outros	Anuencia_dep.pdf	23/08/2017 14:28:36	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Pj_colostro.pdf	23/08/2017 14:26:50	Carla Taddei de Castro Neves	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Av. Celso Garcia 2477

**Bairro:** Belenzinho

**CEP:** 03.015-000

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2292-4188

**Fax:** (11)2693-4736

**E-mail:** cep.leonor@gmail.com

HOSPITAL MATERNIDADE  
LEONOR MENDES DE  
BARROS - UGA IV



Continuação do Parecer: 2.558.782

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 23 de Março de 2018

---

**Assinado por:**  
**Lucio Omar Carmignani**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Celso Garcia 2477

**Bairro:** Belenzinho

**CEP:** 03.015-000

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2292-4188

**Fax:** (11)2693-4736

**E-mail:** cep.leonor@gmail.com

### Anexo 3. Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

PROJETO: “Avaliação da microbiota de recém-nascidos submetidos à colostroterapia”

#### 1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: ( ) M ( ) F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:		Nº.:
Complementos:	Bairro:	
Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:	

#### 2. Informações do Responsável Legal

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: ( ) M ( ) F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:		Nº.:
Complementos:	Bairro:	
Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:	

#### 3. Título do Projeto de Pesquisa

Avaliação da microbiota de recém-nascidos submetidos à colostroterapia
--

#### 4. Duração da Pesquisa

03 anos
---------

#### 5. Nome do Pesquisador Responsável

Carla Taddei de Castro Neves	
Cargo/ Função: Pesquisadora	Nº de registro do Conselho Regional:

#### 6. Instituição/Instituições

Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros
---

A senhora está sendo convidada para fazer parte do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação da microbiota de recém-nascidos submetidos à colostroterapia”, cuja principal investigadora é a Dra. Carla Taddei. A médica Andrea Penha Spínola Fernandes, coordenadora do centro de referência em banco de leite humano da grande São Paulo, será a responsável pela pesquisa no Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros, onde ocorrerão as coletas de amostras.

O objetivo deste estudo é avaliar a evolução da microbiota inicial de recém-nascidos prematuros que são submetidos à colostroterapia. Chamamos de microbiota a comunidade de microrganismos (bactérias, fungos e vírus) que vivem e fazem parte do nosso organismo. A colostroterapia consiste na administração ao neonato de pequenas quantidades (gotas) de leite materno após as primeiras 24 horas de vida, sendo que, quando não houver disponibilidade de leite da própria mãe, será dado ao neonato leite do banco de leite humano da unidade. Esta terapia já faz parte da rotina do hospital. Será realizada a coleta das amostras do recém-nascido prematuro e/ou da mãe do recém-nascido, semanalmente, durante o período da colostroterapia e até quatro semanas após.

Após assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você será convidada a responder um questionário sócio demográfico. Não há benefício direto ao participante. Trata-se de um estudo exploratório testando a hipótese de que a aplicação da colostroterapia, em recém-nascidos prematuros, influenciará na colonização inicial da microbiota, além de diminuir incidências de sepses hospitalares e longos períodos de internação na unidade de terapia intensiva. Somente no final do estudo poderemos concluir se existe ou não alguma alteração que pode ser relacionada à colostroterapia. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A médica Andrea Penha Spínola Fernandes será a responsável pelo acompanhamento do recrutamento de pacientes, apresentação e esclarecimentos a respeito do presente termo, coleta de amostras e armazenamento até que as amostras sejam levadas ao laboratório da Dra. Carla Taddei. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento, assim deixando de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição. A pesquisa terá duração de três anos, período que poderão ocorrer o recrutamento de pacientes.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. A qualquer momento, você poderá se atualizar sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo, o participante terá direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. O pesquisador utilizará os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Este termo está sendo disponibilizado em duas vias originais; uma ficará com o participante da pesquisa e a outra com o pesquisador. Todas as folhas deverão ser rubricadas (assinadas) pelo pesquisador e pela participante no momento da aplicação do termo de consentimento.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação da microbiota de recém-nascidos submetidos à colostroterapia”. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer

momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Li ou leram por mim, e entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

### **Consentimento Pós-Esclarecido**

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante de Pesquisa ou  
do Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Taddei de Castro Neves - Laboratório Clínico de Biologia Molecular  
Endereço: Avenida Professor Lineu Prestes, 2565, Butantã, SP  
Hospital Universitário da USP  
CEP: 05508-000 – Telefone: 3091-9509

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** da **Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones: (11) 3091-3622 e (11) 3091-3677, e-mail: [cepcf@usp.br](mailto:cepcf@usp.br).

**Comitê de Ética em Pesquisa - Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros:**  
Av. Celso Garcia, 2477, Belenzinho, São Paulo, CEP 03015-000 Telefone: (11) 2292-4188

## Anexo 4. Ficha de coleta de dados

### FICHA DE DADOS CLÍNICOS E SÓCIO-DEMOGRÁFICOS

Dados Maternos	Peso (kg)	Altura (cm)	Pressão arterial (hg/mm)

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ Natural: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Data de nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (Idade: \_\_\_\_\_)

Profissão: ( ) desempregada ( ) empregada - Qual emprego? \_\_\_\_\_

Estado civil: ( ) casada ( ) união consensual ( ) solteira ( ) Outras: \_\_\_\_\_

Cor/Raça (auto-declarada): ( ) branca ( ) negra ( ) parda ( ) indígena ( ) asiática

#### **Escolaridade:**

( ) sem instrução ( ) fundamental incompleto ( ) fundamental

completo

( ) médio incompleto ( ) médio completo ( ) superior

incompleto

( ) superior completo ( ) pós-graduação

#### **Antecedentes Pessoais:**

( ) Tabagismo- Frequência durante a gestação: \_\_\_\_\_

( ) Etilismo- Frequência durante a gestação: \_\_\_\_\_

( ) Drogas Ilícitas- Frequência durante a gestação: \_\_\_\_\_

#### **Antecedentes Clínicos:**

( ) Diabetes tipo I ( ) Diabetes tipo II ( ) Hipertensão

( ) Doença cardíaca ( ) Doença renal crônica ( ) Doença hepática crônica

( ) Anemia grave ou outra hemoglobinopatia ( ) Convulsões / Epilepsia

( ) Acidente Vascular Cerebral ( ) Doença psiquiátrica

( ) Doença auto-imune (exemplo: Lúpus, artrite reumatóide, febre reumática)

( ) Outros: \_\_\_\_\_

Faz uso de medicação? ( ) Não ( ) Sim - Se sim, quais? \_\_\_\_\_

Internações clínicas: ( ) Não ( ) Sim - Motivo: \_\_\_\_\_

Transfusão sanguínea: ( ) Não ( ) Sim- Motivo: \_\_\_\_\_

#### **Antecedentes Obstétricos:**

( ) Gestações anteriores- Quantas? \_\_\_\_\_

( ) Abortos anteriores - Quantos? \_\_\_\_\_

Consultas no pré-natal (última gestação)? ( ) Não ( ) Sim - Quantas? \_\_\_\_\_

Tempo de bolsa rota - \_\_\_\_\_ horas - Uso de antibiótico? \_\_\_\_\_

( ) Diabetes gestacional ( ) *Streptococcus agalactiae* (grupo B)

( ) Uso de corticóides ( ) Uso de Sulfato de Magnésio

( ) Infecções agudas ou crônicas (especificar)

( ) HAS ( ) Hipertensão na gestação - Medicamento \_\_\_\_\_





## 12. DOCUMENTOS ADICIONAIS

### 12.1. Ficha do aluno

9142 - 9604031 / 1 - Ramon Vitor Cortez de Godoy

**Email:** ramon.cortez@usp.br  
**Data de Nascimento:** 06/07/1989  
**Cédula de Identidade:** RG - 44.966.505-7 - SP  
**Local de Nascimento:** Estado de São Paulo  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Bacharel em Farmácia - Universidade Anhembi Morumbi - São Paulo - Brasil - 2011  
**Mestrado:** Mestre Ciências - Área: (1) - Universidade Federal de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2017

**Curso:** Doutorado  
**Programa:** Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
**Área:** Fisiopatologia  
**Data de Matrícula:** 15/09/2017  
**Início da Contagem de Prazo:** 15/09/2017  
**Data Limite para o Depósito:** 15/09/2021  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Carla Taddei de Castro Neves - 15/09/2017 até o presente Email: crtaddei@usp.br  
**Proficiência em Línguas:**  
Inglês, Aprovado em 15/09/2017  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 06/11/2019



**Data do Depósito do Trabalho:**

**Título do Trabalho:**

**Data Máxima para Aprovação da Banca:**

**Data de Aprovação da Banca:**

**Data Máxima para Defesa:**

**Data da Defesa:**

**Resultado da Defesa:**

**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 15/09/2017  
Mudança de Nível/Curso em 25/09/2018  
Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2021

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5906-2/1	Análise de Dados de Microbioma	26/02/2018	08/04/2018	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5792-5/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III	05/03/2018	19/06/2018	15	1	88	A	N	Concluída
BIE5782-4/3	Uso da Linguagem R para Análise de Dados em Ecologia (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	09/04/2018	29/04/2018	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5954-1/1	Redação de Trabalhos Científicos	12/04/2018	18/04/2018	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5766-6/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia IV	07/08/2018	19/11/2018	15	1	87	A	N	Concluída
MPE5740-5/1	Mecanismos Imunológicos da Tolerância Oral Natural e Induzida (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	10/09/2018	23/09/2018	60	4	95	A	N	Concluída
FBA5728-4/7	Aprimoramento Pedagógico	02/10/2018	29/10/2018	60	4	87	A	N	Concluída
BIE5782-4/4	Uso da Linguagem R para Análise de Dados em Ecologia (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	13/05/2019	07/06/2019	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
<b>Disciplinas:</b>	0	20	21
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	20	21

**Créditos Atribuídos à Tese:** 167

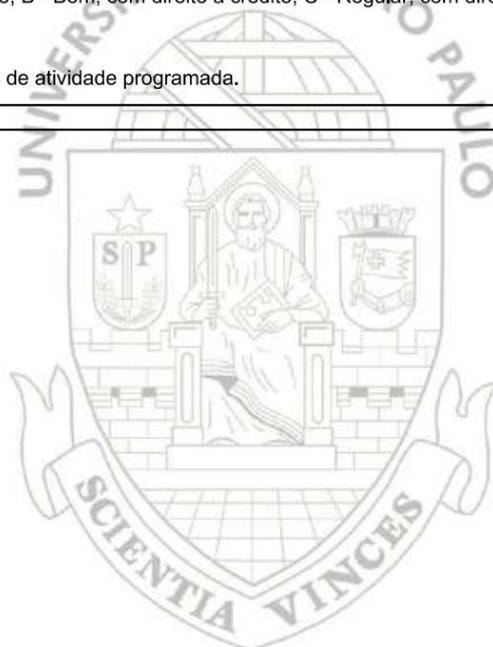
**Observações:**

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 656, de 22.05.2017

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.



**Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo: <https://uspdigital.usp.br/iddigital>**

Documento emitido às 15:24:49 horas do dia 09/09/2021 (hora e data de Brasília)

Código de controle: B5S7-GRJ8-F9M3-43MQ

Código de controle válido até: 09/10/2021

## 12.2. Currículo Lattes atualizado

09/09/2021 15:41

Currículo Lattes



Imprimir  
currículo



### Ramon Vitor Cortez de Godoy

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2696457123234327>

Última atualização do currículo em 09/09/2021

#### Resumo informado pelo autor

Graduado em Farmácia pela Universidade Anhembi Morumbi (2011), pós graduado em Reprodução Humana Assistida pelo Instituto Sapiientiae (2013) e Mestre em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), no departamento de Obstetrícia, onde avaliou a microbiota intestinal de gestantes com Diabetes Mellitus Gestacional. Atualmente cursa doutorado no Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde estuda a evolução da microbiota de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia, através do sequenciamento de nova geração. Possui experiência nas áreas de farmácia hospitalar e laboratorial, com ênfase em biologia molecular, e também ministrou aulas relacionadas a microbiota intestinal e o período gestacional durante o mestrado, e relacionadas a biologia molecular durante o doutorado.

(Texto informado pelo autor)

#### Nome civil

Nome Ramon Vitor Cortez de Godoy

#### Dados pessoais

Nome em citações bibliográficas CORTEZ, R. V.;GODOY, R. V. C.;CORTEZ, R.V.;CORTEZ, RAMON V.;CORTEZ, RV;GODOY, RV;GODOY, RAMON V.C.;CORTEZ, RAMON VITOR

Sexo Masculino

Cor ou Raça Branca

Filiação Heráldo Luis de Godoy e Maria Cristina Cortez de Godoy

Nascimento 06/07/1989 - São Bernardo do Campo/SP - Brasil

Carteira de Identidade 449665057 SSP - SP - 22/08/2007

CPF 383.115.088-52

Endereço residencial Rua José da Penha  
Jardim Danfer - São Paulo  
03729150, SP - Brasil  
Telefone: 11 920067717

Endereço eletrônico E-mail para contato : ramon\_vcg89@hotmail.com  
E-mail alternativo ramon.cortez@usp.br

#### Formação acadêmica/titulação

**2017** Doutorado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Efeito da colostroterapia no estabelecimento da microbiota fecal de recém-nascidos prematuros

Orientador: Carla Tadddei de Castro Neves   
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2015 - 2017** Mestrado em Medicina (Obstetrícia).  
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil  
Título: Avaliação da microbiota intestinal e sua relação com o Diabetes Mellitus Gestacional, Ano de obtenção: 2017

Orientador: Sílvia Daher   
Co-orientador: Carla Tadddei de Castro Neves  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
Palavras-chave: Microbiota Intestinal, Diabetes Gestacional, Inflamação  
Áreas do conhecimento: Microbiologia, Medicina, Ginecologia e Obstetrícia

**2013 - 2013** Especialização em Reprodução Humana Assistida.  
Associação Instituto Sapiientiae, SAPIENTIAE, São Paulo, Brasil  
Título: CANCER DE TESTICULO E SUAS ASSOCIAÇÕES À FERTILIDADE MASCULINA  
Orientador: Carolina Fernanda Silveira

**2007 - 2011** Graduação em Farmácia.  
Universidade Anhembi Morumbi, UAM, São Paulo, Brasil  
Título: FORMULAÇÕES LIPÍDICAS DE ANFOTERICINA B: UMA ANÁLISE FARMACOECONÔMICA, Ano de obtenção: 2011  
Orientador: Ana Lúcia Faria Ribeiro

#### Formação complementar

**2018 - 2018** Curso de curta duração em Análise de Dados de Microbioma, (Carga horária: 90h).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

**2018 - 2018** Curso de curta duração em RNA-Seq com Galaxy, (Carga horária: 16h).  
Instituto de Ciência Biomédicas (USP), ICB, Brasil

- 2018 - 2018** Curso de curta duração em Redação de Trabalhos Científicos. (Carga horária: 15h).  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Ética Médica. (Carga horária: 16h).  
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Sao Paulo, Brasil  
*Palavras-chave: Ética*
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Análise Estatística. (Carga horária: 60h).  
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Sao Paulo, Brasil  
*Palavras-chave: Estatística, Análise de Dados*
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Curso de Planejamento de Pesquisa Clínica. (Carga horária: 45h).  
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Sao Paulo, Brasil  
*Palavras-chave: Pesquisa Clínica, Epidemiologia, Saúde Coletiva*
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Formação Didático-Pedagógica em Saúde. (Carga horária: 45h).  
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Sao Paulo, Brasil  
*Palavras-chave: Didática, Pedagogia, Educação*
- 2015 - 2015** Extensão universitária em Trato Gastrointestinal: Imunomodulação da Colonização e Infecção Bacteriana.  
(Carga horária: 90h).  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2015 - 2015** Extensão universitária em Curso de Citometria de Fluxo. (Carga horária: 32h).  
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Curso On-line de Pesquisa no PubMed. (Carga horária: 120h).  
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Sao Paulo, Brasil  
*Palavras-chave: Pesquisa*

## Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

### Vínculo institucional

- 2017 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno de Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

2. Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

### Vínculo institucional

- 2015 - 2017** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

3. Criogênese Biotecnologia - CRIO

### Vínculo institucional

- 2012 - 2015** Enquadramento funcional: Farmacêutico , Carga horária: 36, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Principais atividades: Atuação no processamento e criopreservação de células tronco provenientes de sangue de cordão umbilical, aplicação de técnicas de citometria de fluxo (aquisição e análise), cultura e expansão de células tronco mesenquimais a partir de tecido de cordão umbilical e polpa de dente de leite, controle e garantia da qualidade de toda a rotina laboratorial, elaboração de procedimento operacional padrão, aplicação de técnicas de reprodução humana assistida, participação em congressos e pesquisa clínica no âmbito de cultura e expansão celular.

4. Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - ICHC FMUSP

### Vínculo institucional

- 2008 - 2010** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estágio em farmácia , Carga horária: 36, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Principais atividades: Dispensação de medicamentos, envolvendo: triagem de prescrições, separação de medicamentos, conferência dos mesmos e a entrega à unidade de internação (enfermarias); recebimento/recolhimento das devoluções de medicamentos não utilizados pelos pacientes; atendimento de pacientes em alta hospitalar; orientação à equipe de saúde e ao paciente; registro e controle de medicamentos com protocolos clínicos de dispensação.

### Projetos

#### Projetos de pesquisa

- 2017 - Atual** Evolução da microbiota fecal de recém-nascidos prematuros submetidos a colostroterapia

Descrição: A colonização inicial da microbiota intestinal humana é de suma importância, desempenhando papel fundamental no desenvolvimento imunológico, nutricional, metabólico e neurológico. Com a amamentação, o recém-nascido recebe bactérias benéficas à microbiota intestinal, além de proteínas, células de defesa, entre outros componentes, que auxiliam na saúde neonatal. Recém-nascidos prematuros e de baixo peso ao nascimento muitas vezes precisam permanecer internados em unidades de terapia intensiva, e frequentemente a dieta enteral trófica é limitada em consequência da imaturidade do sistema digestivo ou estado clínico do recém-nascido. Terapias estão sendo discutidas para melhorar a saúde de neonatos prematuros ou de baixo peso internados em unidade de terapia intensiva, com foco em diminuir quadros de sepse e tempo de internação. As evidências preliminares defendem o efeito da colostroterapia em reduzir o tempo de alimentação enteral total e incidência de sepse neonatais. Entretanto, pouco se sabe sobre o desenvolvimento da microbiota intestinal de prematuros submetidos a colostroterapia.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa  
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);  
Integrantes: Ramon Vitor Cortez de Godoy; Luana do Nascimento Moreira; Carla Taddei de Castro Neves (Responsável)

- 2014 - 2017** Análise da composição da microbiota oral, intestinal e vaginal e sua relação com o Diabetes Mellitus Gestacional

Descrição: O Diabetes mellitus gestacional (DMG) é o principal distúrbio metabólico que ocorre na gravidez, sendo reconhecido como importante fator de risco para o desenvolvimento de co-morbidades materno-fetais. É uma condição caracterizada por aumento de resistência à insulina (RI) e reação inflamatória exacerbada. Um fator que pode determinar estas alterações é a interação entre microbiota e hospedeiro. Além de aumentar a RI, a composição da microbiota intestinal pode favorecer o desenvolvimento de inflamação induzindo a infiltração de macrófagos em tecido adiposo, assim como a

ativação desta população celular em sangue periférico. Estes processos podem estar associados a alterações dos níveis séricos de diferentes mediadores inflamatórios, tais como citocinas, fetuina-A (Fet-A) e sCD14, relacionadas ou não com o padrão glicêmico e/ou lipídico. Além da microbiota intestinal, a microbiota vaginal e a oral também parecem influenciar a evolução gestacional. Entretanto, não se conhece qual a composição da microbiota da gestante brasileira, sua participação no desenvolvimento do DMG e quais são os marcadores séricos mais relevantes para a avaliação da gestante com DMG. O objetivo deste estudo é avaliar e comparar o padrão da microbiota oral, vaginal e intestinal, assim como o perfil de monócitos de sangue periférico de gestantes com e sem DMG e, de mulheres não-gestantes. Para tanto, pretendemos analisar a composição das microbiota oral, intestinal e vaginal; quantificar e caracterizar monócitos em sangue periférico; avaliar os níveis séricos de Fet-A e de sCD14 e relacionar estes parâmetros com o perfil glicêmico e lipídico em gestantes com e sem DMG e em mulheres não gestantes saudáveis.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa  
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2);  
Integrantes: Ramon Vitor Cortez de Godoy; Sílvia Daher (Responsável); Carla Taddei; Thalita Frutuoso Lobo; Ana Geisa Santos de Angelo; Camila Moraes Borges  
Número de produções C, T & A: 1/

#### 2014 - 2016 Avaliação do perfil de células imunes em pacientes com Diabetes Mellitus Gestacional

Descrição: O Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) o distúrbio metabólico mais frequente da gestação, é definido como a intolerância a glicose que surgiu ou foi identificada durante a gravidez, afeta entre 1% a 25% das gestantes, dependendo da população estudada e dos critérios diagnósticos adotados. Certo grau de inflamação e de resistência à insulina (RI) faz parte das adaptações fisiológicas que ocorrem na gestação normal, entretanto em pacientes com DMG estes dois processos parecem estar exacerbados. Além de fatores hormonais, células imunes, tais como as células NK, linfócitos T, células NKT e suas subpopulações desempenham papel central na indução e modulação desses processos. O objetivo deste estudo é caracterizar o perfil de células imunes em sangue periférico de pacientes com DMG durante o terceiro trimestre da gestação. Para tanto pretendemos avaliar linfócitos TCD4+, TCD8+, T reguladora; linfócitos NKT; células NK e suas subpopulações. E ainda, analisar a expressão de mRNA de IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL17 e CCL21 em células Treg, e a expressão de mRNA de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , granzima, perforina, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1 e CX3CL1 em células NK. Nossa hipótese é de que as gestantes com DMG apresentem alterações em subpopulações de células imunes e na produção de citocinas/quimocinas, e que estes distúrbios possam estar relacionados com o grau de RI e de inflamação, e em última instância com o padrão clínico da doença. Acreditamos que esta investigação poderá contribuir para o esclarecimento da fisiopatologia do DMG, e assim possibilitar a definição de parâmetros mais efetivos para diagnóstico e caracterização da doença.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa  
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);  
Integrantes: Ramon Vitor Cortez de Godoy; Sílvia Daher (Responsável); Thalita Frutuoso Lobo; Ana Geisa Santos de Angelo; Camila Moraes Borges; Rosiane Mattar; MARIA REGINA TORLONI; KAREN PRISCILA PENDELOSKI

## Áreas de atuação

1. Farmácia
2. Microbiologia
3. Biologia Molecular

## Idiomas

<b>Inglês</b>	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
<b>Espanhol</b>	Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Bem , Lê Bem

## Prêmios e títulos

- 2018** Prêmio Américo Yoshinobu Ishiy, pelo trabalho "Microbiota intestinal de recém-nascidos prematuros submetidos a colostroterapia", Associação Brasileira de Profissionais de Bancos de Leite Humano
- 2018** Prêmio Elisa de Carvalho, pelo trabalho "Análise da microbiota intestinal em pacientes pediátricos com diagnóstico de retocolite ulcerativa (RCU), colangite esclerosante primária (CEP) e CEP/RCU", Sociedade Brasileira de Pediatria

## Produção

Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

1.  [DOI](#) CORTEZ, RAMON V.; TADDEI, CARLA R.; SPARVOLLI, LUIZ G.; ÂNGELO, ANA G. S.; PADILHA, MARINA; MATTAR, ROSIANE; DAHER, SILVIA  
Microbiome and its relation to gestational diabetes. ENDOCRINE. [JCR](#) v.64, p.254 - 264, 2019.  
Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1007/s12020-018-1813-z]
2.  [DOI](#) CORTEZ, R.V.; PETRY, T.; CARAVATTO, P.; RODRIGO PESSÓA, FONSECA; SANABANI, SABRI S.; MARTINEZ, M.B.; SARIAN, THAIS; SALLES, J.E.; COHEN, R.; TADDEI, C.R.  
Shifts in intestinal microbiota after duodenal exclusion favor glycemic control and weight loss: a randomized controlled trial. Surgery for Obesity and Related Diseases. [JCR](#) v.14, p.1748 - 1754, 2018.  
Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://https://www.soard.org/article/S1550-7289(18)30442-8/fulltext[doi:10.1016/j.soard.2018.07.021]
3.  [DOI](#) TADDEI, CARLA R.; CORTEZ, RAMON V.; MATTAR, ROSIANE; TORLONI, MARIA REGINA; DAHER, SILVIA  
Microbiome in normal and pathological pregnancies: A literature overview. AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY. [JCR](#) v.80, p.e12993 - 2018.  
Palavras-chave: intestinal tract, microbiome, next generation sequencing, placenta, pregnancy, vaginal tract  
Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29873429][doi:10.1111/aji.12993]
4. [DOI](#) ÂNGELO, ANA G.S.; NEVES, CARLA T.C.; LOBO, THALITA F.; GODOY, RAMON V.C.; ONO, ÉRIKA; MATTAR, ROSIANE; DAHER, SILVIA  
Monocyte profile in peripheral blood of gestational diabetes mellitus patients. CYTOKINE. [JCR](#) v.107, p.79 - 84, 2017.  
Palavras-chave: Cytokine, Gestational diabetes mellitus, Inflammation, Monocyte  
Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29241982]
5.  [DOI](#) CORTEZ, R. V.; MOREIRA, L. N.; PADILHA, MARINA; BIBAS, M. D.; TOMA, R. K.; PORTA, G.; TADDEI, C.R.  
Gut Microbiome of Children and Adolescents With Primary Sclerosing Cholangitis in Association With Ulcerative Colitis. Frontiers in Immunology. [JCR](#) v.11, p.598152 - , 2021.

Referências adicionais: Inglês. Home page: [\[http://https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.598152/full\]](http://https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.598152/full)

6. **[doi]** MAESTRALI, F. G. O.; PILAN, R. R. M.; ATHANAZIO, R.; SPARVOLI, L. G.; CORTEZ, R.V.; TADDEI, C.R.; VOEGELS, R. L. Cystic fibrosis microbiome: analysis of nasal middle meatus and sputum in different lung disease stages. *Rhinology Online*, v.3, p.225 - 237, 2020. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
7. **[doi]** SPARVOLI, LUIZ G.; CORTEZ, RAMON V.; DAHER, SILVIA; PADILHA, MARINA; SUN, SUE Y.; NAKAMURA, MARY U.; TADDEI, CARLA R. Women's multisite microbial modulation during pregnancy. *MICROBIAL PATHOGENESIS*, **JCR**, v.147, p.104230 -, 2020. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [\[doi:10.1016/j.micpath.2020.104230\]](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104230)
8. **[doi]** PADILHA, MARINA; DANNESKJOLD-SAMSØE, NIELS BANHOS; BREJNROD, ASKER; HOFFMANN, CHRISTIAN; CABRAL, VANESSA PEREIRA; IAUCCI, JULIA DE MELO; SALES, CRISTIANE HERMES; FISBERG, REGINA MARA; CORTEZ, RAMON VITOR; BRUX, SUSANNE; TADDEI, CARLA ROMANO; KRISTIANSEN, KARSTEN; SAAD, SUSANA MARTA ISAY The Human Mikrobiota is Modulated by Maternal Diet. *Microorganisms*, v.7, p.502 -, 2019. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [\[http://https://www.mdpi.com/2076-2607/7/11/502\]](http://https://www.mdpi.com/2076-2607/7/11/502)[\[doi:10.3390/microorganisms7110502\]](https://doi.org/10.3390/microorganisms7110502)

#### Capítulos de livros publicados

1. CORTEZ, RAMON V.; MOREIRA, L. N.; TADDEI, C. R. Metabolome and Microbiome From Infancy to Elderly In: *Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications*. 1 ed. Grã-Bretanha: Elsevier, 2019, v.1, p. 85-87. Referências adicionais: Grã-Bretanha/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital, ISBN: 9780128152492, Home page: <https://www.elsevier.com/books/microbiome-and-metabolome-in-diagnosis-therapy-and-other-strategic-applications/faintuch/978-0-12-815249-2>

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. DAHER, SILVIA; GODOY, R. V. C.; SPARVOLI, L. G.; MATTAR, ROSIANE; TRAINA, E.; TADDEI, CARLA R. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL NA GESTAÇÃO: RESULTADOS PRELIMINARES In: XXIII Congresso Paulista de Obstetria e Ginecologia, 2018, São Paulo. Anais do XXIII Congresso Paulista de Obstetria e Ginecologia, 2018, p.117 - 117 Referências adicionais: Brasil/Português.
2. DAHER, SILVIA; GODOY, R. V. C.; TADDEI, CARLA R.; TRAINA, E.; SPARVOLI, L. G.; MATTAR, ROSIANE COMPOSIÇÃO DAS MICROBIOTAS INTESTINAL, ORAL E VAGINAL NO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL - RESULTADOS PRELIMINARES In: XXIII Congresso Paulista de Obstetria e Ginecologia, 2018, São Paulo. Anais do XXIII Congresso Paulista de Obstetria e Ginecologia, 2018, p.117 - 119 Referências adicionais: Brasil/Português.

#### Apresentação de trabalho e palestra

1. FEFERBAUM, R.; MOREIRA, L. N.; CORTEZ, R.V.; FERNANDES, A. P. S.; MARIANI NETO, C.; TADDEI, CARLA R. COLOSTRUM THERAPY MODULATES PRETERM NEWBORN'S GUT MICROBIOME, 2019. (Congresso Apresentação de Trabalho) Referências adicionais: Escócia/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: SEC Centre; Cidade: Glasgow; Evento: ESPGHAN 52nd Annual Meeting; Inst.promotora/financiadora: European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
2. CORTEZ, R.V.; MOREIRA, L. N.; FERNANDES, A. P. S.; FEFERBAUM, R.; MARIANI NETO, C.; TADDEI, C.R. Effects of oropharyngeal administration of human colostrum in fecal microbiota of premature newborns, 2019. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho) Referências adicionais: Itália/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Milan Marriott Hotel; Cidade: Milan; Evento: World of Microbiome - Pregnancy, Birth and Infancy; Inst.promotora/financiadora: Kenes Group
3. Rachid, L; Cominato, L; Franco, RR; CORTEZ, RV; MOREIRA, L. N.; Frascino, A; TADDEI, C. R.; Steinmetz, L; Della Manna, T; Velhote, MCP; Filho, HCM; TOMA, R. K.; Damiani, D OP34 - Changes on Gut Microbiota after Laparoscopic Sleeve Gastrectomy in Adolescence: Case Reports, 2019. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho) Palavras-chave: Gut Microbiota; Obesity; Bariatric Surgery Referências adicionais: Brasil/Inglês. Home page: <https://www.karger.com/Article/Abstract/504400>; Local: AÇORES ESPAÇO DE EVENTOS; Cidade: Florianópolis; Evento: 28th Annual Meeting, Florianópolis; Inst.promotora/financiadora: Sociedad Latinoamericana de Endocrinología Pediátrica
4. CORTEZ, R.V.; PETRY, T.; CARAVATTO, P.; RODRIGO PESSÔA, FONSECA; SANABANI, SABRI S.; MARTINEZ, M.B.; SARIAN, THAIS; COHEN, R.; SALLES, J.E.; TADDEI, C. R. ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA INTESTINAL EM PACIENTES DIABÉTICOS COM OBESIDADE LEVE APÓS DESVIO DUODENO-JEJUNO, 2018. (Congresso Apresentação de Trabalho) Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Hotel Colina Verde; Cidade: São Pedro, São Paulo; Evento: 13 Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Paulista de Diabetes e Metabolismo
5. BENEVIDES, G. N.; BIBAS, M. D.; CORTEZ, R. V.; MOREIRA, L. N.; TOMA, R. K.; TADDEI, C.R.; PORTA, G. Análise da microbiota intestinal em pacientes pediátricos com diagnóstico de retocolite ulcerativa (RCU), colangite esclerosante primária (CEP) e associação CEP / RCU, 2018. (Congresso Apresentação de Trabalho) Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Pernambuco; Cidade: Porto de Galinhas; Evento: Congresso Brasileiro de Gastroenterologia Pediátrica; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Pediatria
6. SPARVOLI, L. G.; CORTEZ, R.V.; TADDEI, C.R. Characterization of vaginal microbiota and quantification of *Lactobacillus* sp. and *Streptococcus Agalactiae* during pregnancy, 2018. (Outra, Apresentação de Trabalho) Referências adicionais: Brasil/Português. Local: Universidade de São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XXII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas
7.  CORTEZ, R.V.; MOREIRA, L. N.; FERNANDES, A. P. S.; FEFERBAUM, R.; TADDEI, C. R. Establishment of intestinal microbiome in neonates, 2018. (Simpósio, Apresentação de Trabalho) Referências adicionais: Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Institute of Biotechnology; Cidade: Ithaca, New York; Evento: Our Microbes, Our Global Health; Inst.promotora/financiadora: Cornell University
8. CORTEZ, R.V.; MOREIRA, L. N.; FERNANDES, A. P. S.; FEFERBAUM, R.; TADDEI, C. R. MICROBIOTA INTESTINAL DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS SUBMETIDOS À COLOSTROTERAPIA – RESULTADOS PRELIMINARES, 2018. (Congresso Apresentação de Trabalho) Referências adicionais: Brasil/Bretã. Meio de divulgação: Impresso; Local: Centro de Integralidade do Hospital do Servidor Público Estadual; Cidade: São Paulo; Evento: V CONGRESSO PAULISTA DE BANCOS DE LEITE HUMANO, XV ENCONTRO PAULISTA DE ALEITAMENTO MATERNO, ENCONTRO NACIONAL DAS REFERÊNCIAS ESTADUAIS EM BLH E II CONGRESSO MACROREGIONAL DA REGIÃO SUDESTE; Inst.promotora/financiadora: STELA MARIS ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS
9. BORGES, C. M.; LOBO, T. F.; ANGELO, A. G. S.; KAWAOKU, E. O.; GODOY, R. V. C.; MATTAR, R.; Daher, S. Circulating NKT cells in patients with Gestational Diabetes: preliminary findings, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho) Referências adicionais: Chile/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Chile; Cidade: Puerto Varas; Evento: SLIMP; Inst.promotora/financiadora: Latin American Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta

10. BORGES, C. M.; LOBO, T. F.; ANGELO, A. G. S.; KAWAOKU, E. O.; **GODOY, R. V. C.**; MATTAR, R.; Daher, S  
**Circulating NKT cells in patients with Gestational Diabetes: preliminary findings**, 2017. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)  
*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: SOGESP 2017; Inst.promotora/financiadora: Associação Brasileira de Obstetria e Ginecologia do Estado de São Paulo*
11. LOBO, T. F.; BORGES, C. M.; ANGELO, A. G. S.; **GODOY, R. V. C.**; PENDELOSKI, K. P.; MATTAR, R.; Daher, S  
**Evaluation of Treg, NK cells and their subsets in healthy pregnant women: preliminary results**, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
*Referências adicionais: Chile/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Chile; Cidade: Puerto Varas; Evento: SLIMP; Inst.promotora/financiadora: Latin American Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta*
12. ANGELO, A. G. S.; LOBO, T. F.; MATTAR, R.; TORLONI, M. R.; **CORTEZ, R. V.**; Daher, S  
**Citocinas Intracelulares em Monócitos de Pacientes com Diabetes Mellitus Gestacional: Resultados Preliminares**, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
*Palavras-chave: Diabetes Gestacional, Perfil Imune*  
*Sectores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico*  
*Referências adicionais: Brasil/Português; Cidade: São Paulo; Evento: Associação de Obstetria e Ginecologia do Estado de São Paulo; Inst.promotora/financiadora: SOGESP*
13. ANGELO, A. G. S.; LOBO, T. F.; MATTAR, R.; TORLONI, M. R.; PENDELOSKI, K. P.; KAWAOKU, E. O.; **CORTEZ, R. V.**; Daher, S  
**Monocyte Subsets in Patients with Gestational Diabetes Mellitus: Preliminary Findings**, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
*Palavras-chave: Diabetes Gestacional, Perfil Imune*  
*Sectores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico*  
*Referências adicionais: Brasil/Português. Home page: http://eventos.com.br/diabetes2016/; Cidade: São Paulo; Evento: 12 Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Paulista de Diabetes e Metabolismo*
14. WALCZAK, S. Z.; CARVALHO, P C A; **CORTEZ, R. V.**  
**Estudo Comparativo das Formulações Lipídicas de Anfotericina B em Hospital Público Terciário**, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
*Áreas do conhecimento: Farmacologia Clínica*  
*Referências adicionais: Argentina/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Mar del Plata; Cidade: Buenos Aires; Evento: Congreso de Farmacia Hospitalaria; Inst.promotora/financiadora: Asociación Argentina de Farmacéuticos de Hospital*

Produção técnica

#### Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. **CORTEZ, R.V.; MOREIRA, L. N.; TADDEI, C.R.**  
**Leite materno dos primeiros sete dias ajuda a determinar microrganismos dos bebês**, 2019  
*Referências adicionais: Brasil/Português. Home page: https://jomal.usp.br/ciencias/ciencias-da-saude/leite-materno-dos-primeiros-sete-dias-determina-microbiota-dos-bebes/*

## Eventos

Eventos

#### Participação em eventos

1. Apresentação Oral no(a) **13 Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo**, 2018. (Congresso)  
**ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA INTESTINAL EM PACIENTES DIABÉTICOS COM OBESIDADE LEVE APÓS DÉSPIO DUODENO-JEJUNO.**
2. **Ganepao 2018: 8th ICNO/CBNC - International Conference of Nutritional Oncology / Brazilian Conference of Nutrition in Cancer and 2nd NEXSA - International Conference of Nutrition, Exercise and Health**, 2018. (Congresso)
3. Apresentação Oral no(a) **Our Microbes, Our Global Health**, 2018. (Oficina)  
Establishment of intestinal microbiome in neonates.
4. **VIII SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS – SIMPAC AND III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PATHOPHYSIOLOGY AND TOXICOLOGY - ISPAT**, 2018. (Simpósio)
5. **International Life Sciences Institute Brasil**, 2016. (Simpósio)
6. **IV Workshop sobre Interação Materno-Fetal: Desenvolvimento Morfológico da Placenta**, 2015. (Simpósio)

#### Citações

Web of Science		
Total de trabalhos: 8	Total de citações: 47	Fator H: 5
Ramon Vitor Cortez		

## Totais de produção

#### Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	8
Capítulos de livros publicados	1
Trabalhos publicados em anais de eventos	2
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra)	2
Apresentações de trabalhos (Congresso)	9
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	2
Apresentações de trabalhos (Outra)	1

**Produção técnica**

---

Programa de Rádio ou TV (entrevista)	<b>1</b>
--------------------------------------	----------

---

**Eventos**

---

Participações em eventos (congresso)	<b>2</b>
Participações em eventos (simpósio)	<b>3</b>
Participações em eventos (oficina)	<b>1</b>

---

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 09/09/2021 às 15:40:22.