



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Izadora Borgmann Frizzo

**Caracterização da microbiota de leite de doadora personalizado com leite  
da mãe de recém-nascidos prematuros**

Florianópolis

2023

Izadora Borgmann Frizzo

**Caracterização da microbiota de leite de doadora personalizado com leite  
da mãe de recém-nascidos prematuros**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestra em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero.

Coorientadora: Profa. Dra. Jussara Kasuko Palmeiro.

Florianópolis

2023

## Ficha de identificação da obra

Frizzo, Izadora Borgmann

Caracterização da microbiota de leite de doadora  
personalizado com leite da mãe de recém-nascidos prematuros /  
Izadora Borgmann Frizzo ; orientadora, Thaís Cristine Marques  
Sincero, coorientador, Jussara Kasuko Palmeiro, 2023.  
124 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação  
em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Análises clínicas. 3. Microbiota. 4. Leite  
materno. 5. Metabarcoding. I. Sincero, Thaís Cristine Marques.  
II. Palmeiro, Jussara Kasuko. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Izadora Borgmann Frizzo

**Caracterização da microbiota de leite de doadora personalizado com leite da mãe de recém-nascidos prematuros**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado, em 07 de agosto de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Maria Luiza Bazzo, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rubens Duarte, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Farmácia.

---

Profa. Dra. Fabíola Branco Fillipin Monteiro  
Sub-coordenadora do Programa

---

Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero  
Orientadora

Florianópolis, 15 de agosto de 2023.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Nilson e Lilian Frizzo, que me apoiaram em todas as minhas escolhas e sempre acreditaram que eu era capaz.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Nilson e Lilian Frizzo, sem os quais eu não estaria aqui hoje. Obrigada por sempre acreditarem em mim e possibilitarem que eu corresse atrás dos meus sonhos. Graças a vocês, hoje esse trabalho representa a conquista de mais um deles. Pelas incontáveis horas em chamada de vídeo, pelo colo, carinho, por serem a minha fortaleza e por me levantarem todas as vezes em que eu caí, obrigada. Palavras nunca serão suficientes para expressar toda a minha gratidão. Agradeço também a minha irmã Ana Clara, por todo o amor e apoio mesmo com a distância. Amo vocês!

Ao meu noivo Nathiel Demski de Assunção, por estar comigo todos os dias, me apoiando, amparando e acreditando em mim, principalmente nas tantas vezes em que eu não acreditei. Obrigada por segurar minha mão e por ser o meu lar, sem você eu não conseguiria.

À minha orientadora Thaís Cristine Marques Sincero, por ter me acolhido desde o primeiro e-mail que enviei, por ter aceitado me orientar e por acreditar em mim para a realização desse lindo projeto. Agradeço a confiança em mim depositada durante esses dois anos e toda a paciência, disponibilidade, empatia, carinho e calma em desempenhar seu papel com tamanha maestria. É um grande privilégio ser sua aluna e orientanda.

À minha coorientadora Jussara Kasuko Palmeiro, por acreditar em mim e por todo o apoio, ensinamentos, carinho e amizade presentes ao longo de toda essa trajetória. Foram muitos os aconselhamentos no decorrer do trabalho, e sem eles o resultado não seria o mesmo. Não me canso de dizer a alegria que é ter essa super “dupla de orientadoras”, que além de exímias professoras, são dois seres humanos incríveis pelos quais tenho muito carinho. Tenho muita sorte em ter encontrado vocês, obrigada por tudo!

Ao professor Carlos R. Zarate-Blades, coordenador do projeto geral, pela confiança, amizade, suporte e valiosos aprendizados. És um exemplo de profissional e ser humano, e me sinto privilegiada em ter tido a oportunidade de trabalhar com o senhor em um projeto tão especial. Obrigada, professor.

À minha parceira de pesquisa, Isis Mello, por ser a melhor dupla que eu poderia imaginar em ter. Sem você esse trabalho não seria possível. Caminhamos juntas desde o início dessa trajetória, crescendo, aprendendo, tropeçando, amadurecendo e construindo uma amizade que levarei para o resto da minha vida com muito carinho. Obrigada por tudo!

À Dra. Livia Eslabão, do Laboratório de Imunorregulação (iREG), por todo o auxílio na parte de análises estatísticas do trabalho, agradeço toda a paciência e disponibilidade em me ensinar.

Ao professor Dany Mesa, do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, de Curitiba/PR, por ter aceitado fazer parte desse trabalho. Seus valiosos ensinamentos me fizeram crescer como pesquisadora, e agradeço imensamente a paciência, disponibilidade e extenso trabalho realizado juntamente com seu colega bioinformata Rodrigo Cardoso, ao qual estendo meus agradecimentos.

A toda equipe do Lactário e do Banco de Leite Humano da Maternidade Carmela Dutra, pelo importante e essencial trabalho realizado com a manipulação das amostras de leite. Sem o comprometimento por parte dessas equipes em participar da pesquisa esse trabalho não teria sido possível. Muito obrigada!

Ao parceiro de projeto e amigo, Lucas Soveral, do iREG, por toda a parceria e por estar sempre disponível para ajudar de todas as formas, obrigada!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MiMA), em especial ao Gustavo Rocha, Mateus Ribas, Juliana Dal Pizzol e Luany Hinkel, por toda a compreensão, solidariedade e pelas nossas valiosas trocas, muito obrigada! O trabalho com certeza se tornou muito mais leve e prazeroso por ter vocês como parceiros nesse laboratório que tenho tanto carinho.

À doutoranda Thaise Brancher Soncini, do PPG em Ciências Médicas da UFSC, pelo trabalho desenvolvido com os dados clínicos das gestantes do projeto.

À médica neonatologista Eloísa Bartmeyer, pela ajuda com o intermédio com a Maternidade, disponibilização de prontuários e a gentileza em entregar amostras no laboratório tantas vezes.

Ao professor Oscar Bruna-Romero, professor Edson da Silva e pessoal do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS/UFSC), pelos empréstimos de freezer para armazenamento das amostras do projeto.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos e à FAPESC pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PPGFar), que por meio de um corpo docente comprometido e ensino de excelência, me proporcionaram essa importante etapa de continuidade da minha formação da forma que sempre sonhei. Tenho IMENSO orgulho em ter a UFSC e o PPGFar como parte da minha história.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes”

(Isaac Newton, 1676)



## RESUMO

A prematuridade consiste no nascimento em idade gestacional abaixo de 37 semanas e afeta cerca de 15 milhões de gestantes em todo o mundo anualmente, sendo ainda a principal causa de mortalidade e morbidade neonatal. Os bebês nascidos prematuros apresentam imaturidade em órgãos e sistemas, sendo especialmente necessitados dos componentes do leite materno da própria mãe. Na maioria dos casos de parto prematuro, no entanto, as mães não conseguem produzir quantidade suficiente de leite para atender ao neonato, ou até mesmo qualquer quantidade. Nesses casos, a principal alternativa está no leite de mães doadoras por meio de um Banco de Leite Humano. Esse leite doado passa pelo processo de pasteurização, que é indispensável para a garantia da segurança microbiológica, entretanto sabe-se que esse processo também causa a depleção de compostos bioativos e da microbiota leite. Um estudo prévio de 2017 demonstrou ser possível restabelecer microrganismos de ocorrência natural do leite por meio da inoculação de 10% do leite da mãe em 90% de leite pasteurizado de doadora. Baseado nisso, o presente estudo consistiu em avaliar a composição e diversidade de amostras de leite de 19 mães de prematuros (LM), amostras de leite de doadoras pasteurizado (LP) e o leite personalizado (LI), por meio do sequenciamento das regiões V3 e V4 do 16S rRNA, e também relacionar os resultados com os dados clínicos das gestantes. Os resultados obtidos demonstraram que cada mãe possui um perfil único de microbiota, com abundância principal dos gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* e *Streptococcus*. Os grupos não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre si. Ao comparar cada amostra LM com seu respectivo LI, 47,6% dos casos apresentou importante semelhança de abundância de gêneros entre as amostras, sugerindo o sucesso do processo de personalização nesses casos. Ao avaliar os resultados relacionados com os dados clínicos, as mães que apresentaram alguma infecção no período próximo ao parto e utilizaram antimicrobiano demonstraram uma proximidade de composição que é significativamente diferente, bem como uma maior diversidade de gêneros no grupo referente à ausência de infecção. Ainda, destaca-se que o gênero *Staphylococcus* foi significativamente mais abundante no grupo de mães que tiveram parto cesárea, o que está de acordo com o que mostra a literatura. As diferenças qualitativas observadas nos resultados do estudo com as amostras de leite, considerando a microbiota imatura do recém-nascido prematuro, já podem significar um impacto na sua modulação. O processo de personalização do leite pode vir a ser um procedimento a ser adotado como forma de melhorar a ocorrência de microrganismos benéficos do leite materno, considerando a especificidade do leite de cada mãe para seu próprio filho.

**Palavras-chave:** Leite materno. Microbiota. *Metabarcoding*. Prematuridade.

## ABSTRACT

Prematurity consists of birth at a gestational age below 37 weeks and affects approximately 15 million pregnant women worldwide annually, remaining the leading cause of neonatal mortality and morbidity. Premature infants exhibit immaturity in organs and systems, particularly relying on components of their own mother's breast milk. In most cases of premature birth, however, mothers are unable to produce a sufficient quantity of milk to meet the needs of the newborn, or even any amount at all. In such cases, the primary alternative is donor milk from a Human Milk Bank. This donated milk undergoes the pasteurization process, which is essential for ensuring microbiological safety, although it is known to cause depletion of bioactive compounds and the milk microbiota. A previous study from 2017 demonstrated the possibility of restoring naturally occurring milk microorganisms by inoculating 10% of the mother's milk into 90% pasteurized donor milk. Based on this, the present study aimed to evaluate the composition and diversity of milk samples from 19 mothers of preterm infants (LM), pasteurized donor milk samples (LP), and personalized milk (LI), through sequencing of the V3 and V4 regions of the 16S rRNA, and also to correlate the results with the clinical data of the pregnant women. The results obtained demonstrated that each mother possesses a unique microbiota profile, with the main abundance of the genera *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, and *Streptococcus*. The groups did not show statistically significant differences among themselves. When comparing each LM sample with its respective LI, 47.6% of the cases presented significant similarity in the abundance of genera between the samples, suggesting the success of the customization process in these cases. Evaluating the results related to the clinical data, mothers who had an infection in the period near childbirth and used antibiotics exhibited a composition proximity that is significantly different, as well as a greater diversity of genera in the group without infection. Furthermore, it is noteworthy that the genus *Staphylococcus* was significantly more abundant in the group of mothers who had a cesarean section, which aligns with what the literature shows. The qualitative differences observed in the study results with milk samples, considering the immature microbiota of the premature newborn, may already have an impact on its modulation. The milk customization process may become a procedure to be adopted as a means to improve the occurrence of beneficial microorganisms in breast milk, considering the specificity of each mother's milk for her own child.

**Keywords:** Breast milk. Microbiota. *Metabarcoding*. Prematurity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia da mama e alterações durante o período de lactação.	27
Figura 2 - Principais hormônios da gravidez.	29
Figura 3 - Funções biológicas das proteínas do leite materno.	31
Figura 4 – Vias potenciais que explicariam a origem das bactérias do leite humano.	44
Figura 5 – Fluxo de trabalho dos BLHs no Brasil.	49
Figura 6 – Fluxograma de análise de dados do sequenciamento de DNA.	59
Figura 7 – Quantificação de <i>Staphylococcus</i> spp. em amostras de leite.	62
Figura 8 - Quantificação de bactérias ácido-láticas em amostras de leite.	63
Figura 9 – Diagrama de Venn do número de gêneros presentes nos grupos de leite LI, LM e LP.	68
Figura 10 – Diagrama de Venn do número de gêneros presentes nos grupos de leite LI e LM	68
Figura 11 - Abundância relativa de filos bacterianos nos grupos LI, LM e LP.	69
Figura 12 - Abundância relativa de gêneros bacterianos nos grupos LI, LM e LP.	70
Figura 13 - Abundância relativa de gêneros por amostra dos grupos LI, LM e LP.	71
Figura 14 - Abundância relativa de cada LM com seu respectivo LI	72
Figura 15 – Medidas de alfa-diversidade das amostras por grupo LI, LM e LP.	73
Figura 16 – Gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) para amostras dos grupos LI, LM e LP.	70
Figura 17 - Abundância relativa de gêneros bacterianos por tipo de parto.	76
Figura 18 - Abundância relativa de gêneros por amostra, por tipo de parto.	77
Figura 19 - Ocorrência do gênero <i>Staphylococcus</i> no leite por tipo de parto.	78
Figura 20 - Ocorrência do gênero <i>Raoultella</i> no leite por tipo de parto.	79
Figura 21 - Medidas de alfa-diversidade para grupos de amostras por tipo de parto.	80

Figura 22 – Gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) para amostras dos grupos de mães de parto cesárea e vaginal.	81
Figura 23 - Abundância relativa de gêneros bacterianos por ocorrência de infecção perinatal	83
Figura 24 - Abundância relativa de gêneros por amostra, por ocorrência de infecção perinatal.	83
Figura 25 - Ocorrência do gênero <i>Sphingomonas</i> no leite por ocorrência ou não de infecção perinatal.	84
Figura 26 - Medidas de alfa-diversidade para grupos de amostras por ocorrência ou não de infecção perinatal.	85
Figura 27 - Gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) para amostras dos grupos de mães com ocorrência ou não de infecção perinatal.	86
Figura 28 - Abundância relativa de gêneros bacterianos por uso de antimicrobiano.	88
Figura 29 - Abundância relativa de gêneros por amostra, por uso de antimicrobiano	88
Figura 30 - Medidas de alfa-diversidade para grupos de amostras por uso de antimicrobiano	89
Figura 31 - Gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) para amostras dos grupos de mães por uso de antimicrobiano	90
Figura 32 - Abundância relativa de gêneros bacterianos por classificação da prematuridade.	91
Figura 33 - Abundância relativa de gêneros por amostra, por classificação de prematuridade.	91
Figura 34 - Medidas de alfa-diversidade para grupos de amostras por classificação de prematuridade.	92
Figura 33 – Gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) para amostras dos grupos de mães de bebês pré-termo extremos e muito pré-terms.	93
Figura 34 - Medidas de alfa-diversidade para grupos de amostras por classificação de prematuridade.	94

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Bactérias mais comumente encontradas no leite materno.

40

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Dados demográficos e clínicos das mães participantes.	58
Tabela 2 - Gêneros identificados por banco de dados e abordagem	62

## **LISTA DE APÊNDICES**

Apêndice 1 - Exemplo do efeito das filtrações na qualidade do sequenciamento	117
Apêndice 2 - Gêneros bacterianos por interseção dos grupos de leite	118

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do ensaio clínico

110



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	Bactérias ácido-láticas
BLH	Banco de Leite Humano
EPT	Pré-termo extremo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GGL	Glóbulos de Gordura do Leite
HoP	<i>Holder Pasteurization</i>
HTST	<i>High-Temperature Short-Time</i>
IFF	Instituto Fernandes Figueira
IMC	Índice de Massa Corporal
LI	Leite inoculado
LM	Leite da mãe de recém-nascido prematuro
LP	Leite de doadora pasteurizado
MGGL	Membrana dos Glóbulos de Gordura do Leite
MiMA	Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada
MRS	Ágar Man, Rogosa e Sharp
MSA	Ágar manitol salgado
NEC	Enterocolite necrosante
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
OMS	Organização Mundial da Saúde
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
rBLH-BR	Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano
RN	Recém-nascido
RNPT	Recém-nascido pré-termo
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VPT	Muito pré-termo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>23</b>
2.1 PREMATURIDADE E A AMAMENTAÇÃO	23
2.2 LEITE MATERNO	27
<b>2.2.1 Fisiologia da lactação</b>	<b>27</b>
<b>2.2.2 Composição do leite materno</b>	<b>30</b>
2.2.2.1 Proteínas	30
2.2.2.2 Gorduras	32
2.2.2.3 Carboidratos	34
2.2.2.4 Micronutrientes	34
2.2.2.5 Oligossacarídeos	36
2.2.2.6 Hormônios e citocinas	37
<b>2.2.3 Microbiota do leite materno</b>	<b>38</b>
<b>2 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS</b>	<b>50</b>
2.3 OBJETIVO GERAL	50
2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>51</b>
3.1 COLETA DE AMOSTRAS	51
3.2 ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	52
3.3 COLETA, REGISTRO E ANÁLISE DE DADOS CLÍNICOS	53
3.4 CULTURA MICROBIOLÓGICA	53
3.5 EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA	54
3.6 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	54
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	56
3.8 ASPECTOS ÉTICOS	57
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
4.1 DADOS CLÍNICOS DAS MÃES	58

4.2 TESTES MICROBIOLÓGICOS	59
4.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA	61
4.3.1 Composição e diversidade bacteriana por grupo de leite	63
4.3.2 Composição e diversidade bacteriana de LM por parâmetro clínico: tipo de parto	72
4.3.3 Composição e diversidade bacteriana de LM por parâmetro clínico: infecção perinatal	79
4.3.4 Composição e diversidade bacteriana de LM por parâmetro clínico: uso de antimicrobiano	85
4.3.5 Composição e diversidade bacteriana de LM por parâmetro clínico: classificação da prematuridade	91
5 CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	97
APÊNDICE 1 - Exemplo do efeito das filtragens na qualidade do sequenciamento	110
APÊNDICE 2 - Gêneros bacterianos por interseção dos grupos de leite	111
ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do ensaio clínico	116

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

É considerado prematuro todo nascimento ocorrido antes de 37 semanas de gestação, e aproximadamente 70% dos casos de prematuridade ocorrem de maneira espontânea e fazem parte de um processo multifatorial, que desencadeia contrações ativas na gestante, cursando com a expulsão do concepto antes do termo (GILMAN-SACHS et al., 2018; STEVENSON et al., 2019). Os fatores que podem levar ao parto prematuro espontâneo variam de acordo com a idade gestacional e parecem estar relacionados a fatores pessoais, sociais e ambientais (STEVENSON et al., 2019). Na maioria dos casos, o fator que levou ao parto prematuro não é identificado, entretanto, sabe-se que a infecção está entre os principais fatores de risco (ROMERO; DEY; FISHER, 2014). Já as interrupções induzidas, ou seja, quando a gestação é interrompida por determinada condição materna ou fetal, estão associadas a até 30% de todos os nascimentos prematuros e têm como principais causas a pré-eclâmpsia, o sofrimento fetal agudo, a restrição de crescimento intrauterino e o descolamento prematuro de placenta (TABATABAEI et al., 2019). A prematuridade é conhecida por afetar diferentes sistemas, uma vez que esses bebês nascem com um sistema imunológico imaturo, o que limita sua resistência a infecções, aumentando assim o risco de doenças (ARBOLEYA et al., 2016).

Atualmente, existem evidências de que os prematuros que recebem leite materno tem a morbidade e mortalidade a curto e longo prazo reduzidas (CERASANI et al., 2020; CORPELEIJN et al., 2012), além da amamentação estar associada a uma conectividade estrutural melhorada das redes em desenvolvimento cerebrais de prematuros (BLESA et al., 2019). Os mecanismos pelos quais o leite materno confere proteção são diversos, incluindo propriedades nutricionais, bioativas e imunomoduladoras, além de componentes específicos do leite materno, como proteínas digestíveis, prebióticos e probióticos (FERNÁNDEZ et al., 2018; TAYLOR, 2019). Ainda, no início do século XXI, alguns estudos pioneiros evidenciaram a existência de uma microbiota específica do leite humano, constituindo uma fonte de bactérias potencialmente benéficas para os bebês (FERNÁNDEZ; RODRÍGUEZ, 2020). Uma vez no intestino, essas bactérias protegem contra a disbiose (CACHO; NEU, 2014).

Estudos que utilizaram métodos dependentes de cultura, há muito tempo já mostraram que amostras de leite coletadas higienicamente de mulheres saudáveis contêm uma carga bacteriana relativamente baixa, abaixo de  $1 \times 10^4$  UFC/mL, que consiste principalmente de *Staphylococcus* e *Streptococcus* (HEIKKILA; SARIS, 2003). Mais tarde, por meio de tecnologias de sequenciamento, uma análise mais detalhada do leite materno permitiu um melhor entendimento da composição e diversidade da microbiota, com mais de várias centenas de espécies bacterianas identificadas, dentre elas bactérias ácido-láticas, como *Lactobacillus*, e outras bactérias Gram-positivas de gêneros como *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* e *Rothia*. DNA de bactérias anaeróbicas estritas, como *Bacteroides* e *Clostridium*, também são detectadas em amostras de leite humano (CORONA-CERVANTES et al., 2020; JOST et al., 2013; MOOSSAVI et al., 2019; SCHWAB et al., 2019).

A origem das bactérias do leite humano ainda permanece em grande parte desconhecida, porém, sabe-se que a cavidade oral do bebê e a pele materna podem fornecer microrganismos ao leite, e que bactérias selecionadas da microbiota digestiva materna podem acessar as glândulas mamárias por meio de vias orais e enteromamárias envolvendo interações com células imunes (FERNÁNDEZ; RODRÍGUEZ, 2020).

É bem estabelecido que o leite materno é o alimento ideal para recém-nascidos (RNs). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que todo RN deva ser estimulado à amamentação na primeira hora de vida, ser exclusiva até os 6 meses, e continuada como complemento da alimentação até dois anos ou mais. Porém, mesmo com uma variedade de estudos mostrando as vantagens que o leite materno possui sobre outros tipos de leite, a prevalência do aleitamento materno exclusivo ainda é baixa, sobretudo entre os recém-nascidos pré-termo (RNPTs), o que configura um grave problema na saúde pública (OPAS/OMS, 2018).

Os RNPTs são especialmente necessitados dos componentes do leite da própria mãe, por apresentarem inúmeros sinais de imaturidade de órgãos e estarem mais suscetíveis a infecções (FERNÁNDEZ et al., 2018). No entanto, em uma grande quantidade de partos prematuros a mãe não consegue produzir uma quantidade adequada de leite ou até mesmo qualquer quantidade. O parto prematuro já se mostrou associado ao menor volume de leite (FEWTRELL et al., 2016; PARKER et al., 2012). Hill et al. relataram que apenas 50% das

mães que deram à luz prematuramente foram capazes de extrair leite suficiente para atender às necessidades de seus bebês seis semanas após o nascimento (2005).

Nesses casos, quando não há leite vindo da mãe ou a quantidade disponível não sustenta todas as necessidades nutricionais do neonato, o uso de leite humano de doadora de um Banco de Leite Humano (BLH) é a primeira alternativa, principalmente para prematuros e RNs doentes. O leite de doadora é conhecido por seus benefícios superiores para o recém-nascido em comparação com o uso de fórmula, particularmente na proteção contra enterocolite necrosante (NEC), sepse, juntamente com redução da intolerância alimentar (BERTINO, 2015; PARRA-LLORCA et al., 2018; QUIGLEY; MCGUIRE, 2014).

Por essas razões, a criação de BLHs é altamente importante para a manutenção da saúde do recém-nascido, e esses BLHs seguem diretrizes específicas de operação para otimizar a composição do leite, garantindo sua segurança. Um procedimento comum na preparação do leite dentro do BLH é pasteurização, com o objetivo de tornar o leite de doadora mais seguro para alimentação, por eliminação de patógenos comuns (ARSLANOGLU et al., 2010; GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2022). O método padrão usado para pasteurizar o leite de doadora é um processo de pasteurização a 62,5°C, por 30 min, conhecido como *Holder Pasteurization* (HoP), que diminui a carga bacteriana e inativa vírus (HAIDEN; ZIEGLER, 2017). Acontece que este processo também resulta na inativação de vários dos compostos bioativos e na depleção da microbiota do leite (FERNÁNDEZ et al., 2018).

Mesmo com vantagens em relação à fórmula, deve-se reconhecer que o leite de doadora ainda é muito inferior em benefícios quando comparado ao leite da própria mãe. O leite humano doado não oferece a mesma redução de risco que o leite das próprias mães para múltiplas morbidades em bebês prematuros (MEIER et al., 2017), além de maior risco de baixo crescimento quando alimentados somente com leite doado (COLAIZY et al., 2012). Também, uma vez que o leite doado é pasteurizado, e na maioria das vezes, agrupado, ele não possui a microbiota exclusiva do leite materno de cada mãe para o seu próprio filho, havendo perda de potenciais benefícios para a modulação intestinal e desenvolvimento do bebê (JOST et al., 2014).

Além desses fatores, o resultado do neurodesenvolvimento é o principal exemplo da disparidade entre os benefícios do leite da própria mãe e do leite de doadora. O leite doado

pode ser esgotado de certos fatores de desenvolvimento neurológico, como eritropoietina, IGF-1, vitamina D e fator de crescimento HB-EGF (neurogênese) após a pasteurização (BELFORT; INDER, 2022). Também, os ácidos graxos neuroprotetores essenciais podem ser esgotados pela troca de recipiente que o leite doado deve sofrer (CHETTA; SCHULZ; WAGNER, 2021).

Tendo em vista a queda de qualidade do leite de doadora em relação ao leite da mãe e as necessidades apresentadas pelos RNPTs, é fortemente estimulada a produção de leite, mesmo que em pequenas quantidades, nas UTIs neonatais. Essas pequenas quantidades podem ser utilizadas na personalização do leite de doadora. Segundo Cacho e colaboradores (2017), é possível restabelecer microrganismos de ocorrência natural potencialmente benéficos no leite de doadora a partir da inoculação de 10% do leite da mãe, e incubação deste leite a 37 °C por um período de 4 horas. Este estudo também reportou que a microbiota do leite humano tem um alto grau de variabilidade individual, conferindo um papel ativo à mãe em oferecer um alimento personalizado para seu filho (CACHO et al., 2017).

Com base nisso, o presente projeto estabelece a hipótese de que a inoculação do leite da mãe de RNPTs com o leite de doadora pasteurizado resulta na parcial restauração da microbiota do leite, e visa avaliar a composição e diversidade bacteriana nas amostras de leite do grupo pasteurizado (LP), inoculado (LI) e leite da mãe de RNPTs (LM), bem como avaliar a composição e diversidade de LM, correlacionado com os dados clínicos das gestantes participantes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PREMATURIDADE E A AMAMENTAÇÃO

De acordo com a OMS, parto prematuro é todo aquele nascimento vivo ocorrido antes de 37 semanas completas de gestação. Ainda, o parto prematuro é classificado em pré-termo extremo (<28 semanas), muito pré-termo (28 a <32 semanas) e pré-termo moderado (32 a <34 semanas) a tardio (34 a <37 semanas). Essas distinções são clinicamente importantes pois há aumentos muito grandes na morbidade e mortalidade à medida que a idade gestacional diminui entre os partos prematuros (HARRISON; GOLDENBERG, 2015; ROMERO; DEY; FISHER, 2014). O nascimento prematuro afeta cerca de 15 milhões de crianças em todo o mundo anualmente, e é a principal causa de mortalidade e morbidade neonatal, e segunda principal causa de morte em crianças menores de 5 anos (WALANI, 2020). No Brasil, a prevalência de parto prematuro no período de 2011 a 2021 foi de 11,1% de todos os nascimentos (ALBERTON; ROSA; ISER, 2023), e estima-se que 340 mil bebês nascem prematuros no país por ano, o que é o dobro do índice de países europeus (BRASIL, 2021).

Os partos prematuros podem ser espontâneos ou induzidos por meio de medicação. Os que são induzidos correspondem a cerca de 1/3 de todos os casos, e ocorrem quando o risco para o feto e a mãe é maior do que o benefício de dar continuidade com a gravidez, principalmente por condições como a pré-eclâmpsia, sofrimento fetal e a diabetes gestacional (BOYLE et al., 2017).

Já as ocorrências prematuras e espontâneas do parto correspondem a 70% dos casos e estão envolvidas em múltiplas etiologias causais e associadas. Esses nascimentos envolvem ruptura espontânea das membranas e/ou dilatação espontânea do colo do útero fora do contexto do trabalho de parto, também chamados de colo insuficiente. Dentre os fatores de risco conhecidos estão a idade materna avançada, tabagismo, baixo status socioeconômico, obesidade, período de latência curto entre gestações, gestações múltiplas e colo uterino curto (COBO; KACEROVSKY; JACOBSSON, 2020; KEISER et al., 2019); e destaca-se a presença de inflamação e infecção intramniótica (HUMBERG et al., 2020). As complicações clínicas da gravidez que podem aumentar o risco de parto prematuro também



incluem descolamento prematuro da placenta, placenta prévia e corioamnionite (GOMEZ-LOPEZ et al., 2022).

Um dos principais fatores de risco conhecidos é a infecção intramniótica, que é a presença de microrganismos na cavidade intrauterina. A via de disseminação de microrganismos nesse tipo de infecção tem sido classicamente proposta como a via ascendente, através da vagina e colo de útero. Sabe-se que a microbiota vaginal de mulheres grávidas é principalmente dominada por *Lactobacillus* spp., e essas bactérias produzem ácido láctico, que acidificam o ambiente vaginal e atuam como uma barreira contra infecções do trato reprodutivo (GUPTA; SINGH; GOYAL, 2020). No entanto, quando a quantidade de *Lactobacillus* spp. diminui consideravelmente, há a possibilidade de aumento de microrganismos anaeróbios, resultando em um desequilíbrio da microbiota vaginal, conhecido como disbiose vaginal. A presença de disbiose vaginal tem sido associada à ocorrência de parto prematuro e ruptura pré-termo de membranas, bem como ao risco de parto prematuro espontâneo (BLOSTEIN et al., 2019; STOUT et al., 2017; TABATABAEI et al., 2019; TSONIS et al., 2020). A infecção intramniótica também provoca uma resposta inflamatória detectável no líquido amniótico, e essa inflamação tem prevalência de aproximadamente 30% em mulheres com trabalho de parto prematuro em membranas intactas e até 60% em mulheres com ruptura pré-parto de membranas (GOMEZ-LOPEZ et al., 2022).

Ainda relacionado a microrganismos, You et al. demonstraram que vários táxons no microbioma<sup>1</sup> sanguíneo materno estão associados a partos prematuros, sendo que em nível de filo bacteriano, Firmicutes e Bacteroidetes foram mais abundantes em mulheres com parto prematuro do que em mulheres com parto a termo, enquanto Proteobacteria foi menos prevalente em mulheres com parto prematuro (2019).

Pesquisas acumulam evidências de fatores de risco que envolvem a ocorrência de partos prematuros (ANSARI et al., 2021; COBO; KACEROVSKY; JACOBSSON, 2020; GILMAN-SACHS et al., 2018; PARK et al., 2020; STEVENSON et al., 2019), entretanto, importante salientar que determinar o fator causal de cada caso ainda é um desafio. Um relevante estudo que analisou 4,1 milhões de nascimentos únicos em 5 países de alto índice

---

<sup>1</sup>Conjunto de todos os microrganismos (bactérias, fungos, vírus) presentes em certo ambiente, como organismos, fluidos, células e tecidos biológicos (BERG et al., 2020).

de desenvolvimento socioeconômico demonstrou que mais de 65% do risco agregado total de parto prematuro em cada país carece de uma explicação biológica plausível, e 63% da diferença entre os países não pode ser explicada com fatores conhecidos (FERRERO et al., 2016). Esse achado evidencia a importância de mais estudos acerca da etiologia dos partos prematuros.

Pensando na prevenção e atenção aos casos de possível parto prematuro, destacam-se referências de que os metabólitos plasmáticos maternos se mostram diferentes entre partos a termo e pré-termo (CARTER; PAN; MCRITCHIE, 2019; ELSHENAWY et al., 2020). Parte deles pode estar relacionada com trabalho de parto prematuro, enquanto outros podem ser afetados pela idade gestacional ou início do trabalho de parto. Isso indica que o perfil metabólico pode classificar grupos de parto prematuro ou a termo, aumentando o potencial do metaboloma<sup>2</sup> como um biomarcador para identificar gestações de alto risco (LIZEWSKA et al., 2018; SOUZA et al., 2019).

As complicações de um nascimento prematuro são diversas, tanto a curto quanto a longo prazo. As imediatas incluem maior risco de problemas respiratórios neonatais (como síndrome de dificuldade respiratória e displasia broncopulmonar), NEC, sepse, condições neurológicas (como leucomalácia periventricular, convulsões, hemorragia intraventricular, paralisia cerebral e encefalopatia hipóxico-isquêmica), bem como dificuldades de alimentação e problemas de visão e audição (FILIPPO et al., 2022; MOREIRA; MAGALHÃES; ALVES, 2013). Além disso, 1 em cada 4 bebês pré-termo extremos morrem durante os dias de hospitalização após o nascimento (PATEL, 2016).

Os bebês prematuros tardios já apresentam riscos significativamente maiores de complicações em comparação com bebês a termo, e quanto menor a idade gestacional, maiores essas complicações. O nascimento prematuro está associado a piores resultados de desenvolvimento neurológico, taxas mais altas de internações hospitalares, além de dificuldades comportamentais, socioemocionais e de aprendizagem na infância (ORCHNIK et al., 2011). Também acarreta custos significativos e de longo prazo para os sistemas de saúde, bem como causa dificuldades psicológicas e financeiras consideráveis para as famílias de bebês prematuros (FREY; KLEBANOFF, 2016; PLATT, 2014).

---

<sup>2</sup>Conjunto de todos os metabólitos presentes em uma célula, órgão, tecido ou fluido biológico, sendo estes produtos intermediários ou finais de todas as vias metabólicas em um organismo vivo (NOTO; FANOS; DESSI, 2016).

Os bebês nascidos de parto prematuro apresentam inúmeras características de imaturidade de órgãos e sistemas, estando mais suscetíveis a infecções e morbidades (FERNÁNDEZ et al., 2018), e são bebês especialmente necessitados dos componentes do alimento ouro para RNs (BEGHETTI et al., 2019): o leite materno.

A amamentação representa a continuação da relação entre mãe e filho após o nascimento. Além do conteúdo nutricional, o colostro e o leite maduro contêm muitos componentes que aumentam a resistência do bebê contra infecções. A amamentação tem se mostrado um fator protetor para várias doenças infecciosas, atópicas e cardiovasculares, bem como para leucemia, NEC, doença celíaca e doença inflamatória intestinal (BRAHM; VALDES, 2017; CARR et al., 2021). Também tem um impacto positivo no neurodesenvolvimento, melhorando o coeficiente de inteligência (QI), reduzindo o risco de transtorno de déficit de atenção e transtornos generalizados de desenvolvimento e comportamento (INNIS, 2014; LE DOARE et al., 2018).

Uma metanálise do ano de 2016 publicada na *The Lancet*, que uniu informações de 22 revisões sistemáticas, demonstrou que crianças amamentadas por períodos mais longos apresentam menor morbimortalidade infecciosa, menos maloclusões dentárias e maior inteligência do que aquelas amamentadas por períodos mais curtos ou não amamentadas, desigualdade que persiste até mais tarde na vida. Além disso, para as mulheres que amamentam, a amamentação protege contra o câncer de mama, câncer de ovário e diabetes tipo 2. Os autores ainda comentam que a ampliação da amamentação para um nível quase universal poderia prevenir 823.000 mortes anuais em crianças menores de 5 anos e 20.000 mortes anuais por câncer de mama (VICTORA et al., 2016).

Para os bebês nascidos prematuros a amamentação é ainda mais importante, principalmente no que diz respeito ao risco de desenvolver NEC, que é a principal causa de morte por doença gastrointestinal em neonatos prematuros, afetando 5 a 12% dos neonatos nascidos com muito baixo peso (MEISTER; DOHENY; TRAVAGLI, 2020). RNPTs são mais suscetíveis a patologias intestinais como a NEC devido ao desenvolvimento imaturo do intestino. Mais especificamente, os recém-nascidos prematuros carecem de vários mecanismos de defesa, como ácido gástrico, enzimas, produção de muco, peristaltismo e IgA (CHETTA; SCHULZ; WAGNER, 2021). A ingestão de leite materno durante os primeiros 5 dias de vida já foi associada a uma menor incidência de NEC, sepse e/ou morte

durante os primeiros 60 dias de vida (CORPELEIJN et al., 2012), e uma metanálise associou a amamentação com leite materno com risco reduzido de NEC quando comparado ao uso de fórmula (ALTOBELLI et al., 2020).

## 2.2 LEITE MATERNO

### 2.2.1 Fisiologia da lactação

O leite materno é produzido na mama por meio de uma série de eventos, que iniciam logo nas primeiras semanas de gravidez e se mantêm por todo o período de amamentação, que é recomendado pela OMS até os dois anos de idade da criança ou mais (OMS, 2019).

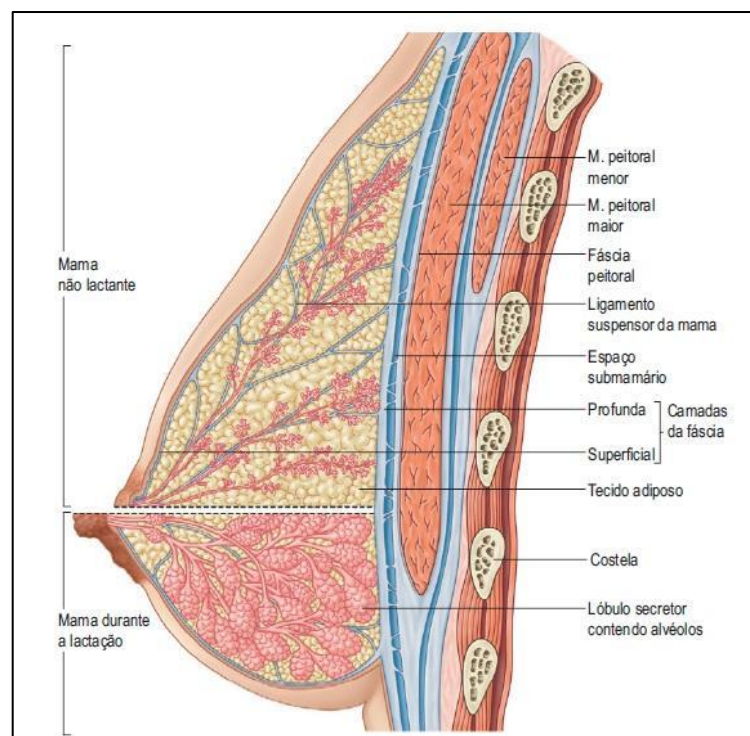
Durante a puberdade, o início do ciclo menstrual e as mudanças nos hormônios como estrogênio e progesterona no corpo levam ao desenvolvimento incompleto da mama, e é somente durante a gravidez que a mama feminina amadurece em sua capacidade total. A maior parte da mama incompletamente desenvolvida consiste em tecido adiposo, mas também compreende parênquima fibroglandular e tecido conjuntivo. O parênquima mamário contém 15 a 20 unidades chamadas lobos. Esses lobos são compostos de 20 a 40 lóbulos e cada lóbulo consiste em 10 a 100 cavidades ocas, conhecidas como alvéolos, com alguns milímetros de tamanho (ALEX; BHANDARY; MCGUIRE, 2020; NEVILLE; NORTON; UMEMURA, 2001).

O epitélio cúbico é capaz de sintetizar os componentes proteicos e lipídicos do leite materno e as células mioepiteliais são capazes de contrair as células epiteliais que compõem cada alvéolo. Os lobos da mama drenam para os ductos lactíferos que se alargam para formar um seio antes de convergir com o mamilo. Os ductos maiores são formados por camadas duplas de células epiteliais cúbicas e os ductos menores são constituídos por uma única camada de células cúbicas, enquanto o seio lactífero é revestido por células epiteliais escamosas estratificadas. O seio lactífero então drena para o complexo mamilo-aréolo - a área circular mais pigmentada no vértice da mama. Abaixo da aréola, as fibras musculares lisas encontram-se em um padrão circular no tecido conjuntivo denso e paralelas aos ductos lactíferos para erigir os mamilos em resposta a estímulos apropriados. A aréola também

contém glândulas sudoríparas, sebáceas e acessórias chamadas de tubérculos de Montgomery, que secretam óleos que mantêm a hidratação e evitam rachaduras nos mamilos (ALEX; BHANDARY; MCGUIRE, 2020; DRAKE et al, 2017; REISENBICHLER; HANLEY, 2019).

Durante a lactação, ocorrem alterações anatômicas e fisiológicas na mama durante a fase de maturação, devido aos níveis elevados de hormônios durante a gravidez (Figura 1). Para o processo de lactogênese, o epitélio dos alvéolos aumenta de tamanho, e por volta da 20ª semana de gestação começam a secretar alguns componentes do leite, como caseína e lactose em resposta aos níveis elevados de estrogênio após a ovulação. Essa etapa é conhecida como lactogênese I, ou diferenciação secretora (ALEX; BHANDARY; MCGUIRE, 2020). Nela, os alvéolos já estão suficientemente diferenciados para secretar uma pequena quantidade de leite, mas a secreção é controlada por altas concentrações plasmáticas de progesterona circulante. A progesterona começa a ser secretada pelo corpo lúteo em torno da segunda semana de gestação, juntamente com o estrogênio, e a placenta assume essa função nas fases posteriores da gravidez (MCGHEE; STEELE, 2020).

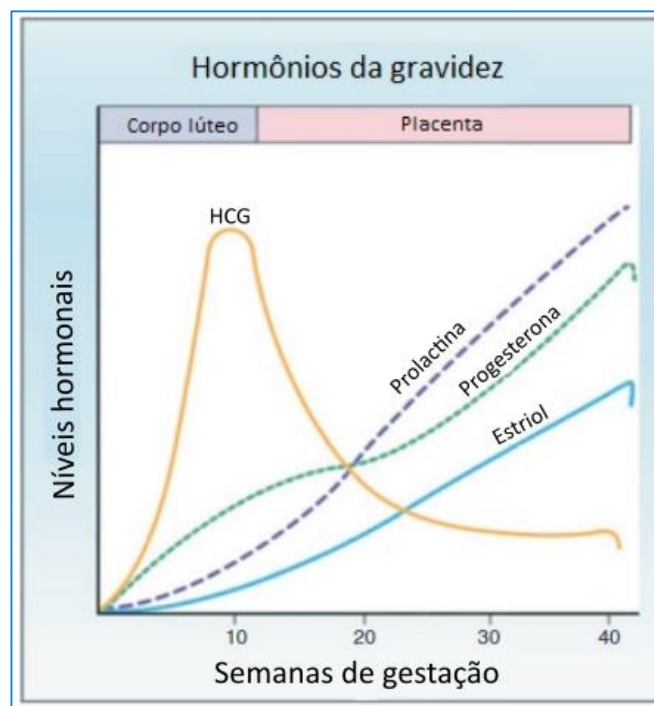
**Figura 1** – Anatomia da mama e alterações durante o período de lactação.



Fonte: Adaptado de Drake et al. (2015)

Antes da gravidez, há uma proporção maior de tecido adiposo em relação ao tecido glandular e ductal das glândulas mamárias. Durante o primeiro trimestre, o sistema ductal se expande e ramifica no tecido adiposo em resposta ao aumento dos níveis de estrogênio. Os níveis elevados de estrogênio também resultam em uma redução do tecido adiposo. Aproximadamente 8 semanas após a fertilização, os trofoblastos, que se desenvolvem na placenta, produzem o hormônio gonadotrofina coriônica humana (HCG). O HCG impede a degradação do corpo lúteo e estimula a sua produção contínua de progesterona e estrogênio (Figura 2) (MCGHEE; STEELE, 2020).

**Figura 2** - Principais hormônios da gravidez.



Fonte: Adaptado de Alex et al. (2020)

Após o nascimento, então, o processo de lactação continua com o que agora é chamado de lactogênese II ou ativação secretora, caracterizado pelo início da secreção abundante de leite associada ao parto. Esse período inicia com a expulsão da placenta e declínio nos níveis de progesterona nos primeiros dias após o parto, acompanhada de uma transformação no epitélio mamário que permite a secreção de grandes volumes de leite (ALEX; BHANDARY; MCGUIRE, 2020).

Essa transformação requer uma mudança coordenada em vários processos, incluindo mudanças na permeabilidade da via paracelular entre as células epiteliais; alterações na secreção de substâncias protetoras, como imunoglobulinas, lactoferrina e carboidratos complexos; e uma taxa aumentada de secreção de todos os componentes do leite (MCGHEE; STEELE, 2020). O estágio II da lactogênese pode ser monitorado por mudanças na composição e volume do leite, que são categorizados em três fases.

O primeiro tipo de leite, presente até aproximadamente o 5º dia de vida do bebê, é chamado de colostro, e é rico em proteínas e imunocomponentes. Entre o 6º e o 15º dia, o leite é chamado de leite de transição, e já tem maiores quantidades de carboidratos. Por fim, a partir do 16º dia o leite já é considerado leite maduro, e possui inúmeros componentes que serão comentados adiante. O leite permanece com mudanças lentas em seus componentes durante todo o período de lactação (NEVILLE; NORTON; UMEMURA, 2001).

## **2.2.2 Composição do leite materno**

O efeito protetor do leite humano parece ser resultado da ação sinérgica de diversos componentes que promovem a saúde, que podem ser categorizados em macronutrientes (proteínas, gorduras e carboidratos), micronutrientes (nutrientes como cálcio, tiamina, riboflavina e vitamina B12), oligossacarídeos, hormônios, citocinas e a microbiota (ERIKSEN et al., 2018). Esses componentes alteram drasticamente suas proporções ao longo da lactação, adaptando-se às necessidades nutricionais do neonato (GATES et al., 2021).

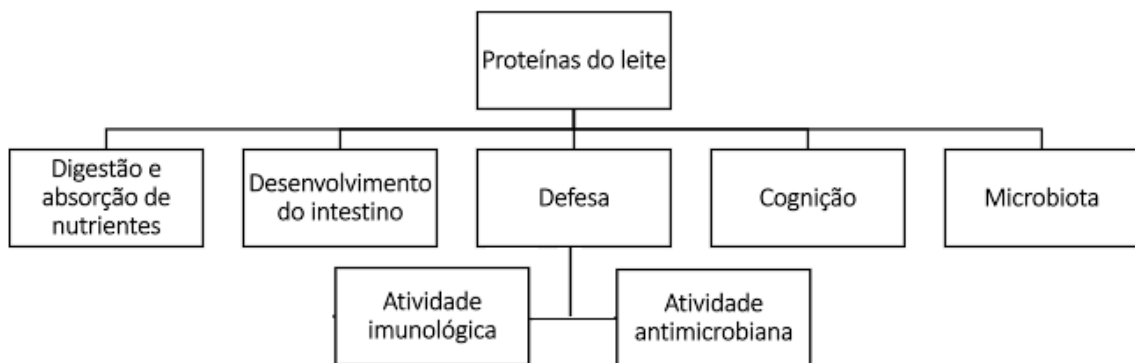
### **2.2.2.1 Proteínas**

As estimadas 400 proteínas do leite humano podem ser classificadas em três grupos: proteínas da Membrana do Glóbulo de Gordura do Leite (MGGL), caseínas e proteínas do soro de leite (DONOVAN, 2019). Sabe-se que a relação entre proteínas do soro e caseínas, que são as mais abundantes, muda ao longo da lactação, diminuindo de 90/10 no colostro (dias 0–5) para 65/35 no leite de transição (dias 6–15), então 60/40 em 1 mês pós-parto e ao longo do primeiro ano de lactação (LÖNNERDAL et al., 2017). As proteínas mais

presentes incluem a lactoferrina, receptor de imunoglobulina polimérica (IgA e IgM),  $\alpha$ 1-antitripsina, lipase ativada por sais biliares, proteína de ligação à vitamina D e haptocorrina (BRUNSER, 2018).

As proteínas do leite humano desempenham uma variedade de funções, incluindo a atuação como fonte de aminoácidos; a melhora da absorção de micronutrientes; o estímulo ao crescimento e amadurecimento do intestino; o apoio à resposta imunológica; a influência na composição do microbioma intestinal; e a contribuição para a aprendizagem e memória (Figura 3) (DONOVAN, 2019; ZHU; DINGESS, 2019). Algumas proteínas têm atividades em várias categorias. Por exemplo, a lactoferrina tem sido associada ao transporte de nutrientes, à defesa do organismo e ao apoio de funções intestinais, cognitivas e imunológicas (BRUNSER, 2018) O leite humano contém também uma variedade de proteínas bioativas, e algumas das bioatividades são exercidas somente após a digestão das proteínas no trato gastrointestinal (LÖNNERDAL et al., 2017).

**Figura 3** - Funções biológicas das proteínas do leite materno.



Fonte: Adaptado de Donovan et al. (2019).

Peptídeos derivados da proteína do leite estão também endogenamente presentes no leite humano, e achados recentes reportam que alguns deles foram relatados como peptídeos bioativos, como por exemplo um peptídeo antimicrobiano e um peptídeo imunomodulador. Um número maior de peptídeos é identificado em aspirados gástricos de lactentes amamentados, e peptídeos bioativos, como os inibidores da enzima conversora de angiotensina I e agonistas opióides são encontrados apenas na digestão do leite humano, mas



não no leite humano propriamente dito. Sabe-se que a caseína é a maior fonte de liberação de peptídeos bioativos (WADA; LÖNNERDAL, 2020).

O que a literatura reporta sobre o assunto sugere que as proteínas presentes no leite materno não apenas contribuem para o crescimento do bebê, mas também auxiliam na maturação de seus órgãos e sistemas, além de fornecer proteção contra deficiências específicas de minerais e vitaminas, sendo especialmente necessárias para o RN prematuro. No leite de mães pré-termo, a presença de alto teor de proteína (BOYCE et al., 2016) reflete as necessidades nutricionais do bebê prematuro, em que o acúmulo de proteína no feto é de aproximadamente 2 g/kg/dia de proteína corporal e os estoques de proteína diminuem rapidamente após o nascimento na ausência de suplementação. A introdução precoce de leite humano nesses casos pode prevenir o catabolismo proteico que começa logo após o nascimento (GATES et al., 2021).

#### 2.2.2.2 Gorduras

A gordura é a principal fonte de energia e contribui com quase 50% da densidade calórica total do leite humano, e também traz importantes funções biológicas (ERIKSEN et al., 2018). Se trata de um componente estrutural das membranas celulares, um transportador de vitaminas lipossolúveis e um precursor para a síntese de hormônios e eicosanóides (por exemplo, prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) (ZOU; PANDE; AKOH, 2016).

No leite humano, que é uma emulsão de água em óleo (como ocorre no leite de todos os mamíferos), as moléculas lipídicas são organizadas em uma estrutura emulsificada única, os glóbulos de gordura do leite (GGL), que são envoltos pelas MGGLs (DEMMELMAIR; KOLETZKO, 2018). Sabe-se que o tamanho dos GGLs é maior no colostro e no leite de transição em comparação com o leite maduro (MARTINI; SALARI; ALTOMONTE, 2013) e há muitos anos já foi evidenciado que o tamanho dos GGLs está relacionado ao teor lipídico, indicando que um aumento no teor de gordura do leite está associado a GGLs maiores, em vez de um aumento no número de GGLs de tamanho semelhante (MICHALSKI et al., 2005).

A MGGL por sua vez possui uma estrutura de três camadas e contém fosfolipídios, glicolipídios, proteínas (como transportadores de membrana, receptores e enzimas) e *rafts*

lipídicos ricos em colesterol e esfingomielina (DEMMELMAIR; KOLETZKO, 2018). Como relatado na revisão de Bourlieu e Michalski (2015), todas essas propriedades em conjunto podem proteger os bebês contra infecções e melhorar a digestão e a absorção de lipídios. Além disso, a estrutura protetora da MGGL também contribui para a alta estabilidade oxidativa do leite humano ordenhado.

Em relação ao impacto da gordura na saúde dos bebês, no estudo realizado por Prentice et al. foi observado que um maior teor de gordura no leite humano estava relacionado a um menor peso durante a infância, menor adiposidade e menor ganho de índice de massa corporal (IMC) entre os 3 e 12 meses de idade, e menor adiposidade e IMC aos 12 meses de idade. Não foram encontradas associações com o comprimento infantil (2016). Isso sugere que um elevado teor de gordura no leite humano pode reduzir a taxa de crescimento e, conseqüentemente, beneficiar a composição corporal posterior. Esses resultados estão alinhados com as descobertas de um estudo sobre dieta complementar, no qual a ingestão de gordura aos 2 anos de idade demonstrou ter um efeito protetor contra o desenvolvimento de sobrepeso/obesidade em adultos jovens (ROLLAND-CACHERA et al., 2013).

Estudos indicaram também uma possível associação entre o teor de gordura no leite humano e o IMC pré-gestacional. Observou-se que mulheres com sobrepeso e obesidade em regiões como Europa Oriental e China apresentaram maiores concentrações de gordura e energia por volume de leite humano ordenhado em comparação com mulheres com IMC pré-gestacional considerado normal (BURIANOVA et al., 2019; YANG et al., 2014).

No leite de mães pré-termo, o teor de gordura demonstra aumento com o tempo. Com base em dados agregados por Gates et al. de 19 relatórios disponíveis de teor de gordura no leite humano prematuro, o teor de gordura parece aumentar quase duas vezes nas primeiras duas semanas após o nascimento e é relativamente estável no leite humano prematuro maduro (2021). Essas mudanças no teor de gordura refletem o aumento da densidade calórica nas primeiras semanas de lactação do prematuro, que condizem com sua necessidade nutricional.

### 2.2.2.3 Carboidratos

Uma ampla variedade de carboidratos diferentes e complexos estão presentes no leite humano, sendo a lactose o mais abundante (aproximadamente 70-83% do total de carboidratos). A lactose está presente na maior concentração em humanos em comparação com qualquer outra espécie, correspondendo às altas demandas de energia do cérebro humano (ERIKSEN et al., 2018). Também estão presentes os oligossacarídeos, que representam uma parte importante dos carboidratos encontrados no leite materno, porém não são digeridos pelo bebê. Sua função consiste em alimentar a microbiota intestinal (BOYCE et al., 2016).

A porcentagem de lactose no leite humano já foi positivamente associada à mudança no peso infantil, adiposidade e IMC entre 3 e 12 meses de idade, e com adiposidade e IMC aos 12 meses de idade (PRENTICE et al., 2016). Quanto às suas funções, além do fornecimento de energia ao recém-nascido (CHETTA; SCHULZ; WAGNER, 2021), a lactose já demonstrou ter uma função adicional na imunidade inata conferida ao lactente, por meio da regulação positiva de peptídeos antimicrobianos gastrointestinais que podem levar à proteção do intestino neonatal contra patógenos e regulação da microbiota do bebê (CEDERLUND et al., 2013).

Em relação ao leite pré-termo, 10 artigos de uma revisão mostraram ampla variação no conteúdo de carboidratos no leite humano prematuro relatado nas coortes, que foram realizadas nos Estados Unidos, Quênia, Egito, Holanda, Dinamarca e Índia. No entanto, apesar da grande variação de cada coorte, o conteúdo de carboidratos parece permanecer relativamente estável desde o nascimento até 30 dias de vida (GATES et al., 2021).

### 2.2.2.4 Micronutrientes

Os micronutrientes presentes no leite materno incluem vitaminas como a A, C, K, B-6, B-12, coenzimas como a riboflavina e tiamina, e minerais como ferro, cálcio, fósforo, zinco e magnésio (DROR; ALLEN, 2018). Estudos acerca do papel desses micronutrientes e sua relação com o desenvolvimento infantil ainda são escassos na literatura.

Do que se tem reportado, sabe-se que as vitaminas presentes no leite desenvolvem importantes papéis em diversos sistemas. Cita-se a vitamina B-6 atuando como cofator para as mais de 100 enzimas que atuam no metabolismo de aminoácidos, glicólise e gliconeogênese (SWAMINATHAN; THOMAS; KURPAD, 2015), a vitamina B-12 como cofator para enzimas essenciais no metabolismo de folatos e síntese de DNA (DROR; ALLEN, 2008), a vitamina C atuando no aumento da produção de anticorpos e interferons (AHMED et al., 2004), a vitamina A sendo fundamental no crescimento e desenvolvimento corporal (DEBIER; LARONDELLE, 2005) e a vitamina D com um importante papel no desenvolvimento ósseo, imunológico e cerebral (DROR; ALLEN, 2010).

Um estudo de 2021 que avaliou o conteúdo de algumas vitaminas no leite de mães a termo e pré-termo demonstrou que, quando comparado à idade pós-menstrual equivalente (estágio de desenvolvimento infantil equivalente), o leite pré-termo foi significativamente maior em teor para vitaminas B1, B2, B3, B6 e B9, mas com menores níveis de vitaminas A, E, e carotenóides como b-caroteno, zeaxantina e licopeno (REDEUIL et al., 2021). Esses resultados sugerem que bebês prematuros alimentados em idade equivalente a termo podem receber quantidades menores desses micronutrientes do que RNs a termo alimentados, possivelmente ressaltando a importância de complementar ou reforçar sua ingestão nutricional com vitaminas dependendo do caso.

A deficiência de vitaminas no RNPT pode ter impacto em diversos sistemas e órgãos que ainda são imaturos. Pode haver fragilidade óssea, problemas de crescimento, atraso no desenvolvimento neurológico e problemas imunológicos (DROR; ALLEN, 2018), por isso, monitorar os níveis das vitaminas e suplementar quando identificada uma carência é importante.

Assim como as vitaminas, monitorar os níveis de minerais também é necessário, pois a deficiência também pode trazer impactos. Com o fósforo, por exemplo, o leite a termo se mostra mais denso em teor do que o leite prematuro (HSU et al., 2014). Relevante para bebês prematuros, a hipofosfatemia está ligada ao risco de sepse, ventilação mecânica prolongada e displasia broncopulmonar (MOLTU et al., 2013).

O cálcio é outro mineral que age como um micronutriente crítico para a saúde óssea e vias de sinalização celular. Para o bebê prematuro em desenvolvimento, promover a ingestão adequada de cálcio e a preservação dos níveis de cálcio melhora a mineralização

óssea e previne a osteopenia da prematuridade, aprimora o tônus vascular e a função cardíaca e sustenta a adaptação neural (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015). É importante ressaltar que as necessidades de cálcio de um bebê prematuro são muito maiores que um bebê a termo (enquanto um bebê nascido com 3,5kg necessita de 57mg/kg/d, um bebê que nasce com 1kg vai precisar de cerca de 200mg/kg/d) (KOLETZKO; POINDEXTER; UAUY, 2014). Apesar de haver algumas divergências na literatura, de modo geral não são encontradas diferenças significativas nas quantidades de cálcio entre leites de mães a termo e prematuros (GATES et al., 2021).

Ainda, como muitos outros nutrientes, o cobre é acumulado no terceiro trimestre da gravidez, tornando o bebê prematuro suscetível à sua deficiência. O cobre é um nutriente essencial e sua insuficiência resulta em anemia, neutropenia, trombocitopenia e osteoporose (CHOI et al., 2016). Gates e colaboradores identificaram cinco relatórios que avaliaram a concentração de cobre no leite humano de bebês pré-termo, e todos os estudos mostraram uma diminuição no teor de cobre ao longo do tempo, com o leite humano pré-termo imaturo apresentando uma concentração de cobre quase 50% maior do que o leite humano pré-termo maduro (2021).

#### 2.2.2.5 Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos do leite humano são componentes que variam em tamanho de 3 a 32 açúcares e possuem uma composição única em comparação com outros mamíferos. Embora não sejam nutrientes diretos para o bebê, esses componentes representam uma proporção significativa do leite humano, comparável à quantidade de proteínas totais. Essas estruturas são sintetizadas por glicosiltransferases, enzimas responsáveis também pela síntese de estruturas semelhantes em outras secreções humanas e nas superfícies mucosas (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015).

Os oligossacarídeos atuam como agentes prebióticos, estimulando seletivamente o crescimento de organismos benéficos (probióticos). Além disso, os oligossacarídeos e seus conjugados proteicos são reconhecidos como inibidores de ligação a patógenos, atuando como receptores solúveis "atraentes" para patógenos que possuem afinidade com os receptores de oligossacarídeos expressos na superfície intestinal do bebê (BALLARD;

MORROW, 2013). Também, podem modular o epitélio e as respostas das células imunes, reduzir a infiltração e ativação excessiva de leucócitos na mucosa, diminuir o risco de NEC e fornecer ao bebê ácido siálico como um nutriente potencialmente essencial para o desenvolvimento cerebral e a cognição (BODE, 2012).

De forma geral, esses oligossacarídeos diminuem drasticamente sua abundância no leite nos primeiros três meses após o parto (THURL et al., 2010). Em relação às diferenças do leite a termo para o leite prematuro, a revisão sistemática de Gidrewicz & Fenton mostrou que, predominantemente, os níveis de oligossacarídeos nos dois tipos de leite se mostraram muito similares, sendo observada somente diferença entre os dias 4 e 7 após o parto, em que a abundância de oligossacarídeos no leite pré-termo foi 12% maior que no a termo (2014).

#### 2.2.2.6 Hormônios e citocinas

O leite humano conta com importantes hormônios como a eritropoietina, que é o principal hormônio envolvido na produção de células da linhagem vermelha do sangue, a adiponectina, que é um hormônio multifuncional que ativamente regula o metabolismo e consegue ultrapassar a barreira intestinal (BALLARD; MORROW, 2013), e a leptina, que participa ativamente da regulação do metabolismo energético (BADILLO-SUÁREZ; RODRÍGUEZ-CRUZ; NIEVES-MORALES, 2017). Hormônios reguladores de apetite também estão no leite materno e parecem ser influenciados por fatores maternos e desempenhar um papel no crescimento infantil (LARSON-MEYER et al., 2021).

Já as citocinas são polipeptídeos pluripotentes que atuam por meio de ligação a receptores celulares específicos, operando redes e orquestrando o desenvolvimento e as funções do sistema imunológico (LIU et al., 2021). Esses componentes desempenham um papel enorme em muitos processos biológicos. Sua produção, liberação e interações estão sujeitas a um mecanismo muito complexo, uma vez que são produzidas por todos os tipos de células, funcionam de maneira muito diferente e são caracterizadas por sinergismo em ação, antagonismo e atividade de agregação (KIELBASA; GADZALA-KOPCIUCH; BUSZEWSKI, 2021). Também, servem de biomarcadores para diversas doenças (LIU et al., 2021).

A relação do leite humano com as citocinas inicia na mama, uma vez que o desenvolvimento da glândula mamária é dependente da interação de hormônios estroídais e citocinas (BRENMOEHL et al., 2018). Inúmeras citocinas já foram identificadas no leite, e são relacionadas à habilidade do mesmo de prover proteção passiva e modular ativamente o desenvolvimento da mucosa e resposta imune do lactente. Dentre suas funções biológicas, sabe-se que certas citocinas (como IL-6 e TNF- $\alpha$ ) foram implicadas na regulação do desenvolvimento e das funções da glândula mamária, e outras, como a IL-1 e IFN- $\gamma$  provavelmente podem influenciar a produção de agentes de defesa ou outras citocinas (GAROFALO, 2010).

Das inúmeras citocinas presentes no leite materno vale evidenciar a presença da TGF- $\beta$ . A TGF- $\beta$  do leite materno modula a expressão da molécula de classe II nas células epiteliais intestinais, o que pode ter relevância para o recém-nascido lidar com a presença de antígenos pós-parto. Os RNPTs, em particular, sofrem de aumento da permeabilidade intestinal, que pode ser bloqueado pelo TGF- $\beta$ . Sabe-se ainda que bebês com NEC têm níveis reduzidos de expressão de TGF- $\beta$  na mucosa, ainda mais baixos do que no intestino prematuro ou fetal, e redução da bioatividade de TGF- $\beta$ . Sendo assim, a alimentação com leite materno diminui a gravidade da NEC em bebês prematuros, que se distingue pelo peso intestinal elevado, proporção da mucosa e altura das vilosidades (BRENMOEHL et al., 2018)

### **2.2.3 Microbiota do leite materno**

Por muito tempo, a análise microbiológica do leite materno só era realizada em casos de infecção, e por isso, a presença de microrganismos não-patogênicos no leite ainda era desconhecida, e pensava-se que na ausência de infecção o leite materno era um fluido estéril. Autores comentam que o dogma de longa data da esterilidade do leite humano foi tão bem estabelecido que o grande Projeto do Microbioma Humano, que visava descrever as características do microbioma de vários locais do corpo, não incluiu o leite ou a glândula mamária entre os locais de interesse (BEGHETTI et al., 2019). Nas últimas décadas, entretanto, o uso de tecnologias mais sofisticadas por meio da amplificação do gene que codifica o RNA ribossômico 16S bacteriano deu início a um novo conceito de “microbioma

do leite”, um ecossistema complexo com uma diversidade maior do que o anteriormente previsto.

As primeiras caracterizações de leite materno em mulheres saudáveis foram realizadas com base em técnicas que dependiam de cultura, cuja limitação era permitir o isolamento de apenas um número restrito de gêneros bacterianos (MARTÍN et al., 2003). Estudos conduzidos utilizando métodos dependentes de cultura revelaram que tanto anaeróbios facultativos quanto espécies predominantemente aeróbias foram os principais colonizadores do ecossistema do leite humano. Entre os grupos bacterianos mais frequentemente isolados e abundantes estavam *Streptococcus* e *Staphylococcus*, seguidos de espécies derivadas da pele ou contaminantes ambientais, como *Propionibacterium* e gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Ainda, também foram encontradas bactérias probióticas intestinais bem conhecidas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (JOST et al., 2013).

O desenvolvimento de técnicas independentes de cultura, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e, posteriormente, o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), permitiu a caracterização detalhada da composição e diversidade do leite humano, e documentou um grande número de bactérias no leite materno e uma alta variabilidade na composição. Uma revisão sistemática sobre o repertório microbiano do leite materno demonstrou a presença de cerca de 820 diferentes espécies bacterianas, pertencentes principalmente aos filos *Proteobacteria* e *Firmicutes*. Foi demonstrado que a microbiota da mama e do leite humano compartilha 49% das espécies de seu repertório com o intestino, 30% com a vagina, 28% com o trato urinário, 28% com o trato respiratório e 21% com a cavidade oral. Além disso, é interessante mencionar que um total de 303 espécies bacterianas foram encontrados apenas na microbiota da mama e do leite humano e não em outros repertórios microbianos humanos, sugerindo uma microbiota mamária específica (TOGO et al., 2019). Esse achado vai ao encontro do que foi mostrado por LaTuga et al., que menciona ainda os filos *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* e os respectivos gêneros mais abundantes (2014), como demonstrado no Quadro 1.



**Quadro 1** - Bactérias mais comumente encontradas no leite materno humano.

Filo	Gênero
Firmicutes	<i>Staphylococcus, Streptococcus, Veillonella, Gemella, Enterococcus, Clostridia, Bifidobacterium, Lactobacillus</i>
Actinobacteria	<i>Propionibacterium, Actinomyces, Corynebacterium</i>
Proteobacteria	<i>Pseudomonas, Sphingomonas, Serratia, Escherichia, Enterobacter, Ralstonia, Bradyrhizobium</i>
Bacteroidetes	<i>Prevotella</i>

Fonte: Adaptado de LaTuga, Stuebe & Seed, 2014.

Um dos primeiros estudos a caracterizar a diversidade bacteriana do leite com novas tecnologias foi o de Hunt e colaboradores, que em uma análise da associação da comunidade microbiana em 3 amostras diferentes de 16 mulheres americanas sugeriu que um microbioma “central” de leite estava presente. Das centenas de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) detectadas no leite de cada mulher, apenas 9 estavam presentes em todas as amostras de cada mulher. Surpreendentemente, essas 9 OTUs “centrais” representaram cerca de metade da comunidade microbiana observada, embora a abundância relativa variasse muito entre os indivíduos. Essas 9 OTUs foram os gêneros bacterianos *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* e *Bradyrhizobium* (HUNT et al., 2011).

Outro estudo também reportou uma microbiota “central”, constituída pelos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, e *Propionibacterium*, identificados em leites de mulheres espanholas (JIMÉNEZ et al., 2015). Desses dois estudos que definiram uma microbiota “central”, somente os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Propionibacterium* foram reportados como gêneros predominantes em ambos, o que sugere que esse conceito pode depender muito da localização geográfica, dentre muitos outros fatores que influenciam na composição microbiana do leite materno, como idade gestacional, sexo biológico, paridade, antimicrobianos intraparto, estágio da lactação e dieta (ZIMMERMANN; CURTIS, 2020).

O tipo de coleta utilizada (ordenha manual ou bomba de leite) (RODRÍGUEZ-CRUZ et al., 2020), modo de parto (CABRERA-RUBIO et al., 2016; URBANIAK et al., 2016) e aspectos analíticos como armazenamento, temperatura e kit de extração de DNA utilizado (LYONS et al., 2021) também demonstram influenciar na análise da microbiota do leite materno. Além disso, evidenciam a grande variabilidade individual de abundância de diferentes gêneros bacterianos entre as mães, conferindo ao leite materno alto grau de exclusividade da mãe para seu filho também na microbiota.

Um curioso estudo foi além dos fatores de influência da composição microbiana do leite mais frequentemente estudados, como parâmetros clínicos e demográficos, e avaliou as associações entre o ambiente social e o leite materno. Eles identificaram a amplitude das redes sociais e de cuidados dos bebês e a frequência de contato que esses bebês tinham com os cuidadores, estudando um grupo em que os bebês raramente tinham contato com outras pessoas além da mãe, em uma comunidade de mães coletoras e horticultoras; e um outro grupo em que os bebês cujas famílias residem em complexos familiares estendidos, permitindo que a díade mãe-bebê tenha contato frequente com outras pessoas. A análise do leite materno dessas mães demonstrou que a diversidade e a composição da comunidade microbiana do leite materno estavam relacionadas ao tamanho da rede social da díade mãe-bebê e à frequência dos cuidados que os bebês recebem, mostrando a influência até mesmo social na microbiota do leite (MEEHAN et al., 2018).

Uma explicação para esse intrigante achado de que a quantidade de pessoas com que o bebê tem contato pode influenciar na composição da microbiota do leite da sua mãe pode ser encontrada no que diz a literatura sobre a origem das bactérias do leite. Apesar de ainda pouco compreendida, atualmente os estudos apresentam duas vias principais para tentar explicar a origem da microbiota do leite humano: o chamado fluxo retrógrado e a via enteromamária.

O fluxo retrógrado consiste na transferência de bactérias do bebê para a mãe, que ocorre durante a amamentação com a sucção do bebê na mama (Figura 4a). Foi identificado que quando o bebê suga o leite, não apenas o leite se desloca para sua cavidade oral, mas também todo o conteúdo que passa por dentro da cavidade oral do bebê retorna para a mama (KORDY et al., 2020), o que esclarece que os microrganismos aos quais o bebê é exposto em diferentes ambientes podem migrar para as glândulas mamárias por meio da cavidade

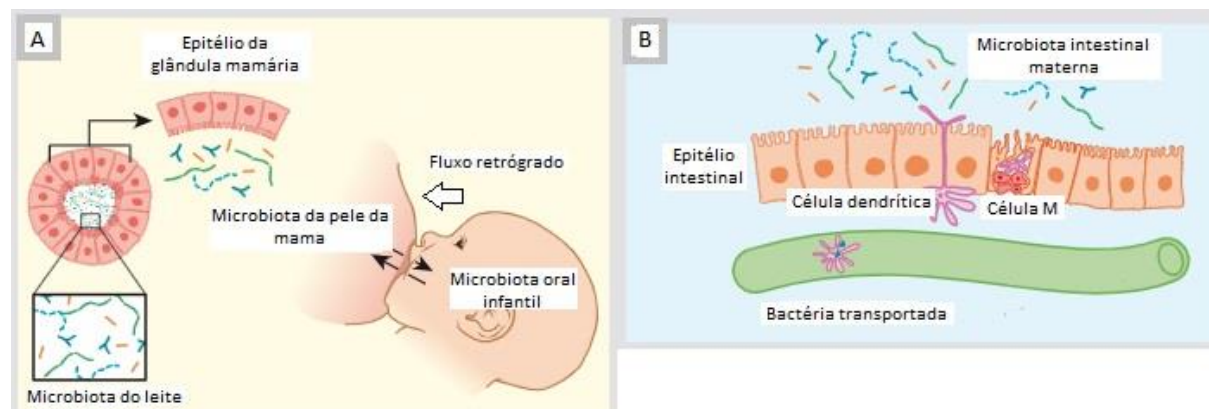
oral do bebê, e assim, influenciam na composição do leite. Isso poderia explicar como bactérias comumente encontradas na cavidade oral infantil, como as dos gêneros *Veillonella*, *Leptotrichia* e *Prevotella*, ou bactérias comumente encontradas na vagina, como *Lactobacillus*, são algumas vezes encontradas no leite humano. As bactérias vaginais podem ser adquiridas pelo bebê por meio de parto vaginal e depois transferidas para o leite humano por fluxo retrógrado (LOPEZ LEYVA; BRERETON; KOSKI, 2021). Já foi demonstrado também que *Streptococcus* é um gênero bacteriano predominante no microbioma salivar (CEPHAS et al., 2011), e está presente também no leite humano (HUNT et al., 2011). Inicialmente, essas observações sugerem que somente a boca do bebê pode contribuir com bactérias para a glândula mamária, no entanto, também é possível inferir que as bactérias presentes no leite humano desempenhem um papel no estabelecimento do microbioma salivar do bebê.

Além disso, há a crença de que os tipos bacterianos comumente encontrados no leite humano têm origem na pele. Estudos mostram que mesmo após a limpeza da área periareolar, amostras de leite materno contêm microbiota associada à pele (LATUGA; STUEBE; SEED, 2014). Na prática, dificilmente as mães limpam o seio antes de amamentar, e além disso, durante a amamentação, o mamilo e a região areolar circundante estão na boca do bebê, introduzindo bactérias associadas à pele materna na cavidade oral do bebê no momento da ejeção do leite, e retornando via fluxo retrógrado. Bactérias como *Staphylococcus*, *Propionibacterium* e *Corynebacterium*, que são predominantes na pele adulta, são identificadas no leite humano (GOMEZ-GALLEGO et al., 2016).

Outro caminho que pode originar as bactérias do leite materno é a via enteromamária, que seria do intestino da mãe até as glândulas mamárias (Figura 4b). Ainda não está claro como exatamente as bactérias conseguem atravessar o epitélio intestinal, escapar do sistema imunológico e alcançar a glândula mamária, no entanto, apresenta-se a hipótese de que, possivelmente, células inatas residentes no tecido intestinal, como células dendríticas ou macrófagos, desempenham um papel significativo nesse processo de migração, agindo como transportadoras de bactérias do intestino materno para a glândula mamária. Foi demonstrado que as células dendríticas podem abrir as junções apertadas entre as células epiteliais intestinais e penetrar no epitélio intestinal com seus dendritos,

permitindo que elas colem amostras de bactérias comensais diretamente do lúmen intestinal, sem comprometer a integridade da barreira epitelial (JEURINK et al., 2013).

**Figura 4** – Vias potenciais que explicariam a origem das bactérias do leite humano.



Legenda: A) Através do fluxo retrógrado, a microbiota da pele da mãe e a microbiota oral do bebê podem contribuir para o estabelecimento do microbioma do leite humano. B) Bactérias do trato intestinal materno podem ser absorvidas por diferentes células imunes. A migração maciça de células imunes para as glândulas mamárias poderia fornecer outra rota possível para alterar o microbioma do leite humano.

Fonte: Adaptado de Jeurink et al. (2013).

Quanto à quantidade de bactérias, sabe-se que a concentração bacteriana no leite humano de mulheres saudáveis geralmente fica em torno de um nível indetectável até  $10^3$  UFC/mL, quando as amostras são coletadas de forma higiênica por expressão manual ou usando dispositivos de bomba estéreis de uso único (RODRÍGUEZ-CRUZ et al., 2020). A concentração pode ser muito maior (até  $10^6$  UFC/mL) em mulheres com mastite, por exemplo (JIMÉNEZ et al., 2015).

Em relação ao leite de mães de bebês prematuros, estudos reportam a predominância do gênero *Staphylococcus* (ASBURY et al., 2020, BIAGI et al., 2018, CACHO et al., 2017, URBANIAK et al., 2016), bem como uma diminuição na abundância de *Streptococcus* quando comparado ao leite de mães à termo (BIAGI et al., 2018). Exceto essas observações, de maneira geral o leite prematuro se assemelha no perfil da microbiota quando comparado a estudos que avaliaram o leite à termo, embora sejam escassos os estudos que fizeram essa comparação até hoje.

É evidente a importância da microbiota do leite materno para os bebês amamentados. Os micróbios no leite da mãe colonizam a cavidade oral e o intestino do bebê,

fornecendo bactérias colonizadoras pioneiras e enriquecimento de bactérias associadas a efeitos benéficos e contribuindo para o estabelecimento do microbioma intestinal e oral do bebê (BEGHETTI et al., 2019), e esse efeito é muito maior quando se trata do leite da mãe para o próprio filho. As comunidades microbianas intestinais infantis já se mostraram mais relacionadas ao leite e à pele da mãe do bebê em comparação com uma mãe aleatória (PANNARAJ et al., 2017).

Estudos documentaram que o leite materno e as fezes de bebês compartilham cepas microbianas específicas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* (ASNICAR et al., 2017, FERRETI et al., 2018). O maior potencial de transferência vertical mãe-neonato via leite materno foi observado para o gênero *Bifidobacterium* (JOST et al., 2014), que também é um dos principais probióticos benéficos para bebês de idade gestacional extremamente baixa (FORTMANN et al., 2020). Também foi demonstrado que a microbiota intestinal de bebês amamentados difere de indivíduos não amamentados e que as primeiras impressões digitais podem persistir na idade adulta. A microbiota intestinal possui funções essenciais na manutenção da homeostase e no desenvolvimento do sistema imunológico e metabólico durante os estágios iniciais da vida. A interação entre o hospedeiro e a microbiota promove a função de barreira intestinal, a integridade da mucosa e o equilíbrio da resposta imunológica sistêmica. Além disso, os padrões de colonização inicial afetam a função metabólica do hospedeiro, incluindo deposição de gordura, níveis circulantes de leptina e resistência à insulina no período neonatal (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2019; MILANI et al., 2017; TANAKA; NAKAMAYA, 2017).

Ainda sobre o impacto na microbiota intestinal infantil, bebês prematuros que foram alimentados com leite materno já demonstraram ter uma maior diversidade bacteriana inicial e uma aquisição mais gradual de diversidade em comparação com bebês que foram alimentados com fórmula infantil, e além disso, o microbioma de bebês alimentados com leite materno foi mais semelhante, independentemente do peso ao nascer, em contraste com o microbioma de bebês alimentados com fórmula infantil, que se agruparam de maneira diferente com base no peso ao nascer. Com isso, a amamentação com leite materno parece atenuar a influência do peso ao nascer, indicando um efeito protetor contra a imaturidade intestinal em bebês prematuros. No mesmo estudo, a suplementação com leite humano doado pasteurizado foi parcialmente bem-sucedida na promoção de um microbioma mais

semelhante aos bebês alimentados com leite materno do que os alimentados com fórmula (GREGORY et al., 2016)

Bactérias do leite humano também podem ser relevantes para a saúde da mama. O ecossistema da glândula mamária lactante é hospitaleiro para muitos microrganismos, incluindo grupos de bactérias que têm o potencial de causar mastite. Com o distúrbio desse estado de equilíbrio, pode ocorrer infecção e, de fato, alguns estudos relataram que a mastite é um processo caracterizado por uma disbiose bacteriana mamária, incluindo uma menor diversidade microbiana, maior abundância de patógenos oportunistas e depleção de anaeróbios obrigatórios comensais (FERNÁNDEZ; RODRÍGUEZ, 2020). Estratégias para o manejo da mastite baseadas em probióticos do leite humano, como alternativa ou complemento à antibioticoterapia, está sendo amplamente proposto. Até o momento, a administração oral de algumas cepas de *Lactobacillus* isoladas do leite humano provou ser uma excelente abordagem para o tratamento e prevenção da mastite lactacional (BOND; MORRIS; NASSAR, 2017; FERNÁNDEZ et al., 2014).

#### **2.2.4 Bancos de Leite Humano e o leite pasteurizado**

Quando não há leite da mãe suficiente disponível para alimentar os RNs, a melhor alternativa se torna o leite de mães doadoras, por meio dos BLHs. Os BLHs são responsáveis por coletar, triar, armazenar, processar e distribuir o leite humano (MORO et al., 2019), e são um serviço especializado vinculados a um hospital de atenção materna e/ou infantil, como é o caso do BLH participante desse estudo, que é vinculado à Maternidade Carmela Dutra de Florianópolis.

O primeiro BLH que se tem conhecimento foi estabelecido em 1909 em Viena, Áustria. A prática da amamentação cruzada foi amplamente adotada na Europa durante o século XIX, com o objetivo de fornecer leite humano para bebês cujas mães eram incapazes de amamentar. No entanto, as doadoras de leite nem sempre estavam disponíveis ou, quando estavam, muitas vezes levavam estilos de vida pouco saudáveis ou carregavam infecções que poderiam ser transmitidas através do leite. Uma alternativa à amamentação cruzada foi encontrada nos BLHs. Pouco depois de Viena, um BLH foi aberto nos Estados Unidos no

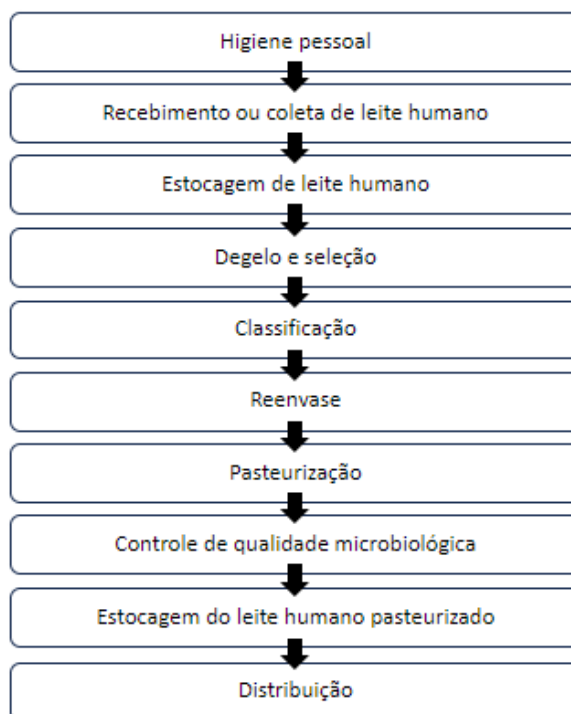
*Boston Floating Hospital*, e muitos outros o seguiram sendo implantados em todo o mundo (HAIDEN; ZIEGLER, 2017).

No Brasil, o primeiro BLH foi implantado em outubro de 1943, no então Instituto Nacional de Puericultura, atualmente Instituto Fernandes Figueira (IFF) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (ALMEIDA, 1999). Hoje, o país possui a maior e mais complexa rede de BLHs do mundo, com 222 unidades presentes em todos os estados brasileiros, mais 217 postos de coleta. Em 2001, a OMS reconheceu a Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (rBLH-BR) como uma das ações que mais contribuíram para a redução da mortalidade infantil no mundo, na década de 1990. De 1990 a 2012, a taxa de mortalidade infantil no Brasil reduziu 70,5% (BRASIL, 2023).

Mais do que um serviço técnico, os BLHs são um serviço de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno, como programas de incentivo e sensibilização sobre a doação de leite humano (BRASIL, 2020). Dentre as atividades realizadas, estão:

- I) Assistência à gestante, puérpera, nutriz e lactente na prática do aleitamento;
- II) Preparo da gestante e elaboração de medidas de prevenção de doenças e outros fatores que impeçam a amamentação ou a doação de leite humano ordenhado;
- III) Orientação à puérpera, à nutriz e ao lactente sobre autocuidado com a mama puerperal, pega, posição e sucção; ordenha, coleta e armazenamento do leite ordenhado no domicílio;
- IV) Execução das operações de controle clínico da doadora;
- V) Coleta, armazenamento e repasse do leite humano ordenhado para o BLH ao qual o posto está vinculado;
- VI) Registro das etapas e os dados do processo, garantindo a rastreabilidade do produto;
- VII) Administração de um sistema de informação que assegure os registros – relacionados às doadoras e aos produtos – disponíveis às autoridades competentes, guardando sigilo e privacidade;
- VIII) Estabelecimento de ações que permitam a rastreabilidade do leite humano ordenhado (BRASIL, 2020).

Em relação aos procedimentos com o leite, todos os BLHs devem observar o seguinte fluxo de trabalho:

**Figura 5** – Fluxo de trabalho dos BLHs no Brasil.

Legenda: BLH - Banco de Leite Humano.

Fonte: Adaptado do manual da ANVISA (BRASIL, 2020).

A qualidade microbiológica do leite humano doado é uma das principais preocupações na maioria dos BLHs, pois será administrado principalmente a bebês prematuros ou doentes, que são especialmente suscetíveis a infecções (ARSLANOGLU et al., 2023). Por isso, um dos procedimentos realizados nos BLHs é a pasteurização, que é um tratamento térmico no leite que tem por objetivo inativar possíveis patógenos como bactérias, fungos e vírus, e diminuir a carga bacteriana do leite. O procedimento padrão de pasteurização é também conhecido como HoP, ou *Holder Pasteurization*, que consiste em um aquecimento a 62,5°C por 30 minutos (ESCUDER-VIECO et al., 2018). Acontece que esse procedimento também afeta compostos bioativos e bactérias benéficas para a saúde intestinal do bebê.

A pasteurização HoP já demonstrou reduzir bioativos como a lactoferrina, frações de imunoglobulina e a atividade da glutatona peroxidase no leite humano (GUERRA et al., 2018). Além de desempenhar um papel crucial como antioxidante celular na proteção do



organismo contra danos oxidativos, a glutathione peroxidase reduz o potencial redox do leite, favorecendo o crescimento de microrganismos anaeróbicos, como a bactéria probiótica *Bifidobacterium* (ŽIVKOVIĆ et al., 2015). Também, levando em consideração a importância da lactoferrina para a saúde infantil, observou-se que uma parte significativa de sua função foi neutralizada durante o processo de pasteurização. Peila et al., em uma revisão sistemática, também observaram os efeitos da pasteurização em compostos bioativos e nutrientes do leite, com a diminuição de IgM, lisozimas, lactoferrina, vitaminas e hormônios como a insulina e eritropoietina após o HoP (2016).

Em relação aos efeitos da HoP na microbiota, um estudo demonstrou que o processo contribuiu para o aumento da diversidade bacteriana nas amostras de leite, sendo que certas bactérias termorresistentes dos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* se tornaram mais abundantes. Neste estudo, por meio da análise de rastreamento de origem, foi observado que, no máximo, 1,0% das bactérias presentes no leite materno cru podem ter origem externa, o que indica a segurança do processo de tratamento das amostras (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2022).

O aumento da diversidade bacteriana no leite pasteurizado também foi observado por Beghetti et al., que além desse fator, observaram que, composicionalmente, a microbiota do leite de mães de bebês prematuros têm uma proporção significativamente maior de *Staphylococcus* do que o leite de doadora pasteurizado, com *Streptococcus* tendendo a ser e *Pseudomonas* sendo significativamente superrepresentada em amostras de leite pasteurizado em relação ao leite da mãe. Além disso, a pasteurização afetou o perfil da microbiota do leite como um todo, com diferenças de composição após a pasteurização (BEGHETTI et al., 2022).

Alternativas à pasteurização pelo método HoP vêm sendo estudadas a fim de buscar uma técnica que diminua os danos aos compostos bioativos do leite. O sistema *High-Temperature Short-Time* (HTST) vem sendo proposto, e foi testado com leites de mães doadoras. Se trata de uma técnica de aquecimento a 72°C por 10 segundos e tem operação precisa e simples, permitindo a pasteurização de quantidades variáveis de leite doado e reduz o tempo de processamento e a mão de obra. Esse processamento já demonstrou destruir eficientemente todas as formas vegetativas de microrganismos presentes inicialmente no leite cru doado, embora *Bacillus* spp. tenha sobrevivido. Para testar os efeitos da técnica e

compará-la ao HoP, os pesquisadores utilizaram a reação de Maillard. A reação de Maillard é uma das principais reações responsáveis pela deterioração de proteínas durante o processamento e armazenamento de alimentos. Essa reação pode resultar em mudanças nutricionais, como diminuição da qualidade nutricional devido à destruição de aminoácidos essenciais, redução da digestibilidade da proteína e disponibilidade de aminoácidos. A furosina é utilizada como um marcador dos estágios iniciais da reação de Maillard, portanto, foi utilizada como marcador no experimento. As concentrações de furosina no leite doado tratado com HTST foram menores do que após a pasteurização HoP (ESCUDEIR-VIECO et al., 2018) o que pode indicar que esse outro tipo de processamento de leite doado pode atingir os objetivos de segurança microbiológica estabelecidos no banco de leite, com menor impacto em relação aos danos causados pelo calor.

Demazeau e colaboradores também testaram outra técnica de tratamento do leite em comparação ao HoP, um processo de alta pressão hidrostática desenvolvido na França. O uso do processo de alta pressão hidrostática levou à descontaminação microbiana tanto para microrganismos vegetativos quanto para formadores de esporos como *Bacillus*, e a bioatividade de componentes principais do leite humano foi melhor preservada, como atividades de lipase,  $\alpha$ -lactalbumina, caseína, lisozima, lactoferrina e IgA, quando comparado ao processamento com HoP (2018).

Essas novas alternativas são propostas interessantes para atenuar os danos da pasteurização HoP nos compostos bioativos do leite, mas precisam assegurar a mesma garantia de segurança microbiológica que o HoP oferece, sendo ainda amplamente utilizado em redes de BLHs.

## **2 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS**

### **2.3 OBJETIVO GERAL**

Determinar as diferenças de composição e diversidade da microbiota do leite de doadoras pasteurizado suplementado com o leite da mãe de recém-nascidos com menos de 32 semanas de idade gestacional.

### **2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar se há diferenças significativas nos índices de diversidade e composição da microbiota entre as amostras de leite de doadora pasteurizado, leite da mãe e leite suplementado.
- Relacionar os resultados da metagenômica do leite das mães de RNPTs com dados clínicos.

### 3 METODOLOGIA

O presente projeto faz parte da pesquisa intitulada “Causas e efeitos de microbiotas da mãe no nascimento e sobrevida de recém-nascidos pré-termos: estratégias de promoção de saúde materno-infantil”, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos R. Zárate-Bladés e pela Prof. Dra. Maria Marlene de Souza Pires. Essa pesquisa incluiu binômios mãe-RNPTs menores de 32 semanas, nascidos na Maternidade Carmela Dutra e internados na UTI-neonatal no período de fevereiro de 2021 a março de 2023. A maternidade Carmela Dutra é a referência do estado de Santa Catarina para o binômio mãe/neonato de alto risco, e atende cerca de 400 nascimentos ao mês com uma média de 80 internações de prematuros abaixo de 32 semanas ao ano pelo Sistema Único de Saúde. O número de binômios planejado, que está compondo o estudo principal, divide-se em dois grupos: 40 binômios mãe-RNPT para o grupo de bebês que recebeu o leite personalizado (leite pasteurizado inoculado com o leite da própria mãe do RN) e 40 binômios mãe-RNPT para o grupo controle, de bebês que receberam o leite de doadora pasteurizado como feito rotineiramente. Foi realizada também análise da microbiota fecal dos bebês e dos dados clínicos.

O presente trabalho de mestrado é focado na análise da microbiota do leite materno, portanto, foram estudados os binômios cujos RNs receberam o leite inoculado. Foi realizada análise do microbioma de três grupos de leite, referentes a 19 das 40 mães incluídas no estudo geral. Os grupos foram definidos como leite da mãe do RNPT (LM), leite de doadora pasteurizado (LP) e leite inoculado (LI); coletados no 10º dia após o nascimento do bebê.

#### 3.1 COLETA DE AMOSTRAS

As mães que aceitaram participar do estudo, tendo compreendido e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1), foram levadas ao BLH da maternidade no 10º dia após o nascimento do bebê, para iniciar a ordenha de colostro e posteriormente de leite. O leite foi retirado por meio de bombas de extração de leite elétricas (Matern Milk™) sob supervisão da enfermeira responsável pela unidade. Foram seguidas as normas de higiene já estabelecidas pela maternidade. Após a coleta do leite, o mesmo foi etiquetado e colocado sob refrigeração. O processo de inoculação do LP com o LM ocorreu

da seguinte forma: foi coletado LM e misturado com LP em uma proporção de 10% do LM e 90% do LP (CACHO et al., 2017). Essa mistura foi colocada em banho-maria a 37°C por um período de 4h, no próprio lactário da maternidade. Em seguida, guardado em recipiente em geladeira.

Amostras de leite de mães à termo (de idade gestacional acima de 37 semanas) foram coletadas para cultura microbiológica, para fins de validação do método. Essas coletas foram feitas sem apuração de dados clínicos e/ou demográficos.

Os procedimentos de cuidados e manejos dos RNs não foram modificados por causa do presente protocolo de pesquisa. Dessa forma, os pacientes não receberam nenhum tipo de intervenção ou coleta de amostras que não estivessem dentro dos procedimentos indicados para cada caso e rotineiramente realizados na Maternidade Carmela Dutra. Assim, no caso da adição (em 10%) de LM ao LP, foi realizada quando a mãe produziu pelo menos 10% do volume total de leite prescrito para seu próprio filho.

### 3.2 ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Após a coleta, o transporte das amostras foi realizado dentro de um período máximo de 24h desde a coleta, em caixas e sacolas térmicas, até o Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MiMA) da UFSC para alíquotagem. Cada um dos três tipos de leite foi dividido em quatro alíquotas: duas de 1mL com leite puro, para extração e sequenciamento, e outras duas para estudos posteriores de metaboloma, com 500uL de leite e 500uL de metanol. As alíquotas prontas foram armazenadas em freezer -80 °C até serem transportadas, em gelo seco, à empresa GoGenetic (Curitiba-PR), que realizou a extração e o sequenciamento das amostras.

Para este trabalho, somente foi possível realizar o sequenciamento de 56 amostras de leite (19 amostras LM, 19 amostras LI e 18 amostras LP).

### 3.3 COLETA, REGISTRO E ANÁLISE DE DADOS CLÍNICOS

O recrutamento e acompanhamento clínico dos binômios do projeto foi realizada pela neonatologista Thaise Cristina Brancher Soncini, da Maternidade Carmela Dutra, como parte do seu doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM - UFSC).

Foram coletados dados clínicos referentes às 19 mães de bebês prematuros estudadas, contendo as seguintes informações: nome, idade, escolaridade, estado civil, raça, gestações prévias, abortos prévios, número de consultas pré-natais, número de fetos, infecção congênita (qual), presença de outras patologias (quais), uso de medicamentos (quais), ocorrência de diabetes mellitus gestacional, hipertensão arterial sistêmica, ocorrência de ruptura prematura de membrana, ocorrência de infecção no período perinatal (qual, se identificada), uso de antimicrobianos no período perinatal (qual), tipo de parto e idade gestacional (em dias). Os dados foram retirados dos prontuários médicos de cada paciente e utilizados para análises estatísticas, correlacionados com os dados do sequenciamento.

### 3.4 CULTURA MICROBIOLÓGICA

Para fins de validação do método, foi realizada cultura microbiológica de amostras de leite de doadora pasteurizado, leite da mãe cru e leite inoculado coletados na Maternidade, de mães à termo (>38 semanas de idade gestacional). Para a realização dos testes, 100 uL de leite foram diluídos em 900 uL de solução salina 0,9% (JOISHY; DEHINGIA; KHAN, 2019). Foram realizadas diluições decimais sucessivas seriadas ( $10^{-1}$  até  $10^{-3}$ ), que foram inoculadas por espalhamento em superfície (100uL) com alça de Drigalski, em triplicata.

Baseado nos grupos mais comuns de bactérias cultivadas a partir de leite humano e nos experimentos previamente descritos por Cacho e colaboradores (2017), foram utilizados os seguintes meios: ágar manitol salgado (MSA) para *Staphylococcus* spp. e o meio seletivo ágar Man, Rogosa e Sharp (MRS) para bactérias ácido-láticas (BAL).

As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48-72h, sendo que as placas de ágar MRS foram incubadas em jarra com 5 a 7% de  $\text{CO}_2$ . Após observação do crescimento, foi feita a contagem das colônias para determinação da quantidade de UFC por mL.

As características morfológicas dos gêneros de interesse foram confirmadas por coloração de Gram das colônias isoladas.

### 3.5 EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para extração de DNA metagenômico, 300uL foram centrifugados por 15 segundos a 1000rpm para sedimentação de células e particulados, e 250uL do sobrenadante foram utilizados para extração de DNA em extrator Extracta Kit (Loccus). Os DNAs foram quantificados em Nanodrop (Thermo). A região V3 e V4 do RNA ribossomal 16S foi amplificada utilizando 20 ng de DNA, e *primers* (iniciadores) 357F/805R em sistema GoTaqG2 (Promega), de acordo com protocolo validado pela Illumina.

*Primers* utilizados na amplificação:

16S\_357F

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S\_805R

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC

Os amplicons com barcodes foram quantificados em fluorímetro Quantus DNA (Promega), e sequenciados na plataforma MiSeq (Illumina Inc.) com MiSeq Reagent 500V2, em *pair-end* 250bp. As sequências produzidas foram filtradas para adaptadores Illumina e demultiplexadas com ferramenta bcl2fastq (Illumina Inc.).

### 3.6 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

A análise das sequências geradas foi realizada por protocolos validados para análise da composição microbiana de amostras geradas por *metabarcoding*. Inicialmente, foi realizada a análise da qualidade das sequências com o programa FastQC (ANDREWS, 2010). Em seguida, os dados brutos passaram por corte de qualidade com o programa Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014), incluindo a remoção dos adaptadores.

Na etapa seguinte foi utilizada a plataforma QIIME 2<sup>TM</sup> (BOLYEN et al., 2019), em que as sequências trimadas passaram por mais uma filtragem, remoção de ruídos do sequenciamento, alinhamento e junção de dados das leituras R1 e R2, e remoção de sequências quiméricas usando os plug-ins Cutadapt e DADA2 (CALLAHAN et al., 2016). Todas as Variantes de Sequência de Amplicon (ASVs) de baixa frequência foram filtradas e removidas, o restante das ASVs passaram por alinhamento com Mafft (KATOH et al., 2002). Foi feita então a identificação taxonômica com pacote Classifier/Vsearch (BOKULICH et al., 2018) e os bancos de dados.

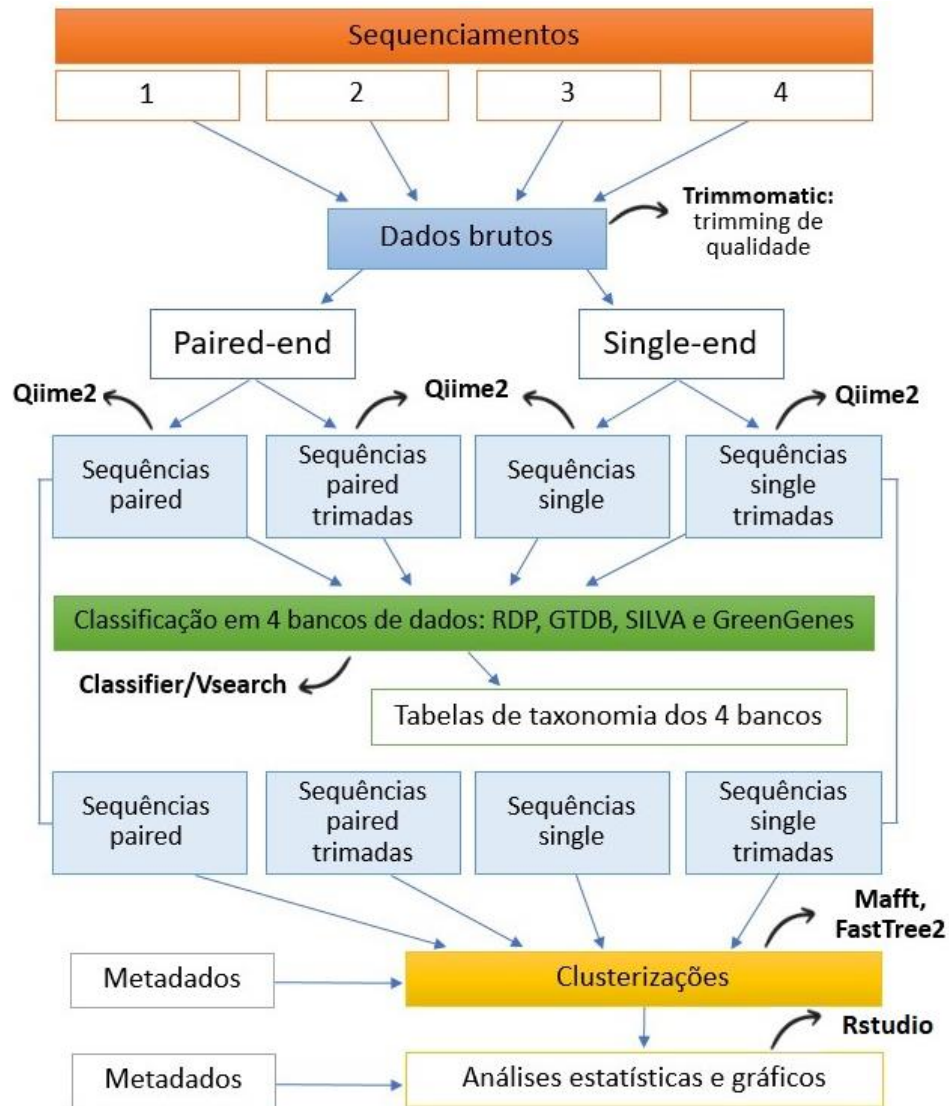
Para este trabalho foi feita a identificação taxonômica em quatro bancos de dados diferentes: GreenGenes (DESANTIS et al., 2006), SILVA (QUAST et al., 2013), RDP (MAIDAK et al., 1996) e GTDB (PARKS et al., 2022), para quatro tipos de tratamento de dados (dados pareados, dados pareados trimando<sup>3</sup> 50pb, dados apenas do R1 e dados apenas do R1 trimando 50pb), para que fosse possível adotar um protocolo que apresentasse os resultados de forma mais confiável e com maior profundidade (maior número de gêneros bacterianos) (fluxograma de trabalho representado na Figura 6).

---

<sup>3</sup> “Trimar” = cortar.



**Figura 6** – Fluxograma de análise de dados do sequenciamento de DNA.



Fonte: Elaborado pela autora e colaboradores (2023).

### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A taxonomia atribuída, bem como os metadados das amostras, foi organizada em tabela e importada para os softwares de análise estatística Rstudio (RSTUDIO TEAM, 2015) e STAMP (PARKS et al., 2014). Foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido dos testes ANOVA (3 grupos) e teste T (2 grupos) para amostras de distribuição normal, e teste de Dunn (3 grupos) e Wilcoxon (2 grupos) para distribuição não-normal, segundo as características dos dados e número de grupos comparados. Diferenças de P menores que 0,05

foram consideradas significativas. Figuras e gráficos foram finalizados no software Inkscape (INKSCAPE PROJECT, 2020).

Para as análises estatísticas dos ensaios microbiológicos, foi utilizado o software Graphpad Prism (versão 8.0, San Diego, CA, EUA), aplicando o teste ANOVA de duas vias.

### 3.8 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto maior intitulado “Causas e efeitos de microbiotas da mãe no nascimento e sobrevida de recém-nascidos pré-termos: estratégias de promoção de saúde materno-infantil”, foi aprovado no comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEPSH) da Maternidade Carmela Dutra e da UFSC, incluindo TCLE. A aprovação corresponde ao processo CAAE: 41063520.4.0000.0121. A pesquisa também foi registrada e aprovada na Plataforma ReBEC, Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos, sob o código RBR-729kr8.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DADOS CLÍNICOS DAS MÃES

Em relação aos dados demográficos apurados com as participantes do estudo, a idade média foi de 30 anos, sendo a mais jovem com 15 anos e a mais velha com 43 anos. 56% das participantes tinham ensino médio completo, e a maioria delas (78,9%) declararam estar em uma união estável ou casadas. Ainda, 16 das 19 participantes eram brancas.

Os dados clínicos apurados por meio dos prontuários médicos das mães demonstraram que 57,9% tiveram seus bebês por parto cesárea, e 42,1% por parto vaginal. O que explica, em parte, a grande quantidade de mães que fizeram uso de antimicrobiano no período perinatal, (78,9%, 15 mães) já que todas as mães de parto cesárea fizeram uso pontual de antimicrobiano de forma profilática pela cirurgia (cefazolina). Das 15 mães que fizeram uso de antimicrobiano, excluindo as que fizeram uso somente pela cesárea (sete mães), as outras oito utilizaram para combater alguma infecção. O período perinatal é definido como o período entre 7 dias antes do parto até 6 dias após o parto, e nesse período, 8 das 19 mães foram categorizadas com alguma infecção (42,1%). Dentre as infecções identificadas estavam a infecção do trato urinário (ITU), vaginose bacteriana e corioamnionite, sendo a ITU a mais ocorrente. Os antimicrobianos utilizados nos casos de infecção incluem gentamicina (3), cefalexina (3), penicilina (3), clindamicina (2), metronidazol (2), e azitromicina (1), algumas com uso combinado. Das 19 mães, 4 delas tiveram gemelares e 12 delas já haviam tido outra gestação previamente. Esses e outros dados clínicos e demográficos podem ser visualizados com maiores detalhes na Tabela 1.

**Tabela 1** – Dados demográficos e clínicos das mães participantes.

<b>DADOS DEMOGRÁFICOS (N=19)</b>	
<i>Idade</i>	30 ± 8,77
<i>Escolaridade</i>	
Ensino médio completo	56% (n=13)
<i>Estado civil</i>	
Casada	21% (n=4)
União estável	57,9% (n=11)
Solteira	21% (n=4)
<i>Raça</i>	

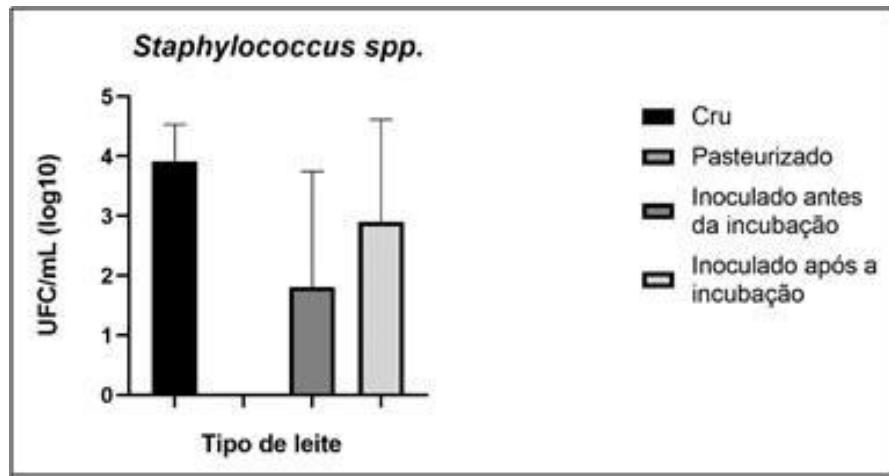
Branca	84,2% (n=16)
Preta	10,5% (n=2)
Parda	5,2% (n=1)
<b>DADOS CLÍNICOS (N=19)</b>	
<i>Tipo de parto</i>	
Vaginal	42,1% (n=8)
Cesárea	57,9% (n=11)
<i>Nº de consultas pré-natal</i>	5 ± 2,6
<i>Gestação múltipla</i>	21% (n=4)
<i>Infecção perinatal</i>	42,1% (n=8)
<i>Tiveram gestações prévias</i>	63% (n=12)
<i>Tiveram abortos prévios</i>	28% (n=6)
<i>Uso de antimicrobiano perinatal</i>	78,9 (n=15)
<i>Classificação da prematuridade</i>	
Extremo pré-termo (EPT)	26,3% (n=5)
Muito pré-termo (VPT)	73,7% (n=14)

Fonte: A autora (2023).

#### 4.2 TESTES MICROBIOLÓGICOS

Os testes microbiológicos realizados para a validação do método de inoculação do leite pasteurizado com o leite da mãe proposto por Cacho et al. (2017) demonstraram que, com a contagem de Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL), não foram constatadas diferenças estatísticas entre os leites inoculados antes e depois o período de incubação de 4 horas. No entanto, é observada diferença no número de colônias nesses dois momentos, sendo possível constatar que ocorreu crescimento bacteriano durante a incubação, nos meios Manitol salgado para *Staphylococcus* spp. (Figura 7) e meio MRS para BAL (Figura 8). A quantidade de bactérias no leite cru das mães teve grande variabilidade. No meio MRS, por exemplo, houve variação de  $1,3 \times 10^3$  UFC/mL, até  $5,6 \times 10^4$  UFC/mL. Como esperado, as amostras de leite pasteurizado não apresentaram crescimento bacteriano, confirmando a segurança do processo de pasteurização realizado no BLH da Maternidade.

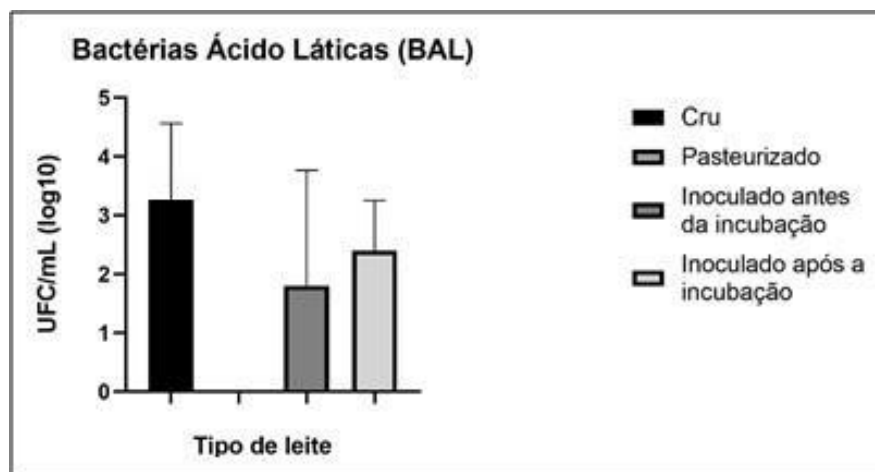
**Figura 7** – Quantificação de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite.



Legenda: Tipo de leite (eixo X) e sua quantificação em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Staphylococcus* spp. por mL, representados em log10 (eixo Y). Observa-se aumento no número de colônias bacterianas após o processo de incubação de 4 horas, apesar de não ser verificada diferença estatisticamente significativa no leite antes vs. depois ( $p=0,0908$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

**Figura 8** - Quantificação de bactérias ácido-láticas em amostras de leite.



Legenda: Tipo de leite (eixo X) e sua quantificação em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de bactérias ácido-láticas por mL, representados em log10 (eixo Y). Observa-se aumento no número de colônias bacterianas após o processo de incubação de 4 horas, apesar de não ser verificada diferença estatisticamente significativa no leite antes vs. depois ( $p=0,1210$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os resultados encontrados no crescimento de bactérias nas placas de MRS (para BAL, incluindo *Lactobacillus*) mostraram uma variabilidade de  $10^3$  a  $10^4$ . Essa quantidade é semelhante ao que foi mostrado por Cacho e colaboradores no estudo que baseia esse

experimento, onde verificaram uma variação entre  $10^3$  e  $10^5$  UFC/mL, sendo a maioria das placas de  $10^4$  UFC/mL (2017).

Uma semelhança também ocorre para as placas do meio Manitol salgado para *Staphylococcus* spp., em que se verificou uma variação de  $10^3$  a  $10^5$ , enquanto o estudo de Cacho e colaboradores teve variação de  $10^3$  a  $10^6$ , com uma distribuição equivalente entre as amostras de leite (2017).

Os resultados das culturas confirmaram que o procedimento de personalização realizado com o leite proporciona o crescimento bacteriano com os parâmetros estabelecidos de tempo e temperatura.

### 4.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA

O sequenciamento resultou em um total de 3.239.562 *reads* iniciais (a amostra com menor número com 3.442 *reads*, e a maior com 165.674 *reads*). Com os processos de filtragem e limpeza, restaram 2.882.363 *reads* (a amostra com menor número com 2.690 *reads*, e a maior com 138.327 *reads*), com uma média de 48 mil *reads* por amostra. Um exemplo, com uma amostra, do efeito das filtrações na qualidade do sequenciamento pode ser visualizado no Apêndice 1.

Após o alinhamento com os 4 bancos de dados (GreenGenes, Silva, RDP e GTDB), foi realizada a contagem de gêneros bacterianos para verificar qual banco conseguiu identificar a maior variedade. Em relação à abordagem de tratamento das sequências, optou-se por utilizar os dados pareados (*paired-end*), ou seja, as fitas R1 e R2 de leitura do sequenciamento. Também, optou-se pelas sequências trimadas em 50 pares de bases, que remove possíveis interferências na leitura, como resíduos de adaptadores, e torna a análise mais robusta. O número de gêneros identificados por cada banco pela abordagem *paired-end*, com os dados trimados e não trimados em 50bp, pode ser observado na Tabela 2, em destaque o banco de dados escolhido, que foi o RDP. O banco de dados RDP, ou *Ribosomal Database Project*, é amplamente utilizado em estudos de filogenia e taxonomia e com ele foi possível identificar 257 gêneros bacterianos diferentes.

**Tabela 2** - Gêneros identificados por banco de dados e abordagem.

<b>Banco de dados</b>	<b>Abordagem</b>	<b>Nº de gêneros identificados</b>
<b>Greengenes</b>	<i>paired/trim50</i>	166
	<i>paired</i>	143
<b>GTDB</b>	<i>paired/trim50</i>	253
	<i>paired</i>	225
<b>Silva</b>	<i>paired/trim50</i>	256
	<i>paired</i>	239
<b>RDP</b>	<i>paired/trim50</i>	<b>257</b>
	<i>paired</i>	224

Legenda: “Paired” = dados pareados (fitas R1 e R2). “Trim50” = sequências trimadas (cortadas) em 50 pares de bases.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Em relação ao número de sequências identificadas, vale ressaltar que foi observada uma diferença entre os três grupos de leite, sendo que o grupo de amostras LI teve pouco mais de 1 milhão de sequências identificadas (1.021.460), enquanto LM e LP ficaram em torno de 700 mil sequências (671.834 e 776.328, respectivamente). Esses dados não necessariamente refletem maior abundância de gêneros nas amostras de LI, também deve-se considerar a possibilidade de um viés do sequenciamento. Além disso, em torno de 400 mil sequências não foram identificadas.

A média por amostra do número de *reads* resultante após os processos de filtragem foi muito semelhante ao demonstrado por Moossavi e colaboradores (2020), que tiveram 47.710 *reads* por amostra, utilizando apenas a região V4 do 16S com o Illumina MiSeq. Muitos outros estudos que também utilizaram as regiões V3 e V4 do 16S para amostras de leite materno com a mesma plataforma apresentaram quantidade de *reads* inferior ao do presente estudo. Browne et al. tiveram uma média de 1.670 *reads* (2019), Kumar et al., 11.538 *reads* (2016), Tobin et al. 12.951 (2018), e Asbury et al. apresentaram 20.591 *reads* por amostra (2020). Nota-se também que alguns demonstraram médias superiores, como 53.637 de Traven et al. (2019) e 78.817 de Beghetti et al. (2022).

Ao comparar com a literatura, o trabalho demonstrou uma quantidade satisfatória de *reads*, superior à maioria dos estudos encontrados que utilizou da mesma plataforma e abordagem. Uma maior quantidade de *reads* significa que é possível uma melhor avaliação da diversidade microbiana, da mesma forma que se pode realizar uma análise estatística de

forma confiável. Ainda, sabe-se que com um maior número de leituras, é possível obter uma melhor identificação e classificação taxonômica (MOOSSAVI et al., 2020).

A abordagem escolhida em relação às sequências foram os dados *paired-end*, que compreende a fita R1 e R2 do DNA. Essa escolha se justifica pelo fato de que com o sequenciamento *paired-end*, depois que um fragmento de DNA é lido de uma extremidade, o processo recomeça na outra direção. Com isso, além de gerar o dobro de leituras de sequenciamento, esse método possibilita um alinhamento de leitura mais preciso e a identificação de rearranjos estruturais, e é o mais amplamente utilizado em estudos de *metabarcoding* (AUER et al., 2017).

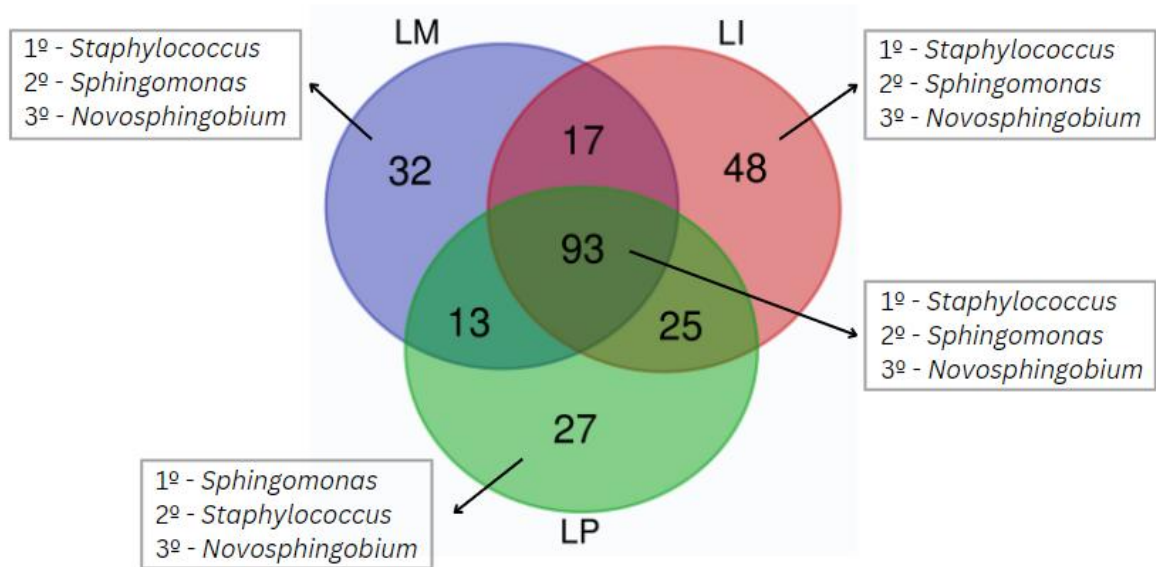
#### **4.3.1 Composição e diversidade bacteriana por grupo de leite**

Ao interseccionar os gêneros identificados em cada grupo de leite, foi verificado que dos 257, somente 93 estavam presentes nos três grupos. Apesar de LI ser uma mistura de LP com LM, ocorrem gêneros bacterianos únicos em LI (n=73), que podem ser decorrentes do processo de inoculação, que exige manipulação das amostras, ou da incubação por 4h, onde gêneros subrepresentados seriam enriquecidos antes do sequenciamento. Os grupos LM e LI compartilham da mesma classificação dos 3 gêneros de maior abundância.

Ao interseccionar somente os grupos de amostras LM com LI, observa-se que os grupos compartilham de 110 gêneros. Também ocorrem alguns gêneros únicos em LM (n=45), que não foram possíveis de restabelecer em LI. Ainda, 25 gêneros foram compartilhados somente entre o LP e LI. Essas análises podem ser visualizadas nos Diagramas de Venn (Figuras 9 e 10). A listagem dos gêneros ocorrentes em cada grupo encontra-se no Anexo 2.



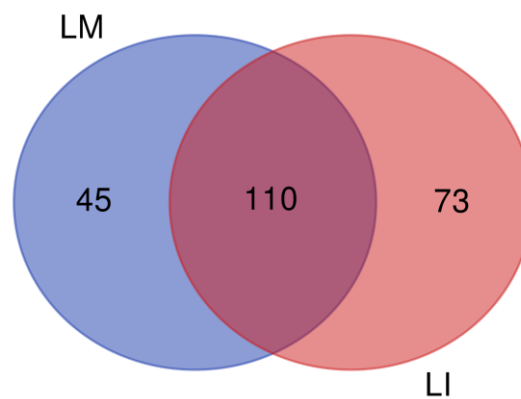
**Figura 9** – Diagrama de Venn do número de gêneros presentes nos grupos de leite LI, LM e LP.



Legenda: Número de gêneros bacterianos encontrados em cada grupo de leite, sendo LP: leite de doadora pasteurizado, LI: leite inoculado e LM: leite da mãe do RNPT, com os três gêneros mais abundantes de cada grupo indicados nos quadros.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

**Figura 10** – Diagrama de Venn do número de gêneros presentes nos grupos de leite LI e LM.



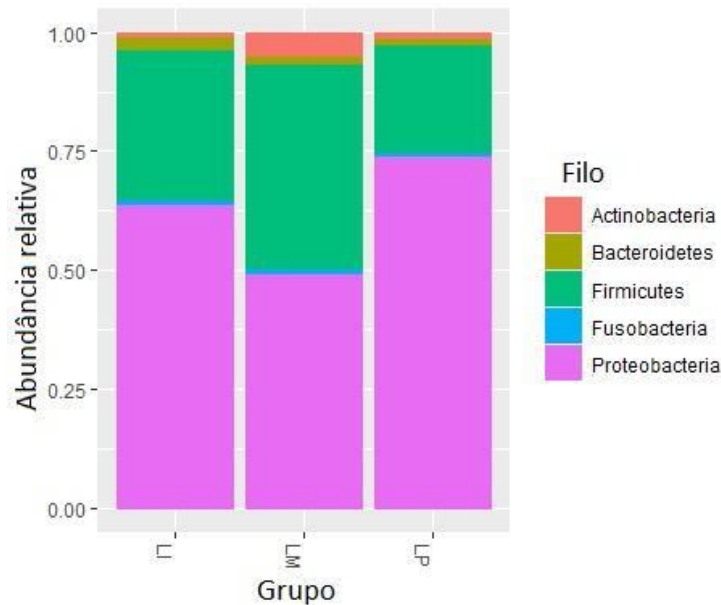
Legenda: Número de gêneros bacterianos encontrados em cada grupo de leite, sendo LM: leite da mãe do RNPT e LI: leite inoculado.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na análise de abundância relativa, são demonstrados os cinco filos mais abundantes: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria e Proteobacteria (Figura

11), sendo claramente predominantes os filos Firmicutes e Proteobacteria, com uma proporção mais equivalente desses dois filos em LM. Em LP, há uma proporção maior de Proteobacteria, enquanto LI parece ficar no meio-termo entre as proporções de LM e LP.

**Figura 11** - Abundância relativa de filos bacterianos nos grupos LI, LM e LP.

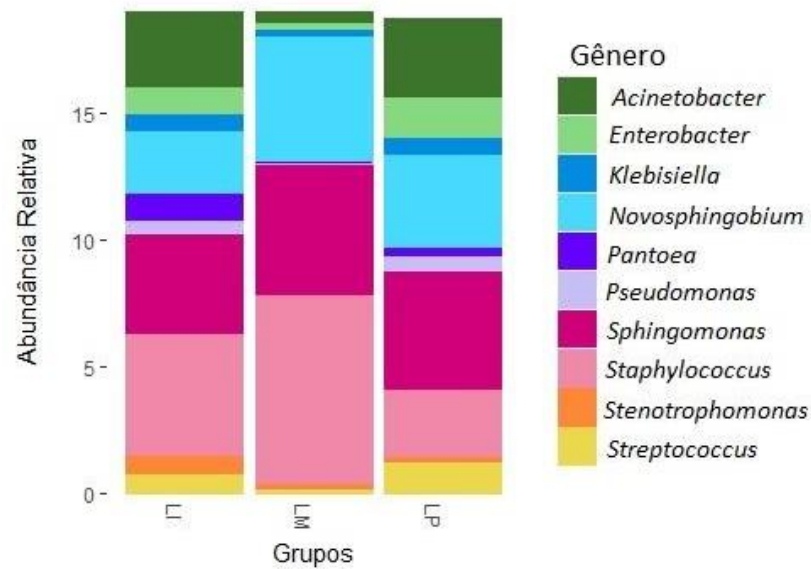


Legenda: Grupos de leite LI (leite inoculado), LM (leite da mãe do RNPT) e LP (leite pasteurizado), e a abundância relativa de filos bacterianos conforme a legenda de cores à direita.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Quando agrupado por gênero, os 10 gêneros mais abundantes nas amostras representam quase 70% do total e incluem *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* e *Streptococcus*. Se observa uma diferença qualitativa entre os grupos com uma semelhança maior entre LI e LP, com uma pequena tendência de LI em se aproximar ao que é visto em LM. Uma das principais diferenças é a presença mais marcante do gênero *Acinetobacter* em LI e LP, que quase não é vista em LM. O mesmo se nota com *Enterobacter*, *Streptococcus* e *Pseudomonas*, em menor proporção (Figura 12).

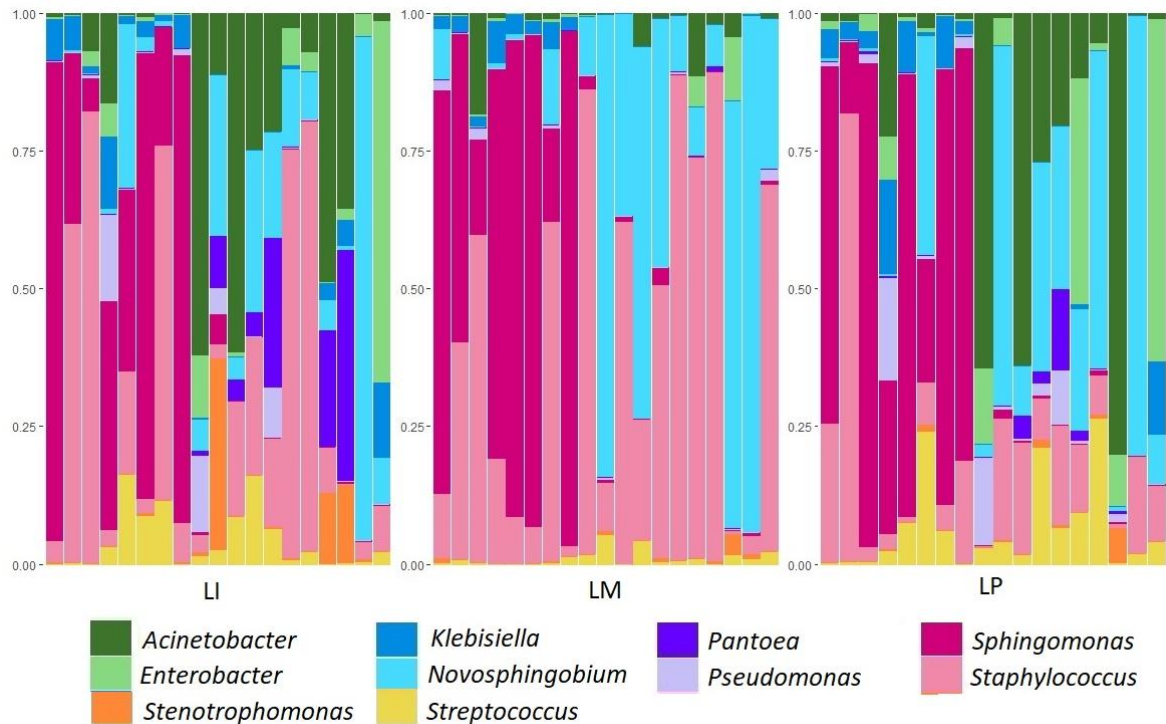
**Figura 12** - Abundância relativa de gêneros bacterianos nos grupos LI, LM e LP.



Legenda: Grupos de leite LI (leite inoculado), LM (leite da mãe do RNPT) e LP (leite pasteurizado), e a abundância relativa de gêneros bacterianos conforme a legenda de cores à direita.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No gráfico de abundância relativa em que os grupos estão divididos por amostras individualmente, verifica-se a grande variabilidade entre amostras (mães) (Figura 13).

**Figura 13** - Abundância relativa de gêneros por amostra dos grupos LI, LM e LP.

Legenda: Cada barra indica uma amostra, referentes aos grupos LI (leite inoculado), LM (leite da mãe do RNPT) e LP (leite pasteurizado) e a abundância relativa de gêneros bacterianos conforme a legenda de cores abaixo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na figura 14 abaixo, as abundâncias estão divididas em pares para cada uma das 19 mães participantes, com sua amostra de leite e o leite personalizado correspondente. Analisando as abundâncias, se observa que em nove dos 19 casos a abundância relativa de gêneros do leite inoculado ficou muito próxima do encontrado no LM, sugerindo assim que o processo de restauração da microbiota atingiu sucesso em 47,3% dos LI, casos em que as amostras demonstraram uma composição muito semelhante ao leite da mãe original.

**Figura 14** - Abundância relativa de cada LM com seu respectivo LI.



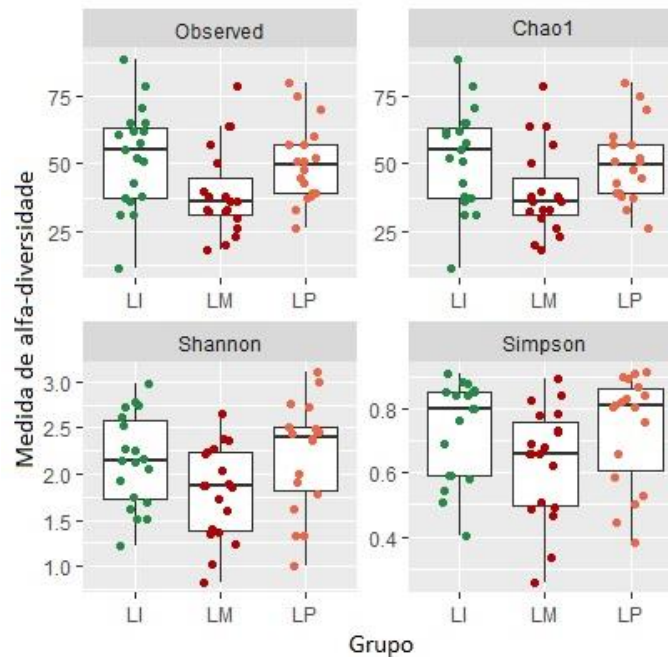
Legenda: Colunas de leite da mãe do RNPT (LM, do lado esquerdo) e leite inoculado (LI, do lado direito) dos 19 indivíduos participantes, com as cores da legenda abaixo, indicando os gêneros bacterianos identificados. Os casos em que o LI ficou mais próximo de LM estão destacados em contorno vermelho.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para alfa-diversidade foi realizada análise com os índices *Observed*, *Chao 1*, *Shannon* e *Simpson*, e a estatística foi calculada pelo teste ANOVA, uma vez que o teste de normalidade Shapiro-Wilk revelou que a distribuição das amostras é normal. A alfa-diversidade se refere à diversidade média de espécies dentro de uma mesma comunidade ou amostra em estudo, e para calculá-la se utiliza métodos matemáticos. Os índices *Observed* e *Chao 1* estão relacionados à riqueza da amostra, sendo que o primeiro mostra apenas o número de bactérias observadas, e o segundo é útil em conjuntos de dados com espécies de baixa abundância. Já os índices *Shannon* e *Simpson* dizem respeito à diversidade das amostras, e fornecem mais inferência sobre a composição da comunidade, contemplando as abundâncias relativas de diferentes espécies e considerando ainda a uniformidade (KIM et

al., 2017). A alfa-diversidade por grupo de leite pode ser observada na figura 15 abaixo, e se observa que a distribuição de amostras LI se assemelha mais às amostras LP.

**Figura 15** – Medidas de alfa-diversidade das amostras por grupo LI, LM e LP.

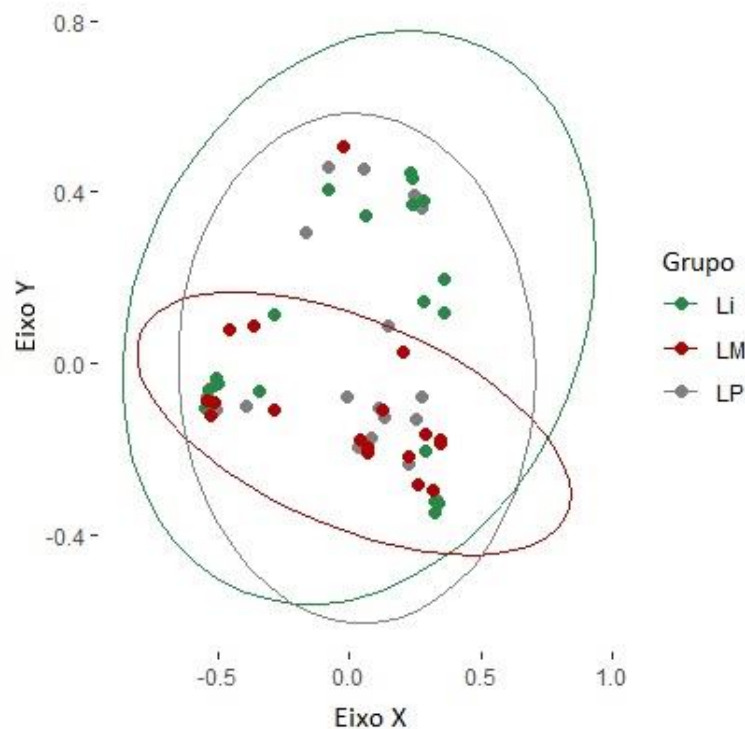


Legenda: Distribuição das amostras pelos índices de diversidade *Observed*, *Chao1*, *Shannon* e *Simpson*, dos grupos leite inoculado (LI, em verde), leite da mãe do RNPT (LM, em vermelho) e leite de doadora pasteurizado (LP, em laranja). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos ( $p=0,406$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Nas análises de beta-diversidade, que diz respeito à variação na composição de espécies entre diferentes amostras (KIM et al., 2017); o gráfico PCoA demonstra uma ampla dispersão nos grupos de amostras LI e LP, indicando variabilidade de composição de amostras dentro do mesmo grupo. No grupo LM, que são os pontos vermelhos, já se percebe uma maior sobreposição de pontos, tanto com amostras do grupo quanto com algumas amostras dos outros dois grupos, indicando uma proximidade de composição entre amostras de grupos distintos. Não foi demonstrada diferença estatística significativa avaliada pelo teste de Adonis ( $p=0.220$ ) (Figura 16).

**Figura 16** – Gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) para amostras dos grupos LI, LM e LP.



Legenda: Eixos X e Y indicam a variação de composição das amostras dos grupos de leite inoculado (LI, em verde), leite da mãe do RNPT (LM, em vermelho) e leite de doadora pasteurizado (LP, em cinza), conforme legenda de cores indicada ao lado; sendo que cada ponto representa uma amostra. Pontos próximos no gráfico representam composição semelhante de gêneros bacterianos. As elipses representam 95% de intervalo de confiança. Não foi encontrada diferença estatística significativa ( $p=0,220$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os gêneros encontrados como os 10 mais abundantes nas amostras de leite dos três grupos, que correspondem a quase 70% do total identificado, já foram reportados em leite materno. Desses 10 gêneros, 4 deles estão entre os gêneros bacterianos sugeridos por Hunt e colaboradores como a “microbiota central do leite materno”, em um dos primeiros estudos que fez essa investigação, em 2011: *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Os dois últimos estão descritos também no perfil de microbiota do leite proposto por Jiménez e colaboradores (2015).

Uma importante revisão sistemática que identificou 44 estudos de microbiota de leite materno, totalizando 3.105 amostras de leite de 2.655 mulheres diferentes, apontou os gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, e *Streptococcus* dentre

os mais frequentemente encontrados (ZIMMERMANN; CURTIS, 2020), que fazem parte também da gama de gêneros mais abundantes nas amostras deste estudo. Sakwisnska e colaboradores destacam a abundância de *Acinetobacter* somente quando o leite foi coletado sem assepsia da mama e rejeição do primeiro jato de leite, sugerindo que esse gênero pode estar mais relacionado à pele (2016). Além disso, a presença acentuada desse gênero nas amostras LM e LP pode significar interferência do processo de manipulação e pasteurização, uma vez que é um gênero que produz biofilme e é de fácil contaminação, especialmente em ambiente hospitalar (YANG et al., 2019).

*Sphingomonas* também já foi relatado em perfis de leite materno (LI et al., 2017; TUOMINEM et al., 2018; HUNT et al., 2011; JIMÉNEZ et al., 2015), bem como *Pantoea* (WARD et al., 2013, PATEL et al., 2017, GOERTZ et al., 2019; DRAGO et al., 2017) e *Novosphingobium* (JIMÉNEZ et al., 2015, RODRIGUEZ-CRUZ et al., 2020).

Chama a atenção a presença abundante de gêneros como *Klebsiella* e *Stenotrophomonas* nas amostras de leite, uma vez que esses gêneros representam patógenos importantes, especialmente em cenário clínico-hospitalar de resistência a antimicrobianos. No entanto, a literatura aponta que essas bactérias também são de ocorrência natural na microbiota de leite materno, tanto *Klebsiella* (SIMPSON et al., 2017; DRAGO et al., 2017; PATEL et al., 2017; CHEN et al., 2015; DAHABAN et al., 2013) quanto *Stenotrophomonas* (SIMPSON et al., 2017; LI et al., 2017; KUMAR et al., 2016, SAKWINSKA et al., 2016), sendo que o último foi descrito inclusive no estudo de personalização de leite materno que baseia os experimentos deste trabalho, de Cacho e colaboradores (2017), e em estudo específico da microbiota de leite de mães de bebês prematuros (ASBURY et al., 2020). No estudo de Asbury e colaboradores, *Stenotrophomonas* foi apontado como abundante especialmente em mulheres com sobrepeso, e a proporção desse gênero aumentou conforme o tempo de lactação (2020). No presente estudo, não foram acessadas informações a respeito do peso e IMC das gestantes.

Em relação ao gênero *Klebsiella*, da mesma forma que pode apenas representar parte da microbiota comensal, um estudo recente sugere que sua presença no leite materno pode também representar um alerta. Gómez e colaboradores relataram que cepas comensais de *Klebsiella* spp. isoladas de leite materno de mulheres saudáveis e fezes de lactentes saudáveis amamentados apresentam características de virulência (genes de virulência,



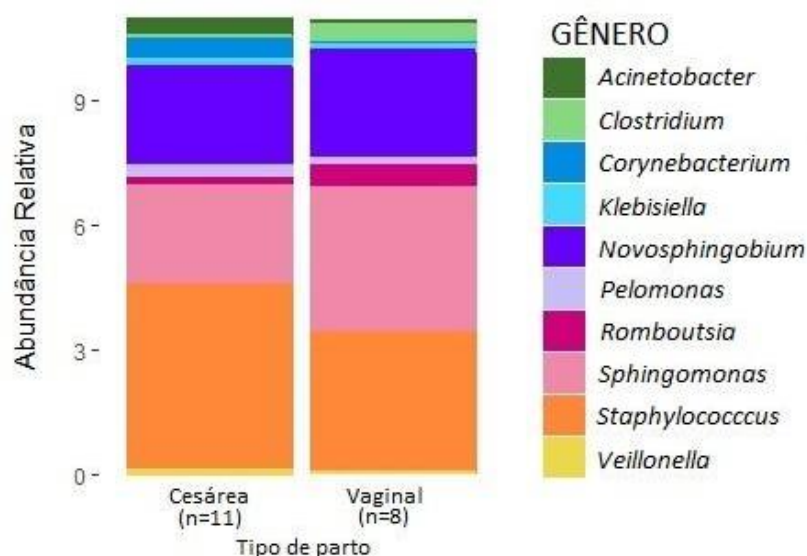
sideróforos e biofilmes). Essas cepas são comparáveis a isolados adquiridos na comunidade e infectados em UTIs neonatais, sugerindo assim que essa microbiota do leite pode constituir um reservatório para infecção (2021).

#### 4.3.2 Composição e diversidade bacteriana de LM por parâmetro clínico: tipo de parto

Com as amostras dos leites das mães participantes do estudo, que correspondem ao grupo LM de leite, foi realizada análise de composição e diversidade agrupados de acordo com parâmetros clínicos observados nas gestantes.

Quando divididas por tipo de parto, as amostras analisadas mostram como gêneros mais abundantes *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Novosphingobium*, *Pelomonas*, *Romboutsia*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* e *Veillonella*. O grupo de parto cesárea demonstra maior abundância do gênero *Staphylococcus*, enquanto o gênero *Sphingomonas* é observado em maior proporção no grupo de parto vaginal (Figura 17). Há também uma sutil predominância de *Acinetobacter* e *Corynebacterium* no grupo cesárea, e de *Romboutsia* no grupo de parto vaginal. Os outros gêneros ocorrem em proporções mais semelhantes entre os dois grupos.

**Figura 17** - Abundância relativa de gêneros bacterianos por tipo de parto.

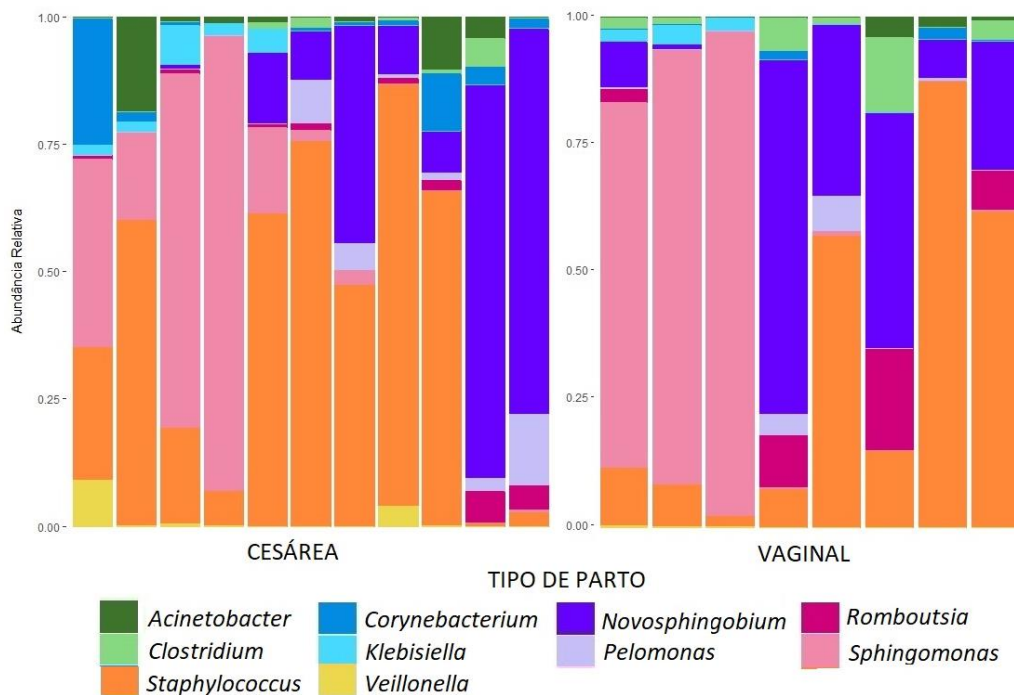


Legenda: Grupos de leite LM divididos em tipo de parto, sendo a primeira coluna parto cesárea e a segunda coluna parto vaginal, com a abundância relativa de gêneros bacterianos conforme a legenda de cores à direita.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Quando esses mesmos grupos são demonstrados em gráfico que exibem cada amostra, mais uma vez se observa a grande variabilidade entre mães, que demonstram um perfil único (Figura 18).

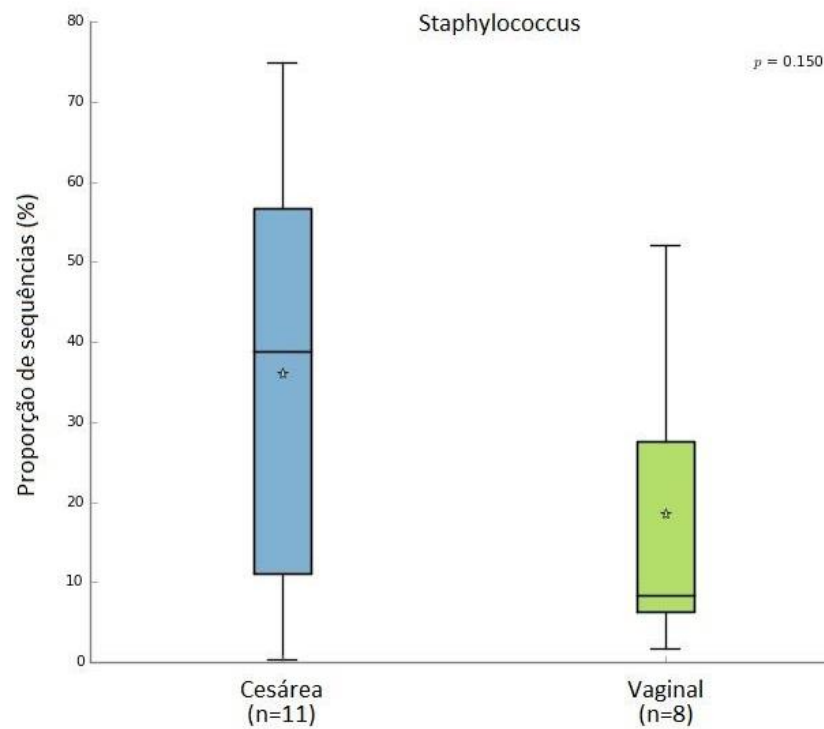
**Figura 18** - Abundância relativa de gêneros por amostra, por tipo de parto.



Legenda: Cada barra indica uma amostra, referentes aos grupos de parto cesárea (n=11), e parto vaginal (n=8), e a abundância relativa de gêneros bacterianos conforme a legenda de cores abaixo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Quando avaliado individualmente, o gênero *Staphylococcus* apresentou importante diferença entre os grupos de parto cesárea e parto vaginal, estando consideravelmente mais presente nas amostras de mães de parto cesárea (Figura 19).

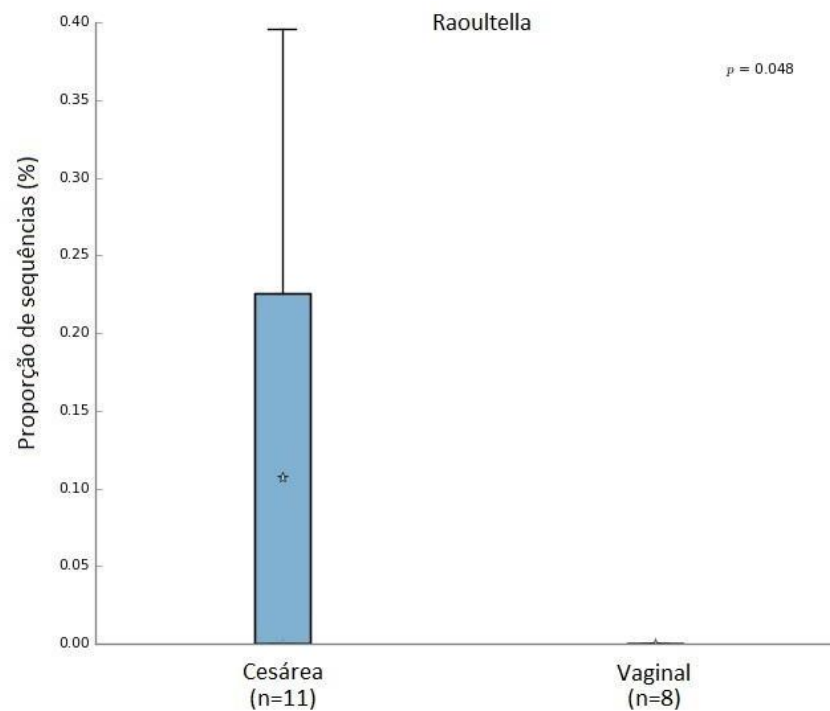
**Figura 19** - Ocorrência do gênero *Staphylococcus* no leite por tipo de parto.

Legenda: Proporção de seqüências (%; eixo Y) e amostras de LM divididas por tipo de parto, sendo a primeira barra as de parto cesárea, em azul, e a segunda de parto vaginal, em verde. Diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,150$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Outro gênero que apresentou importante diferença entre os grupos foi o gênero *Raoultella*, que não está entre os gêneros mais abundantes, mas quando analisado os grupos por tipo de parto se mostra presente quase que unicamente no grupo do parto cesárea (Figura 20).

**Figura 20** - Ocorrência do gênero *Raoultella* no leite por tipo de parto.



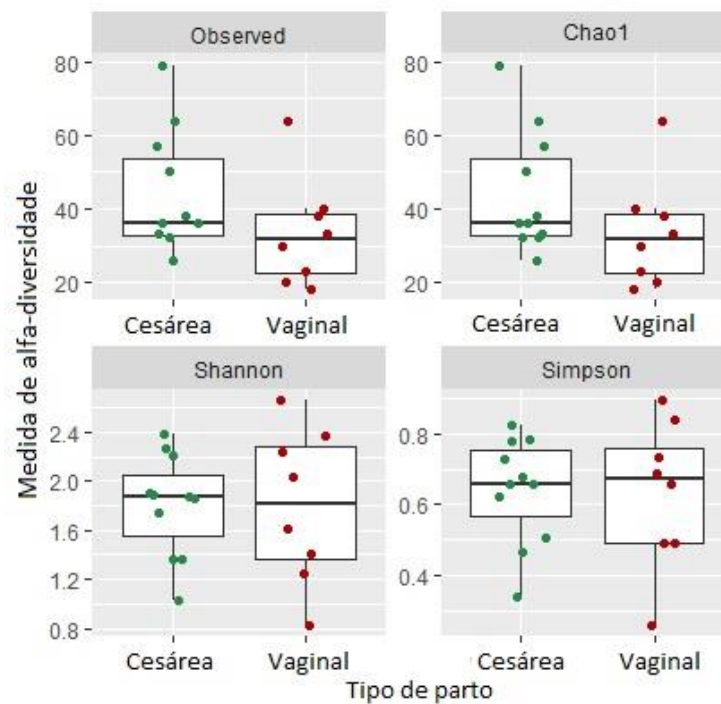
Legenda: Proporção de seqüências (%), eixo Y) e amostras de LM divididas por tipo de parto, sendo a primeira barra as de parto cesárea, em azul, e a segunda de parto vaginal. A diferença é significativa ( $p=0,046$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para alfa-diversidade, foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk seguido de teste T para as medidas que resultaram em distribuição normal, e teste Wilcoxon para as que resultaram em distribuição não-normal. Esses testes foram os mesmos para todos os parâmetros clínicos, em que foram analisadas diferenças entre dois grupos.

Nessa comparação, nas métricas de alfa-diversidade é possível observar que em *Observed* e *Chao1* as amostras do grupo de parto cesárea se comportam com maior amplitude de dispersão, demonstrando maior riqueza de composição. Já nas avaliações por *Shannon* e *Simpson*, uma maior amplitude é observada no grupo de parto vaginal, indicando que a diversidade bacteriana nesse grupo é um pouco mais acentuada. Estatisticamente, não foi constatada diferença significativa (Figura 21).

**Figura 21** - Medidas de alfa-diversidade para grupos de amostras por tipo de parto.

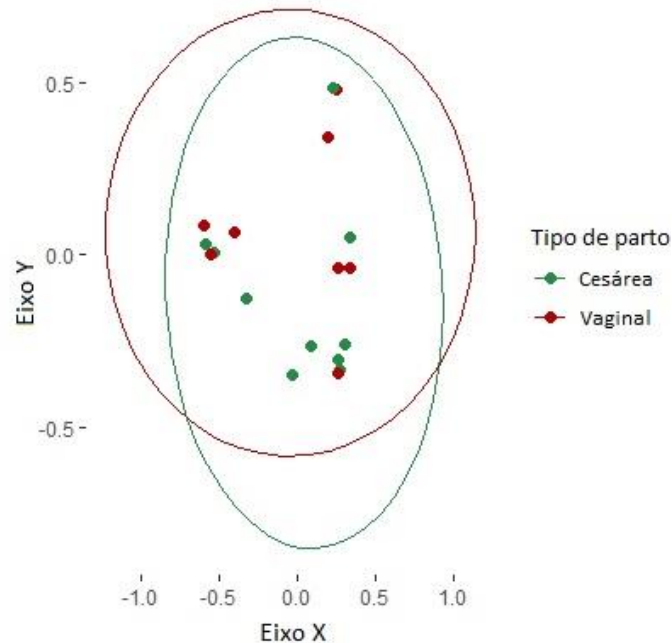


Legenda: Distribuição das amostras pelos índices de diversidade *Observed*, *Chao1*, *Shannon* e *Simpson* para os leites das mães de parto cesárea (em verde) e parto vaginal (em vermelho) e leite de doadora pasteurizado (LP, em laranja). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos (*Observed*,  $p=0,8365$ ; *Chao1*,  $p=0,1855$ , *Shannon*,  $p=0,9811$  e *Simpson*,  $p=0,9222$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para a beta-diversidade, no gráfico de análise de coordenadas principais demonstra dispersão das amostras de ambos os grupos, sem agrupamentos importantes. O teste estatístico de Adonis demonstrou que não há diferenças significativas entre os grupos (Figura 22).

**Figura 22** – Gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) para amostras dos grupos de mães de parto cesárea e vaginal.



Legenda: Eixos X e Y indicam a variação de composição das amostras de leite de mães de parto cesárea (em verde) e vaginal (em vermelho) conforme legenda de cores indicada ao lado; sendo que cada ponto representa uma amostra. Pontos próximos no gráfico representam composição semelhante de gêneros bacterianos. As elipses representam 95% de intervalo de confiança. Não foi encontrado diferença estatística significativa ( $p=0,6969$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O tipo de parto já demonstrou impactar na composição e diversidade da microbiota do leite materno. Um estudo de Cabrera-Rubio e colaboradores demonstrou que o parto cesárea estava associado a uma maior ocorrência de *Staphylococcus* em comparação com o parto vaginal, que vem ao encontro dos resultados do presente trabalho (2016). O mesmo foi demonstrado por Toscano e colaboradores, cujo estudo revelou uma diminuição de aproximadamente 29% na abundância de *Staphylococcus* no parto vaginal em relação a amostras de leite de mães de parto cesárea (2017).

A abundância do gênero *Staphylococcus* no leite materno, independente do tipo de parto, pode estar relacionado a espécies presentes na pele, como *Staphylococcus aureus*. Essa espécie é capaz de agregar-se e produzir biofilme, que é um dos principais mecanismos pelos quais os *Staphylococcus* colonizam superfícies bióticas e abióticas, especialmente quando induzidas por *Propionibacterium*, gênero bacteriano também presente nas amostras

de leite (WOLLENBERG et al., 2014). Da mesma forma, sabe-se que as glândulas mamárias são constituídas por uma rede complexa de ductos (ALEX et al., 2020), representando um ambiente ideal para a colonização estafilocócica que provavelmente é intensificada pela interação positiva com *Propionibacterium*. Apesar de existir uma justificativa para a presença de *Staphylococcus* em abundância no leite materno, percebe-se uma lacuna na literatura ao se buscar por explicações para a predominância desse gênero no leite de mulheres que fizeram cesárea. Pode-se inferir que parece estar relacionado com o contato do bebê com a pele da mãe no momento da cesárea e posterior fluxo retrógrado no momento da amamentação, mas que necessita maior investigação.

Os mesmos estudos de Cabrera-Rubio et al. (2016) e Toscano et al. (2017) concordaram ao demonstrar que o parto cesárea estava associado a uma menor diversidade bacteriana no leite, o que também é observado nos resultados do presente estudo, sendo perceptível nos índices *Shannon* e *Simpson* de alfa-diversidade. Uma menor diversidade bacteriana da microbiota intestinal esteve relacionada a crianças desenvolvendo diferentes tipos de condições alérgicas (FORNO et al., 2008; LI et al., 2014), o que pode ser explicado pelo fato de que, geralmente, um ecossistema com maior biodiversidade, mais rico em espécies bacterianas, é mais resiliente e adaptável ao estresse do que um com baixa variedade de microrganismos (TOSCANO et al., 2017). A microbiota intestinal infantil, por sua vez, está diretamente relacionada à microbiota do leite materno, sendo que as bactérias do leite são capazes de atuar como bactérias pioneiras no estágio crucial da colonização inicial do intestino neonatal (MURPHY et al., 2017, PANNARAJ et al., 2017). Nesse sentido, se faz importante a realização de mais estudos acerca do efeito do tipo de parto na microbiota intestinal infantil.

Em relação a *Raoultella*, que se apresenta com diferença relevante no grupo de parto cesárea, é um gênero que já foi descrito pela ocorrência natural no leite materno (TOGO et al., 2019). Também, destaca-se que espécies desse gênero foram identificadas e isoladas como cepas com características de virulência no estudo de Gómez et al. (*Raoultella planticola* e *Raoultella ornithinolytica*), associadas a infecção neonatal e adquiridas na comunidade (2021), podendo relacionar-se com o parto cesárea, a ser investigado em maiores estudos.

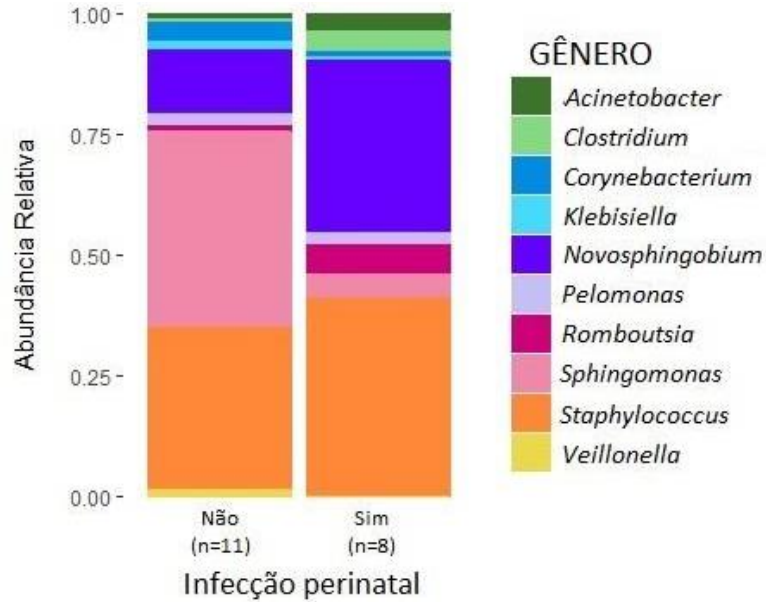
### 4.3.3 Composição e diversidade bacteriana de LM por parâmetro clínico: infecção perinatal

Das 19 mães participantes do estudo, oito apresentaram em seus registros médicos algum tipo de infecção durante o período perinatal, sendo a mais frequente delas a ITU. Para analisar o impacto dessas infecções na microbiota do leite, as amostras LM dessas mães foram agrupadas, e realizada análise de composição e diversidade. Para essa comparação, deve-se considerar também que todas essas mães que constam no grupo que teve infecção fizeram uso de antimicrobiano por pelo menos 3 dias, sendo gentamicina, cefalexina e penicilina os mais utilizados.

Quando agrupados dessa forma, os 10 gêneros mais abundantes também foram *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Novosphingobium*, *Pelomonas*, *Romboutsia*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* e *Veillonella*. Na análise de abundância relativa de gêneros bacterianos, quando avaliadas em grupo, nota-se uma diferença importante do gênero *Sphingomonas* entre os dois grupos, além de maior proporção do gênero *Novosphingobium* no grupo de mães que tiveram infecção (Figura 23). Também é demonstrado a abundância relativa por amostras dos dois grupos com a diferença de composição entre as amostras LM de cada mãe (Figura 24).



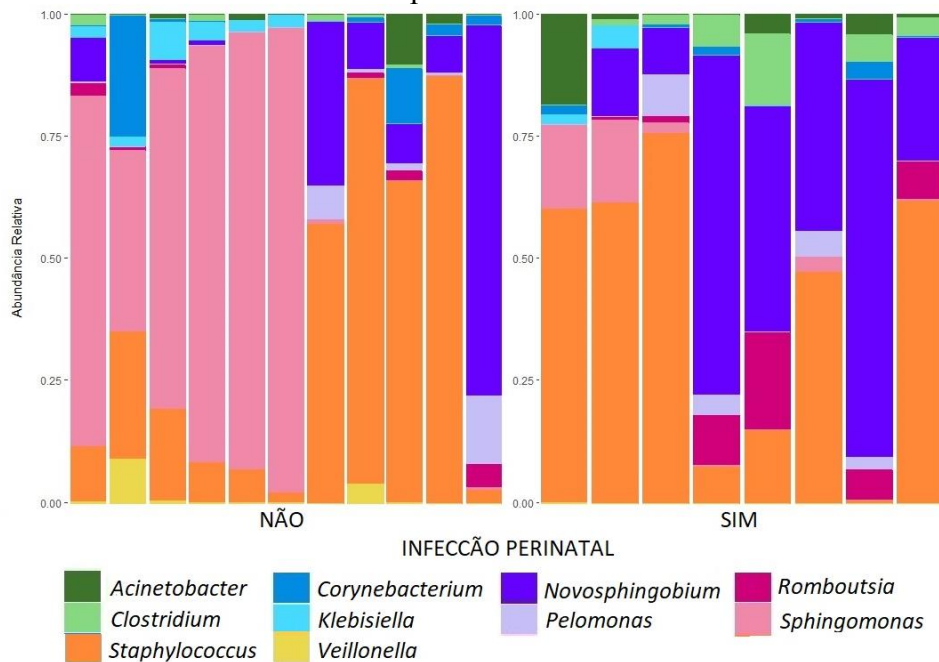
**Figura 23** - Abundância relativa de gêneros bacterianos por ocorrência de infecção perinatal.



Legenda: Grupos de leite LM divididos em tipo de parto, sendo a primeira coluna referente às mães que não tiveram infecção (n=11) e a segunda coluna as mães que tiveram (n=8), com a abundância relativa de gêneros bacterianos conforme a legenda de cores à direita.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

**Figura 24** - Abundância relativa de gêneros por amostra, por ocorrência de infecção perinatal.

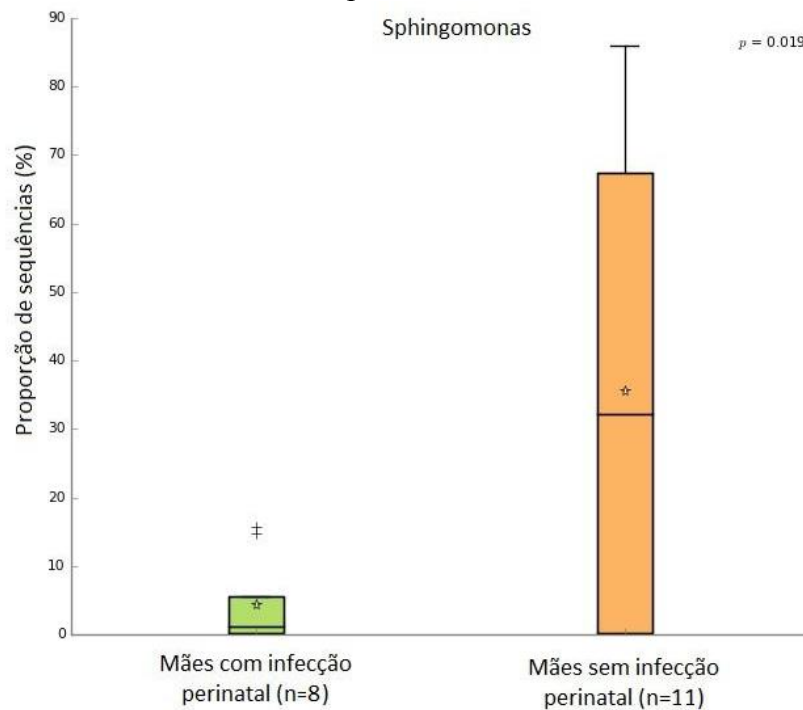


Legenda: Cada barra indica uma amostra, referentes aos leites LM dos grupos de gestantes que não tiveram infecção perinatal (n=11), e que tiveram (n=8), e a abundância relativa de gêneros bacterianos conforme a legenda de cores abaixo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Quando avaliado individualmente, o gênero *Sphingomonas* apresenta diferença estatística ( $p=0,019$ ) em relação à sua abundância, que é significativamente maior no grupo de leites das mães que não tiveram quadro de infecção perinatal (Figura 25).

**Figura 25** - Ocorrência do gênero *Sphingomonas* no leite por ocorrência ou não de infecção perinatal.



Legenda: Proporção de sequências (%), eixo Y) e amostras de LM divididas pela ocorrência ou não de infecção perinatal, sendo a primeira barra as de mães com infecção, em verde, e a segunda de mães sem infecção, em laranja. Diferença entre grupos é estatisticamente significativa ( $p=0,019$ ).

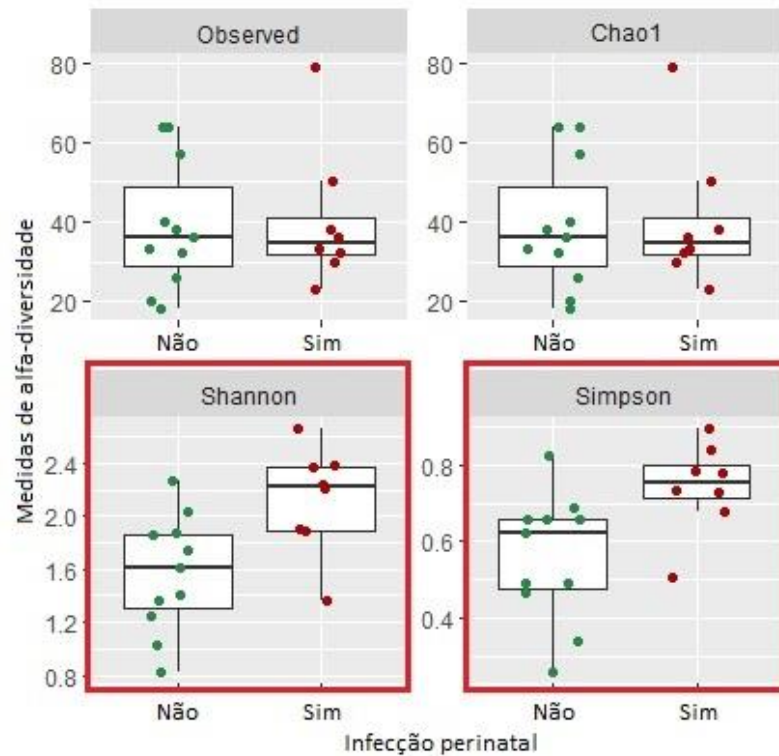
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para as medidas de alfa-diversidade (Figura 26), nota-se que as amostras se agrupam no gráfico *boxplot* nas medidas *Shannon* e *Simpson*, e foi identificada diferença estatística significativa nessas medidas, indicando que a diversidade bacteriana é significativamente diferente entre os dois grupos.

No gráfico de coordenadas principais (PCoA) para beta-diversidade, também é observada uma tendência de agrupamento, visível principalmente pelo direcionamento das

elipses. O teste estatístico demonstrou haver diferença significativa entre os dois grupos ( $p=0,0422$ ), sugerindo que as amostras têm composição semelhante dentro de cada grupo, mas diferente do outro grupo (Figura 27).

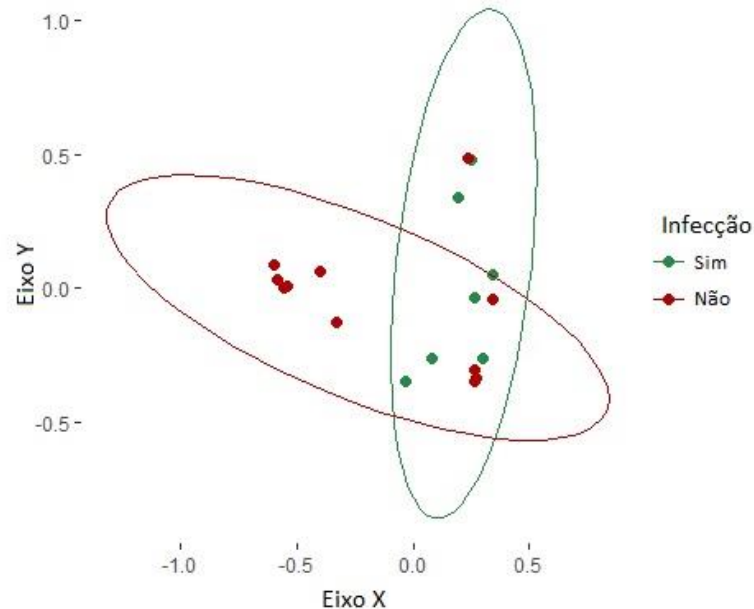
**Figura 26** - Medidas de alfa-diversidade para grupos de amostras por ocorrência ou não de infecção perinatal.



Legenda: Distribuição das amostras pelos índices de diversidade *Observed*, *Chao1*, *Shannon* e *Simpson* para os leites das mães que não tiveram infecção perinatal (em verde) e que tiveram (em vermelho). Foi observada diferença estatística significativa nas medidas *Shannon* e *Simpson* entre os grupos ( $p=0,106$  e  $p=0,015$ , respectivamente), e não houve diferença em *Observed* e *Chao1* ( $p=1$  em ambos).

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

**Figura 27** - Gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) para amostras dos grupos de mães com ocorrência ou não de infecção perinatal.



Legenda: Eixos X e Y indicam a variação de composição das amostras de leite de mães que tiveram infecção perinatal (em verde) e que não tiveram (em vermelho) conforme legenda de cores indicada ao lado; sendo que cada ponto representa uma amostra. Pontos próximos no gráfico representam composição semelhante de gêneros bacterianos. As elipses representam 95% de intervalo de confiança. Diferença estatística significativa entre os grupos ( $p=0,0422$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A presença de algum quadro infeccioso no período próximo ao parto demonstrou ter influência relevante na composição e diversidade da microbiota do leite. Como já mencionado, as infecções relatadas foram ITU (a mais ocorrente), corioamnionite, que consiste em uma infecção das membranas que envolvem o feto, mas também pode afetar a placenta ou o líquido amniótico, e vaginose bacteriana. A primeira é geralmente causada por microrganismos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, além de *Streptococcus* do grupo B (IMADE et al., 2010). Sabe-se que mulheres grávidas são mais suscetíveis a contrair esse tipo de infecção devido às várias alterações morfológicas, hormonais e fisiológicas que o corpo sofre durante a gestação. A uretra de tamanho reduzido e a proximidade do trato urinário ao canal anal nas mulheres representam um risco aumentado de contaminação por bactérias da microbiota fecal (TOTADHRI et al., 2022).

A corioamnionite, por sua vez, é uma causa comum de nascimentos prematuros, e clinicamente tem sido definida como um conjunto heterogêneo de condições caracterizadas por infecção ou inflamação ou ambas. Estudos mostram que a transmissão intrauterina real

de microrganismos para o feto nesse quadro é muito baixa e limitada a bactérias altamente virulentas, como bacilos Gram-negativos, estreptococos aeróbicos e *Listeria* spp (PENG et al., 2018).

A vaginose bacteriana, outro quadro presente em algumas mães, é um quadro infeccioso em que não existe um único microrganismo implicado no seu diagnóstico, mas sim a alteração da microbiota e a presença de diferentes bactérias. O gênero *Clostridium*, que se apresentou como um dos mais abundantes no grupo de mães que tiveram infecção, já foi relatado em diagnóstico de vaginose bacteriana, mas em um estudo antigo, de Cotch e colaboradores (1998). Também, a vaginose bacteriana na gravidez já foi associada a complicações obstétricas, como o próprio parto prematuro, coriamnionite, sepse puerperal e infecções pós-operatórias (LAXMI et al., 2012). Nos prontuários médicos acessados nesse estudo, não foi reportado qual foi o microrganismo causador da infecção.

Nos resultados deste trabalho se observa que independente da infecção presente, o grupo de mães que teve algum tipo de quadro infeccioso no período próximo ao parto apresentou um perfil microbiano do leite diferente das que não tiveram. O gênero *Sphingomonas*, em especial, se apresenta significativamente mais presente no leite de mães que não passaram por infecção. Considerando que se trata de um gênero de ocorrência natural no leite e frequentemente relatado como parte do perfil da microbiota do leite (JIMÉNEZ et al., 2015, TOGO et al., 2019), incluindo a microbiota de leite de mães de prematuros (ASBURY et al., 2020), essa diferença se faz importante e pode acarretar em impactos na modulação da microbiota intestinal do RN.

A diversidade da microbiota também demonstrou diferenças relevantes. As mães que tiveram infecção tiveram uma menor diversidade de gêneros, e, como já mencionado anteriormente, uma diversidade maior de microrganismos traz benefícios na adaptabilidade ao estresse que um sistema com baixa variedade não traz (TOSCANO et al., 2017).

É importante considerar que todas essas mães que constam no grupo infecção fizeram uso de antimicrobiano, então as alterações no perfil da microbiota podem também estar relacionados a isso, especialmente no quesito diversidade. O uso de antimicrobiano tanto antes quanto após o parto, ou ambos, foi relacionado à uma menor diversidade e riqueza microbiana em amostras de leite de mães de parto prematuro (ASBURY et al., 2020), o que também é observado no presente estudo.

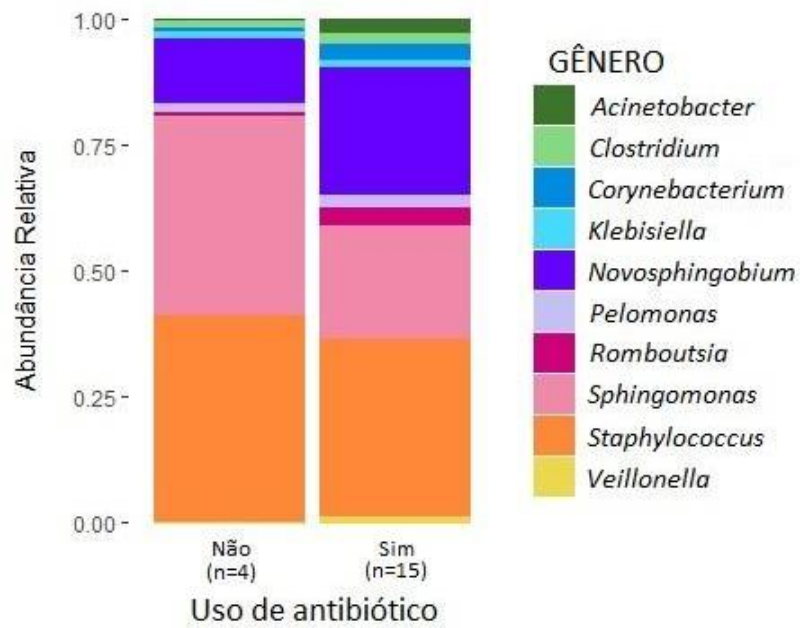
Não se sabe exatamente se a razão se dá pela presença de infecção ou pelo uso de antimicrobiano, mas o que se nota é a diferença de composição e diversidade microbiana quando existe esse quadro. Essas diferenças revelam dois perfis de microbiota com distinções importantes, incluindo diferenças qualitativas quanto estatisticamente significativas, que podem impactar na microbiota do RN amamentado. A análise da composição e diversidade da microbiota fecal dos bebês amamentados constitui outra dissertação de mestrado dentro do projeto geral, da bióloga Isis Mello pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC.

#### **4.3.4 Composição e diversidade bacteriana de LM por parâmetro clínico: uso de antimicrobiano**

Das gestantes participantes do estudo, 15 das 19 mães fizeram uso de antimicrobiano durante o período perinatal, e a comparação entre os grupos de uso ou não de antimicrobiano em relação à abundância relativa de gêneros pode ser observada em grupo (Figura 28), e por amostra individualmente (Figura 29). Essa divisão de grupos inclui as mães que fizeram uso de antimicrobiano profilático pela cirurgia da cesárea, e os gêneros mais abundantes também são *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Novosphingobium*, *Pelomonas*, *Romboutsia*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* e *Veillonella*.

O gênero *Sphingomonas* se apresenta mais abundante no grupo de mães que não utilizou antimicrobiano, mas é importante considerar que nessa comparação existe uma diferença grande no número amostral dos dois grupos, já que as que utilizaram foram 15, e que não utilizaram foram apenas 4. Também, nota-se um aumento relevante da abundância de *Novosphingobium* no grupo que usou antimicrobiano.

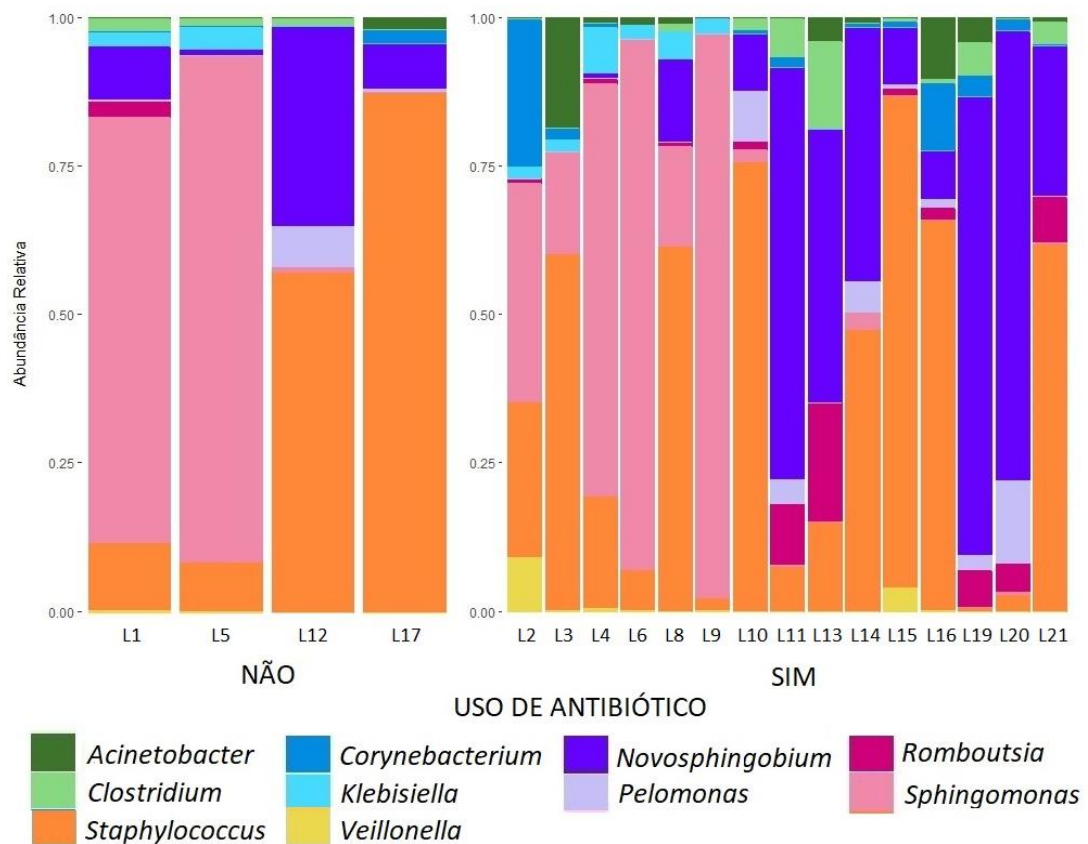
**Figura 28** - Abundância relativa de gêneros bacterianos por uso de antimicrobiano.



Legenda: Grupos de leite LM divididos em grupos referentes ao uso de antimicrobianos, sendo a primeira coluna referente às mães que não fizeram uso (n=4) e a segunda coluna as mães que fizeram (n=15), com a abundância relativa de gêneros bacterianos conforme a legenda de cores à direita.

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

**Figura 29** - Abundância relativa de gêneros por amostra, por uso de antimicrobiano.



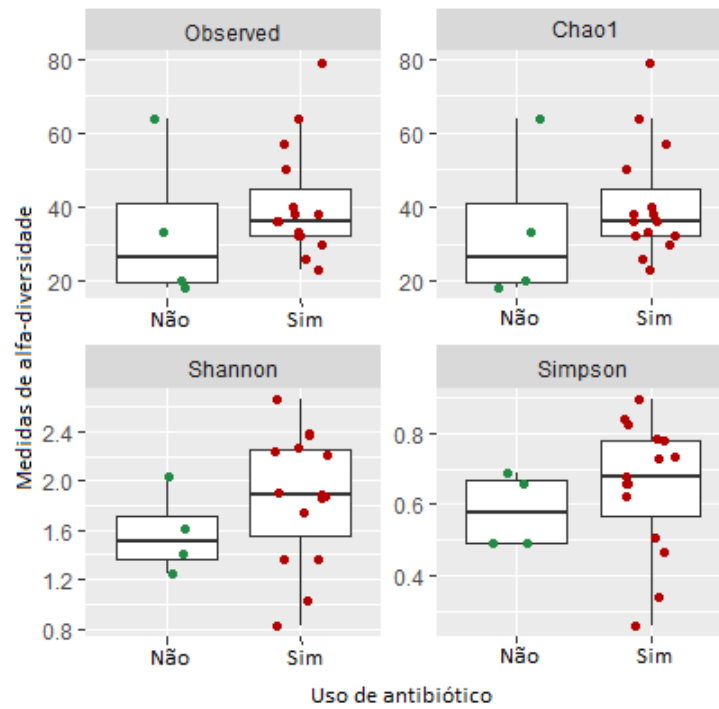
Legenda: Cada barra indica uma amostra, referentes aos leites LM dos grupos de gestantes que não fizeram uso de antimicrobiano (n=4), e que fizeram (n=15), e a abundância relativa de gêneros bacterianos conforme a legenda de cores abaixo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para as medidas de alfa (Figura 30) não foram constatadas diferenças significativas, embora os índices de *Shannon* e *Simpson* tenham chegado muito próximo à significância. Na gráfico PCoA, não foi observada tendência de agrupamento de amostras por semelhança de composição, sem diferença significativa entre os grupos (Figura 31).



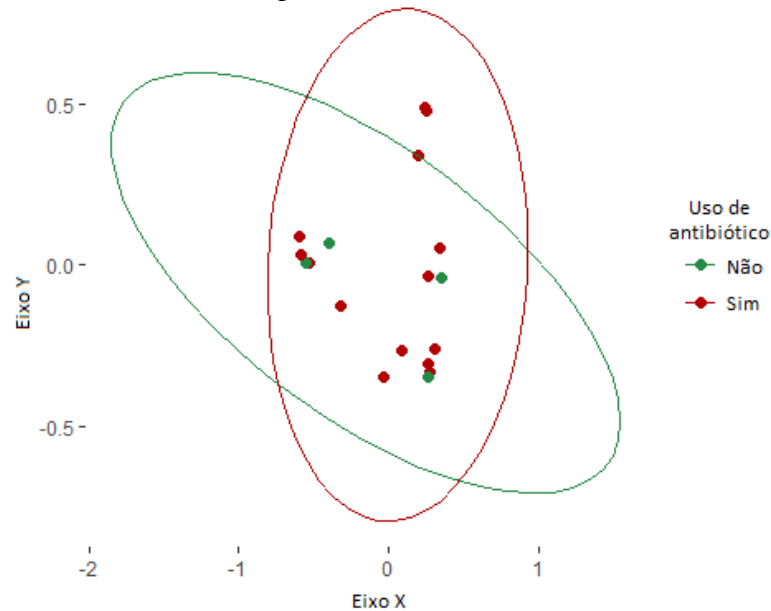
**Figura 30** - Medidas de alfa-diversidade para grupos de amostras por uso de antimicrobiano.



Legenda: Distribuição das amostras pelos índices de diversidade *Observed*, *Chao1*, *Shannon* e *Simpson* para os leites das mães que não utilizaram antimicrobiano (em verde) e que utilizaram (em vermelho). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos (*Observed*,  $p=0,1765$ ; *Chao1*,  $p=0,1955$ , *Shannon*,  $p=0,046$  e *Simpson*,  $p=0,04$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

**Figura 31** - Gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) para amostras dos grupos de mães por uso de antimicrobiano.



Legenda: Eixos X e Y indicam a variação de composição das amostras de leite de mães que não utilizaram antimicrobiano (em verde) e que utilizaram (em vermelho) conforme legenda de cores indicada ao lado; sendo que cada ponto representa uma amostra. Pontos próximos no gráfico representam composição semelhante de gêneros bacterianos. As elipses representam 95% de intervalo de confiança. Diferença estatística não é significativa entre grupos ( $p=0,5633$ )

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Nessa divisão de grupos deve-se considerar que, dessas 15 mães que fizeram uso de antimicrobiano, 7 fizeram somente uso pontual de cefazolina para profilaxia cirúrgica. Como foi utilizado uma única dose, é difícil inferir a extensão do efeito dessa dose na microbiota do leite, uma vez que também não constam estudos nesse sentido na literatura. Um estudo clínico randomizado recente, contudo, analisou o efeito do uso de cefazolina como profilaxia antibiótica cirúrgica na microbiota intestinal, e não apontou diferenças na composição e diversidade com o uso do antimicrobiano (KAKU et al., 2020).

Os antimicrobianos usados nas gestantes do estudo, além da cefazolina profilática são de classes diversas e incluem aminoglicosídeos (gentamicina), cefalosporina de primeira geração (cefalexina), betalactâmicos (penicilina), lincosamida (clindamicina), nitroimidazol (metronidazol) e macrolídeo (azitromicina), sendo o metronidazol e cefalexina os mais utilizados, pelas indicações para vaginose bacteriana e ITU, respectivamente. Apesar desses

medicamentos agirem em bactérias como *Staphylococcus*, contraditoriamente os resultados demonstraram maior predominância desse gênero no grupo que fez uso de antimicrobiano.

No estudo de Asbury e colaboradores, que analisou o uso de antimicrobianos categorizando-os por classe, o uso de macrolídeos logo após o parto foi associado a um aumento de *Corynebacterium*, e o uso de cefalosporinas foi associado a menor abundância de *Staphylococcus* (2020). Nos resultados obtidos, não foi identificada uma diferença importante na abundância de *Corynebacterium*, e a abundância de *Staphylococcus* também não demonstra ter relação ao uso da classe de antimicrobianos, uma vez que o gênero está distribuído entre diversas mães, e as que fizeram uso de cefalexina foram apenas 3 delas (a única cefalosporina relatada além da cefazolina profilática).

O gênero *Novosphingobium* se apresenta de forma abundante no grupo que fez uso de antimicrobiano, e espécies já foram isoladas de amostras de água de reservatório em hospitais (NARCISO-DA-ROCHA et al., 2014). Também, já foi relatado potencial antimicrobiano em espécies de *Novosphingobium* (DU; SINGH; YI, 2017, ELSAEED et al., 2023), o que pode inferir que a presença aumentada desse gênero pode influenciar na sua predominância ao diminuir a presença de outras bactérias.

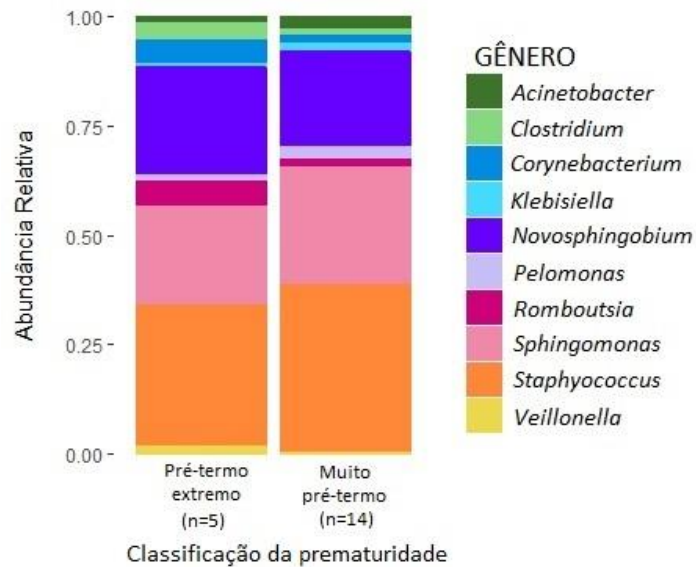
Em relação à diversidade, os resultados do presente estudo demonstram aumento no grupo que utilizou antimicrobiano, embora seja importante observar que o número amostral desse grupo é muito maior que o do grupo que não utilizou. Mesmo assim, se observa variados achados na literatura, desde um aumento da diversidade microbiana no leite com o uso de antimicrobianos em estudo com prematuros, como já mencionado anteriormente (ASBURY et al., 2020), como também uma diminuição na diversidade (HERMANSSON et al., 2019; LUNDGREN et al., 2019), e outro estudo que não demonstrou relação (MOOSSAVI et al., 2019).

As mães que fizeram uso de antimicrobiano sem ser pela profilaxia da cesárea correspondem às mesmas 8 mães que foram avaliadas na subseção acima, referente à presença de infecção perinatal. Da mesma forma, os 10 gêneros definidos como os mais abundantes quando as amostras foram agrupadas dessa forma correspondem aos mesmos gêneros que a divisão por presença ou não de infecção.

#### 4.3.5 Composição e diversidade bacteriana de LM por parâmetro clínico: classificação da prematuridade

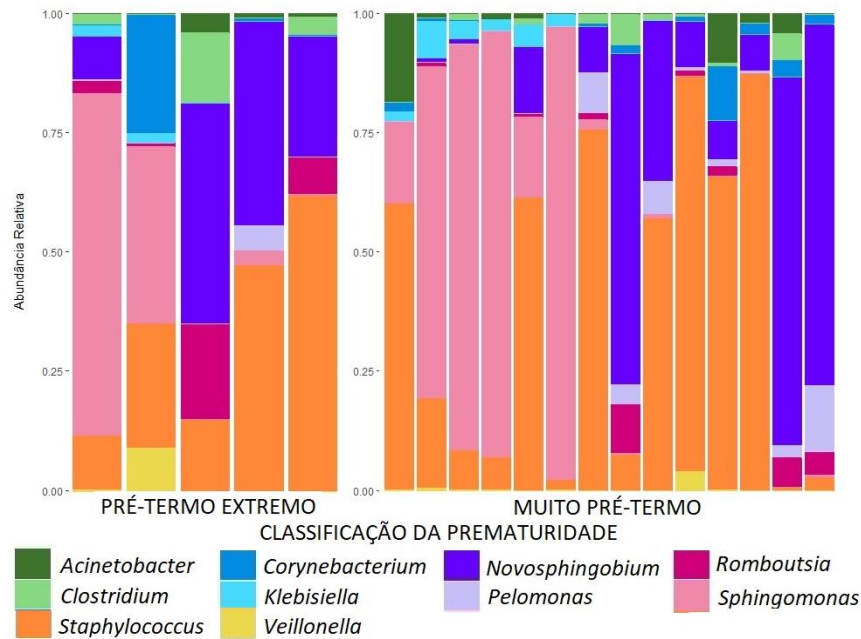
Como já comentado anteriormente, a prematuridade pode ser classificada em níveis. No estudo, foram incluídos nascimentos abaixo de 32 semanas de idade gestacional, ou seja, contempla somente as classificações extremo pré-termo (<28 semanas, aqui também chamado de EPT), e muito pré-termo (28 a <32 semanas, também VPT, de *very preterm*). Quando analisada a abundância relativa de gêneros, não são observadas diferenças significativas entre os dois grupos, também levando em consideração que são 14 mães que tiveram seus bebês no período que os classifica como muito pré-termos, e apenas 5 classificados como pré-termos extremos. A abundância relativa por amostra pode ser vista por grupo (Figura 32) e por amostra (Figura 33).

**Figura 32** - Abundância relativa de gêneros bacterianos por classificação da prematuridade.



Legenda: Grupos de leite LM divididos em grupos referentes à classificação de prematuridade, sendo a primeira coluna referente às mães que tiveram bebês considerados pré-termos extremos (n=5) e a segunda coluna as mães que tiveram bebês muito pré-termos (n=14), com a abundância relativa de gêneros bacterianos conforme a legenda de cores à direita.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

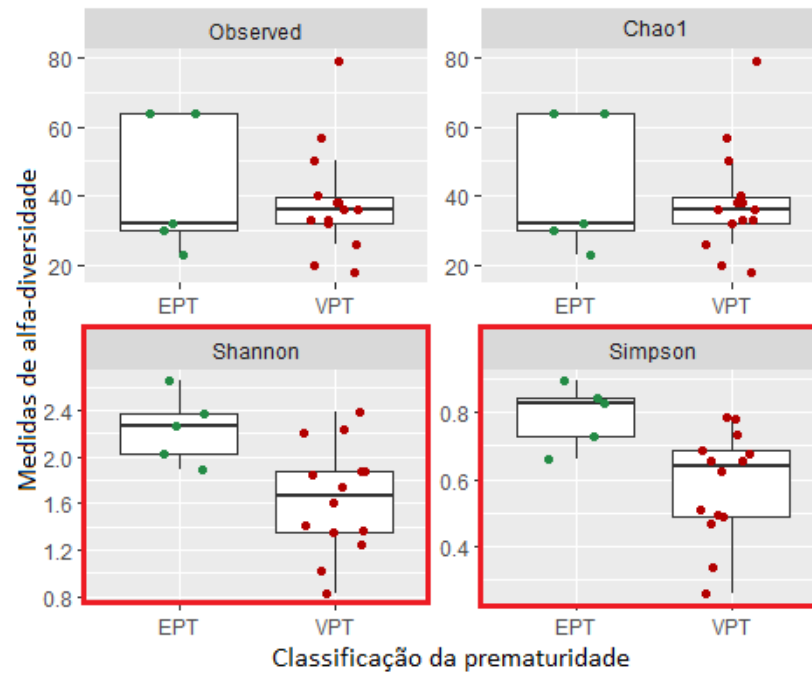
**Figura 33** - Abundância relativa de gênero por amostra, por classificação de prematuridade.

Legenda: Cada barra indica uma amostra, referentes aos leites LM dos grupos de classificação de prematuridade, sendo a primeira coluna referente às mães que tiveram bebês considerados pré-termos extremos (n=5) e a segunda coluna as mães que tiveram bebês muito pré-termos (n=14), com a abundância relativa de gêneros bacterianos conforme a legenda de cores abaixo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para esses grupos, também foi realizada análise de alfa e beta-diversidade. Para diversidade alfa (Figura 34), os testes estatísticos não demonstraram diferenças significativas nos índices *Observed* e *Chao1* ( $p=0,956$  para ambos), mas demonstraram diferença significativa em *Shannon* e *Simpson* ( $p=0,006$  e  $p=0,004$ , respectivamente), demonstrando agrupamento das amostras do mesmo grupo e similaridade de diversidade bacteriana em sua composição, que é diferente do outro grupo comparado. Uma limitação dessas análises é a diferença importante no número amostral dos dois grupos, uma vez que são 5 amostras versus 14 amostras. Os testes de similaridade de beta-diversidade não demonstraram diferenças significativas entre os grupos, sendo possível visualizar no gráfico ampla dispersão de amostras (Figura 35).

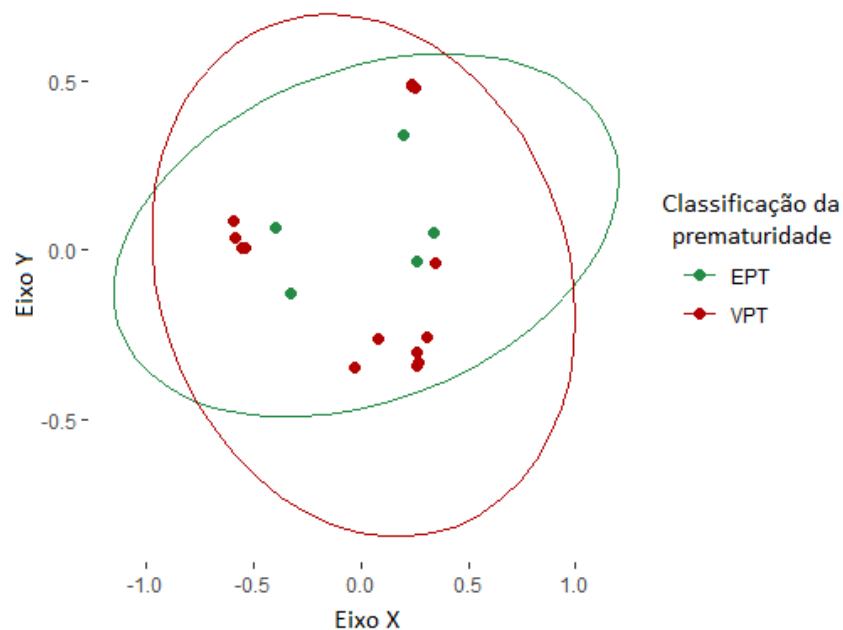
**Figura 34** - Medidas de alfa-diversidade para grupos de amostras por classificação de prematuridade.



Legenda: Distribuição das amostras pelos índices de diversidade *Observed*, *Chao1*, *Shannon* e *Simpson* para os leites das mães tiveram bebês pré-termos extremos (EPT, em verde) e que muito pré-termos (VPT, em vermelho). Foi observada diferença significativa nos índices *Shannon* ( $p=0,006$ ) e *Simpson* ( $0,004$ ). O mesmo não foi visto em *Observed* e *Chao1* ( $p=0,956$  para ambos).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

**Figura 35** – Gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) para amostras dos grupos de mães de bebês pré-termo extremos e muito pré-termos.



Legenda: Eixos X e Y indicam a variação de gêneros para as amostras para os leites das mães tiveram bebês pré-termos extremos (em verde) e que muito pré-termos (em vermelho). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos ( $p=0,5306$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A diferença entre a EPTs e VPTs em idade gestacional vai de menos de 28 semanas (a menor idade gestacional registrada é de 26 semanas) até 32 semanas. Apesar de existir uma diferença importante no número amostral, sendo somente 5 amostras EPT, se observa um aumento da proporção de *Staphylococcus* e *Sphingomonas* no leite com o aumento das semanas de gestação.

Na literatura, os estudos que demonstram alterações na composição da microbiota do leite conforme o tempo dizem respeito às semanas de lactação após o parto, e não à idade gestacional. Quando avaliado dessa forma, *Staphylococcus* se apresenta com aumento conforme as semanas de lactação (ASBURY et al., 2020, CABRERA-RUBIO et al., 2012). O contrário também já foi demonstrado, com uma diminuição da abundância desse gênero da semana 2 à 12 após o parto (BROWNE et al., 2019).

Não foram encontrados estudos que avaliaram especificamente a idade gestacional classificada dentro da prematuridade, mas sim o leite prematuro com o leite de mães à termo. Neste estudo, não foi analisado o leite de mães à termo, portanto não é possível fazer esse tipo de comparação.

## 5 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, com o presente estudo foi possível compreender sobre a composição e diversidade da microbiota do leite de mães doadoras de um dos principais BLHs do estado de Santa Catarina, bem como o de mães de RNPTs nascidos na Maternidade Carmela Dutra de Florianópolis/SC. Mais do que isso, foi possível avaliar o efeito na microbiota da personalização do leite de mães doadoras com o leite de mães de RNPTs. Os resultados demonstraram que cada mãe apresenta um perfil único de microbiota do leite, evidenciando a importância que esse processo de personalização do leite de doadora apresenta, como uma forma de oferecer em maior proporção as vantagens da microbiota benéfica da própria mãe para cada RN.

As amostras de LP, LM e LI não apresentaram diferenças estatísticas significativas nos índices de composição e diversidade, embora seja possível notar uma diferença qualitativa nesses parâmetros, indicando que o LI se assemelha ao LP com uma tendência a se aproximar do LM. Também, ao comparar cada amostra de LM com seu respectivo LI, nota-se que houve uma grande semelhança de composição em mais de 45% dos casos, sugerindo o sucesso do processo de personalização nessas amostras.

Além disso, ao comparar com os dados clínicos das mães participantes do estudo, foi possível estabelecer um perfil de microbiota do leite prematuro com base no tipo de parto, presença de infecção perinatal, uso de antimicrobiano e classificação de prematuridade. Destaca-se a avaliação de infecção, cujos resultados demonstraram diversidade significativamente maior nas amostras referentes à ausência de infecção perinatal, além da presença significativamente maior do gênero *Staphylococcus* nas amostras de mães de parto cesárea, quando feita avaliação por tipo de parto.

Do estudo geral, que inclui 40 mães, foram avaliadas as amostras de leite de 19 mães. Comparações mais amplas e com diferentes análises estatísticas poderão ser feitas quando analisado o número amostral total do estudo clínico, a ser realizado futuramente. Também, considera-se uma limitação do estudo a ausência de amostras de mães à termo para uma comparação entre esses grupos, que enriqueceria o trabalho.

Embora não tenha sido encontrada uma diferença estatística significativa entre os grupos de leite analisados, considerando a microbiota imatura do RNPT que vai receber esse



leite, uma diferença qualitativa na sua composição e diversidade de microbiota já possui potencial de impactar na sua modulação. Esse aspecto torna esse estudo de extrema importância no contexto de saúde pública, uma vez que o processo de personalização do leite foi realizado dentro do lactário da Maternidade Carmela Dutra pelas profissionais já atuantes, podendo futuramente ser implantado como método de melhoramento da qualidade do leite para bebês prematuros de forma rotineira.

Como perspectivas, os achados sugerem mais estudos com outros tempos de coleta de leite, de forma a acompanhar o período de amamentação dos bebês, bem como da análise de leite de mães à termo e o metaboloma dessas amostras. Também, a análise das fezes dos bebês amamentados juntamente com os parâmetros clínicos, com coletas em diferentes tempos, de forma a acompanhar o período de intervenção, se fazem necessárias para que seja possível determinar os alcances reais do processo de personalização do leite e intervenção realizada.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTON, M.; ROSA, V. M.; ISER, B. P. M. Prevalence and temporal trend of prematurity in Brazil before and during the COVID-19 pandemic: a historical time series analysis, 2011-2021. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 32, n. 2, 2023.
- ALEX, A.; BHANDARY, E.; MCGUIRE, K. P. Anatomy and physiology of the breast during pregnancy and lactation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1252, p. 3–7, 2020.
- ALTOBELLI, E. et al. The impact of human milk on necrotizing enterocolitis: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1–13, 2020.
- ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**. Elsevier, Ireland Ltd, 1 nov. 2015.
- ANSARI, A. et al. Molecular Mechanism of Microbiota Metabolites in Preterm Birth: Pathological and Therapeutic Insights. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8145, p. 1–20, 2021.
- ARSLANOGLU, S. et al. Recommendations for the establishment and operation of a donor human milk bank. **Nutrition Reviews**, v. 81, p. 1–28, 2023.
- ASBURY, M. R., BUTCHER, J., COPELAND, J. K., UNGER, S., BANDO, N., COMELLI, E. M., FORTE, V., KISS, A., LEMAY-NEDJELSKI, L., SHERMAN, P. M., STINTZI, A., TOMLINSON, C., WANG, P. W., O'CONNOR, D. L. Mothers of Preterm Infants Have Individualized Breast Milk Microbiota that Changes Temporally Based on Maternal Characteristics. **Cell Host Microbe**, v. 28, p. 669-682, 2020.
- ASNICAR, F. et al. Studying Vertical Microbiome Transmission from Mothers to Infants by Strain-Level Metagenomic Profiling. **mSystems**, v. 2, n. 1, 28 fev. 2017.
- AUER, L., MARIADASSOU, M., O'DONOHUE, M., KLOPP, C., HERNANDEZ-RAQUET, G. Analysis of large 16S rRNA Illumina data sets: Impact of singleton read filtering on microbial community description. **Mol Ecol Resour**, v. 17, n. 6, 2017.
- BADILLO-SUÁREZ, P. A.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M.; NIEVES-MORALES, X. Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, n. 330, p. 1–21, 2017.
- BALLARD, O.; MORROW, A. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatr Clin North Am**, v. 60, n. 1, p. 49–74, 2013.
- BEGHETTI, I. et al. Human milk's hidden gift: Implications of the milk microbiome for preterm infants' health. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 1–13, 2019.

- BEGHETTI, I. et al. A Pilot Study on Donor Human Milk Microbiota: A Comparison with Preterm Human Milk Microbiota and the Effect of Pasteurization. **Nutrients**, v. 14, n. 12, 1 jun. 2022.
- BELFORT, M. B.; INDER, T. E. Human Milk and Preterm Infant Brain Development: A Narrative Review. **Clinical Therapeutics**. Elsevier Inc., 1 abr. 2022.
- BERG, G., RYBAKOVA, D., FISCHER, D., CERNAVA, T., VERGÈS, M. C., CHARLES, T., CHEN, X., COCOLIN, L., EVERSOLE, K., CORRAL, G. H., KAZOU, M., KINKEL, L., LANGE, L., LIMA, N., LOY, A., MACKLIN, J. A. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 30, n. 8, 2020.
- BERTINO, E. Effect of a human milk bank on breast-feeding rate in very-low-birth-weight infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 61, n. 5, p. S12–S13, 2015.
- BLESA, M. et al. Early breast milk exposure modifies brain connectivity in preterm infants. **NeuroImage**, v. 184, p. 431–439, 2019.
- BLOSTEIN, F. et al. Vaginal microbiome diversity and preterm birth: results of a nested case e control study in Peru. **Annals of Epidemiology**, n. xxxx, 2019.
- BODE, L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, v. 22, n. 9, p. 1147–1162, 2012.
- BOND, D. M.; MORRIS, J. M.; NASSAR, N. Study protocol: Evaluation of the probiotic *Lactobacillus Fermentum* CECT5716 for the prevention of mastitis in breastfeeding women: A randomised controlled trial. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 17, n. 1, 19 maio 2017.
- BOYCE, C. et al. Preterm human milk composition: A systematic literature review. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 6, p. 1033–1045, 2016.
- BOYLE, A. K. et al. Preterm birth: Inflammation, fetal injury and treatment strategies. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 119, p. 62–66, 2017.
- BRAHM, P.; VALDES, V. Benefits of breastfeeding and risks associated with not breastfeeding. **Rev Chil Pediatr**, v. 88, n. 1, p. 15–21, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde - SAPS. **Mês da prematuridade: Ministério da Saúde defende separação zero entre pais e recém-nascidos**. Brasília: Ministério da Saúde, nov. 2021. [Online]. Disponível em: <<https://aps.saude.gov.br/noticia/14737>>. Acesso em 6 abr. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Manual para Bancos de Leite Humano**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. [Online]. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/manual-para-bancos-de-leite-humano.pdf/view>>. Acesso em 6 abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **rBLH Brasil - Rede Global de Bancos de Leite Humano**. Brasília: Ministério da Saúde, 14 jun. 2023. [Online]. Disponível em: <<https://rblh.fiocruz.br/pagina-inicial-rede-blh>>. Acesso em 3 abr. 2023.

BRENMOEHL, J. et al. Cytokines in milk and the role of TGF-beta. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 47–56, 2018.

BROWNE, P. D., APARICIO, M., ALBA, C., HECHLER, C., BEIJERS, R., RODRÍGUEZ, J. M., FERNÁNDEZ, L. and DE WEERTH, C. Human Milk Microbiome and Maternal Postnatal Psychosocial Distress. **Front. Microbiol.**, v. 10, 2019.

BRUNSER, O. Advances in the knowledge about human milk proteins. *Revista Chilena de Pediatría*. **Sociedad Chilena de Pediatría**, 1 mar. 2018.

BURIANOVA, I. et al. Maternal body mass index, parity and smoking are associated with human milk macronutrient content after preterm delivery. **Early Human Development**, v. 137, 1 out. 2019.

CABRERA-RUBIO, R. et al. Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 7, n. 1, p. 54–60, 2016.

CACHO, N. T. et al. Personalization of the microbiota of donor human milk with mother's own milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–12, 2017.

CARR, L. E. et al. Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. February, p. 1–17, 2021.

CARTER, K.; PAN, R.; MCRITCHIE, E. W. H. S. Metabolomics to reveal biomarkers and pathways of preterm birth: a systematic review and epidemiologic perspective. **Metabolomics**, 2019.

CEDERLUND, A. et al. Lactose in Human Breast Milk an Inducer of Innate Immunity with Implications for a Role in Intestinal Homeostasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

CEPHAS, K. D. et al. Comparative analysis of Salivary bacterial microbiome diversity in Edentulous infants and their mothers or primary care givers using pyrosequencing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

CERASANI, J. et al. Human milk feeding and preterm infants' growth and body composition: A literature review. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1–12, 2020.

CHEN, P. W., TSENG, S. Y., & HUANG, M. S. Antibiotic Susceptibility of Commensal Bacteria from Human Milk. **Current Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 113–119, 2016.

CHETTA, K. E.; SCHULZ, E. V; WAGNER, C. L. Outcomes improved with human milk intake in preterm and full-term infants. **Seminars in Perinatology**, v. 45, n. 2, p. 151384, 2021.

CHOI, Y. K. et al. Association of Maternal Diet With Zinc, Copper, and Iron Concentrations in Transitional Human Milk Produced by Korean Mothers. **Clinical Nutrition Research**, v. 5, n. 1, p. 15, 2016.

COBO, T.; KACEROVSKY, M.; JACOBSSON, B. Risk factors for spontaneous preterm delivery. **Int J Gynecol Obstet**, v. 150, n. April, p. 17–23, 2020.

COLAIZY, T. T. et al. Growth in VLBW infants fed predominantly fortified maternal and donor human milk diets: a retrospective cohort study. **BMC Pediatrics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

CORONA-CERVANTES, K., GARCÍA-GONZÁLEZ, I., VILLALOBOS-FLORES, L. E., QUIROZ, F., ESCOBEDO, A., VADILLO, C., CADILLO, M. N., & GARCÍA-MENA, J. Human milk microbiota associated with early colonization of the neonatal gut in Mexican newborns. **PeerJ**, v. 5, 2020.

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.

COTCH, M. F., HILLIER, S. L., GIBBS, R. S., ESCHENBACH, D. A. Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonisation during pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 178, 1998.

DAHABAN, N. M., ROMLI, M. F., ROSLAN, N. R., KONG, S. S. S., & CHEHA, F. C. Bacteria in expressed breastmilk from mothers of premature infants and maternal hygienic status. **Breastfeeding Medicine**, v. 8, n. 1, p. 422–423, 2013.

DEBIER, C.; LARONDELLE, Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 2, p. 153–174, fev. 2005.

DEMAZEAU, G. et al. A New High Hydrostatic Pressure Process to Assure the Microbial Safety of Human Milk While Preserving the Biological Activity of Its Main Components. **Frontiers in Public Health**, v. 6, n. November, p. 1–8, 2018.

DEMMELMAIR, H.; KOLETZKO, B. Lipids in human milk. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 57–68, 2018.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, 2006.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G. et al. Role of the microbiome in human development. **Gut**, v. 68, n. 6, p. 1108–1114, 2019.

DONOVAN, S. M. Human Milk Proteins: Composition and Physiological Significance. **Nestle Nutrition Institute Workshop Series**, v. 90, p. 93–101, 2019.

- DRAGO, L., TOSCANO, M., DE GRANDI, R., GROSSI, E., PADOVANI, E. M., & PERONI, D. G. Microbiota network and mathematic microbe mutualism in colostrum and mature milk collected in two different geographic areas: Italy versus Burundi. **ISME Journal**, v. 11, n. 4, p. 875–884, 2017.
- DROR, D. K.; ALLEN, L. H. Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: Current knowledge and possible mechanisms. **Nutrition Reviews**, 2008.
- DROR, D. K.; ALLEN, L. H. Vitamin D inadequacy in pregnancy: Biology, outcomes, and interventions. **Nutrition Review**, sBlackwell Publishing Inc., 2010.
- DROR, D. K.; ALLEN, L. H. Overview of nutrients in human milk. **Advances in Nutrition**, v. 9, p. 278S-294S, 2018.
- DU, J., SINGH, H e YI, T. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Novosphingobium* sp. THG-C3 and their antimicrobial potential. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 2, 2017.
- ELSAEED, E., ENANY, S., SOLYMAN, S., SHOHAYEB, M., HANORA, A. Mining *Chromodoris quadricolor* symbionts for biosynthesis of novel secondary metabolites. **Mar Genomics**, v. 68, 2023.
- ELSHENAWY, S. et al. The Metabolomic Signature of the Placenta in Spontaneous Preterm Birth. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 1–20, 2020.
- ERIKSEN, K. G. et al. Human milk composition and infant growth. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 21, n. 3, p. 200–206, 2018.
- ESCUDEUR-VIECO, D. et al. High-temperature short-time pasteurization system for donor milk in a human milk bank setting. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, 11 maio 2018.
- FERNÁNDEZ, L. et al. Probiotics for human lactational mastitis. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 2, p. 169–183, 2014.
- FERNÁNDEZ, L. et al. Strategies for the preservation, restoration and modulation of the human milk microbiota. Implications for human milk banks and neonatal intensive care units. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 1–13, 2018.
- FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J. M. Human Milk Microbiota: Origin and Potential Uses. **Nestle Nutrition Institute Workshop Series**, v. 94, p. 75–85, 2020.
- FERRERO, D. M. et al. Cross-Country individual participant analysis of 4.1 million singleton births in 5 countries with very high human development index confirms known associations but provides no biologic explanation for 2/3 of all preterm births. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 1 set. 2016.
- FEWTRELL, M. S., KENNEDY, K., AHLUWALIA, J. S., NICHOLL, R., LUCAS, A., & BURTON, P. Predictors of expressed breast milk volume in mothers expressing milk for

their preterm infant. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, v. 101, n. 6, 2016.

FILIPPO, P. DI et al. Lifelong Lung Sequelae of Prematurity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 5273, p. 1–16, 2022.

FORNO, E., ONDERDONK, A. B., MCCRACKEN, J., LITONJUA, A. A., LASKEY, D., DELANEY, M. L., DUBOIS, A. M., GOLD, D. R., RYAN, L. M., WEISS, S. T., CELEDÓN, J. C. Diversity of the gut microbiota and eczema in early life. **Clin Mol Allergy**, v. 6, n. 11, 2008.

FORTMANN, I. et al. Lactobacillus Acidophilus/Bifidobacterium Infantis Probiotics Are Beneficial to Extremely Low Gestational Age Infants Fed Human Milk Ingmar. **Nutrients**, v. 5954, n. 1, p. 1–13, 2020.

FREY, H.; KLEBANOFF, M. The epidemiology, etiology, and costs of preterm birth. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, 2016.

GARCÍA-GONZÁLEZ, I. et al. The Influence of Holder Pasteurization on the Diversity of the Human Milk Bacterial Microbiota Using High-Throughput DNA Sequencing. **Journal of Human Lactation**, v. 38, n. 1, p. 118–130, 2022.

GAROFALO, R. Cytokines in Human Milk. **Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 2 SUPPL., p. S36–S40, 2010.

GATES, A. et al. Review of Preterm Human-Milk Nutrient Composition. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 36, n. 6, p. 1163–1172, 2021.

GIDREWICZ, D. A.; FENTON, T. R. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. **BMC Pediatrics**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2014.

GILMAN-SACHS, A. et al. Inflammation induced preterm labor and birth. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 129, p. 53–58, 2018.

GOERTZ, S., DE MENEZES, A. B., BIRTLES, R. J., FENN, J., LOWE, A. E., MACCOLL, A. D. C., POULIN, B., YOUNG, S., BRADLEY, J. E., & TAYLOR, C. H. Geographical location influences the composition of the gut microbiota in wild house mice (*Mus musculus domesticus*) at a fine spatial scale. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, 2019.

GÓMEZ, M., VALVERDE, A., DEL CAMPO, R., RODRÍGUEZ, J. M., MALDONADO-BARRAGÁN, A. Phenotypic and Molecular Characterization of Commensal, Community-Acquired and Nosocomial *Klebsiella* spp. **Microorganisms**, v. 12, n. 9, 2021.

GOMEZ-GALLEGO, C. et al. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 21, n. 6, p. 400–405, 2016.

GOMEZ-LOPEZ, N. et al. The Immunobiology of Preterm Labor and Birth: Intra-Amniotic Inflammation or Breakdown of Maternal-Fetal Homeostasis. **Reproduction**, v. 164, n. 2, 2022.

- GREGORY, K. E. et al. Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 68, 2016.
- GUERRA, A. F. et al. Hot topic: Holder pasteurization of human milk affects some bioactive proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2814–2818, 2018.
- GUPTA, P.; SINGH, M. P.; GOYAL, K. Diversity of Vaginal Microbiome in Pregnancy: Deciphering the Obscurity. **Frontiers in Public Health**, v. 8, n. July, p. 1–12, 2020.
- HAIDEN, N.; ZIEGLER, E. E. Human Milk Banking. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 69, n. 2, p. 8–15, 2017.
- HARRISON, M. S.; GOLDENBERG, R. L. Global burden of prematurity. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, p. 6–11, 2015.
- HEIKKLA, M. P., SARIS, P. E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **J Appl Microbiol**, v. 95, n. 3, p. 471–478, 2003.
- HSU, Y. C. et al. Changes in preterm breast milk nutrient content in the first month. **Pediatrics and Neonatology**, v. 55, n. 6, p. 449–454, 1 dez. 2014.
- HUMBERG, A. et al. Preterm birth and sustained inflammation: consequences for the neonate. **Seminars in Immunopathology**, v. 42, n. 451, p. 451–468, 2020.
- 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. 1–8, 2011.
- IMADE, P. E., IZEKOR, P. E., EGHAFFONA, N. O., EBABULELE, O. I., OPHORI, E. Asymptomatic bacteriuria among pregnant women. **N Am J Med Sci**, v. 2, n. 6, 2010.
- INNIS, S. M. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 3, 1 mar. 2014.
- JEURINK, P. V. et al. Human milk: A source of more life than we imagine. **Beneficial Microbes**, v. 4, n. 1, p. 17–30, 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, 21 ago. 2015.
- JOISHY, T. K.; DEHINGIA, M.; KHAN, M. R. Bacterial diversity and metabolite profiles of curd prepared by natural fermentation of raw milk and back sloping of boiled milk. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 1–12, 2019.
- JOST, T. et al. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 7, p. 1253–1262, 2013.
- JOST, T. et al. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2891–2904, 2014.



- KAKU, N., MATSUMOTO, N., SASAKI, D., TSUDA, K., KOSAI, K., UNO, N., MORINAGA, Y., TAGAMI, A., ADACHI, S., HASEGAWA, H., OSAKI, M., YANAGIHARA, K. Effect of probiotics on gut microbiome in patients with administration of surgical antibiotic prophylaxis: A randomized controlled study. **J Infect Chemother**, v. 26, n. 8, p. 795-801, 2020.
- KEISER, A. M. et al. Risks of preterm birth among non - Hispanic black and non - Hispanic white women: Effect modification by maternal age. **Pediatric and Perinatal Epidemiology**, n. July, p. 1–11, 2019.
- KIELBASA, A.; GADZALA-KOPCIUCH, R.; BUSZEWSKI, B. Cytokines-biogenesis and their role in human breast milk and determination. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, 2021.
- KIM, B. R. et al. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2089–2093, 2017.
- KOLETZKO, B.; POINDEXTER, B.; UAUY, R. Recommended nutrient intake levels for stable, fully enterally fed very low birth weight infants. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 110, p. 297–299, 2014.
- KORDY, K. et al. Contributions to human breast milk microbiome and enteromammary transfer of *Bifidobacterium breve*. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, 1 jan. 2020.
- KUMAR, H., DU TOIT, E., KULKARNI, A., AAKKO, J., LINDERBORG, K. M., ZHANG, Y., NICOL, M. P., ISOLAURI, E., YANG, B., COLLADO, M. C. and SALMINEN, S. Distinct Patterns in Human Milk Microbiota and Fatty Acid Profiles Across Specific Geographic Locations. **Front. Microbiol**, v. 7, 2016.
- LARSON-MEYER, D. E. et al. Appetite-Regulating Hormones in Human Milk: A Plausible Biological Factor for Obesity Risk Reduction? **Journal of Human Lactation**, v. 37, n. 3, p. 603–614, 2021.
- LATUGA, M. S.; STUEBE, A.; SEED, P. C. A review of the source and function of microbiota in breast milk. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 32, n. 1, p. 68–73, 2014.
- LAXMI, U., AGRAWAL, S., RAGHUNANDAN, C., RANDHAWA, V. S., SAILI, A. Association of bacterial vaginosis with adverse fetomaternal outcome in women with spontaneous preterm labor: a prospective cohort study. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 25, 2012.
- LE DOARE, K. LE et al. Mother's Milk: A purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, 2018.
- LING, Z., LI, Z., LIU, X., CHENG, Y., LUO, Y., TONG, X., YUAN, L., WANG, Y., SUN, J., LI, L., XIANG, C. Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. **Appl Environ Microbiol**, v. 80, n. 8, 2014.

- LIU, C. et al. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. **Advanced Science**, v. 8, n. 15, 2021.
- LIZEWSKA, B. et al. Maternal Plasma Metabolomic Profiles in Spontaneous Preterm Birth: Preliminary Results. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.
- LÖNNERDAL, B. et al. Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 41, p. 1–11, 2017.
- LOPEZ LEYVA, L.; BRERETON, N. J. B.; KOSKI, K. G. Emerging frontiers in human milk microbiome research and suggested primers for 16S rRNA gene analysis. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 121–133, 2021.
- LYONS, K. E. et al. Effect of storage, temperature, and extraction kit on the phylogenetic composition detected in the human milk microbiota. **Microbiology Open**, v. 10, n. 1, p. 1–18, 2021.
- MAIDAK, B. L. et al. The Ribosomal Database Project (RDP). **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 1, p. 82–85, 1996.
- MARTÍN, R. et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **Journal of Pediatrics**, v. 143, n. 6, p. 754–758, 2003.
- MARTINI, M.; SALARI, F.; ALTOMONTE, I. The macrostructure of milk lipids: the fat globules. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2013.
- MCGHEE, D. E.; STEELE, J. R. Breast biomechanics: What do we really know? **Physiology**, v. 35, n. 2, p. 144–156, 2020.
- MEIER, P. P. et al. Evidence-Based Methods That Promote Human Milk Feeding of Preterm Infants: An Expert Review. **Clinics in Perinatology**, 1 mar. 2017.
- MEISTER, A. L.; DOHENY, K. K.; TRAVAGLI, R. A. Necrotizing enterocolitis: It's not all in the gut. **Experimental Biology and Medicine**, SAGE Publications Inc., 1 jan. 2020.
- MILANI, C. et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 4, 2017.
- MOLTU, S. J. et al. Enhanced feeding in very-low-birth-weight infants may cause electrolyte disturbances and septicemia - A randomized, controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 207–212, abr. 2013.
- MOREIRA, R.; MAGALHÃES, L.; ALVES, C. Effect of preterm birth on motor development, behavior, and school performance of school-age children: a systematic review. **Jornal de Pediatria**, v. 90, n. 2, p. 119–134, 2013.

- MORO, G. E. et al. Processing of Donor Human Milk: Update and Recommendations From the European Milk Bank Association (EMBA). **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, n. February, p. 1–10, 2019.
- MOOSSAVI, S., SEPEHRI, S., ROBERTSON, B., BODE, L., GORUK, S., FIELD, C. J., LIX, L. M., de SOUZA, R. J., BECKER, A. B., MANDHANE, P. J., TURVEY, S. E., SUBBARAO, P., MORAES, T. J., LEFEBVRE, D. L., SEARS, M. R., KHAFIPOUR, E., & AZAD, M. B. Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. **Cell Host and Microbe**, v. 25, n. 2, p. 324-335, 2019.
- MURPHY, K., CURLEY, D., O'CALLAGHAN, T. F., O'SHEA, C. A., DEMPSEY, E. M., O'TOOLE, P. W., ROSS, R. P., RYAN, C. A., & STANTON, C. The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. **Scientific Reports**, v.7, p. 1-10, 2016.
- NARCISO-DA-ROCHA, C., MOREIRA, I. e MANAIA, C. Genotypic diversity and antibiotic resistance in *Sphingomonadaceae* isolated from hospital tap water. **Sci. of Tot. Environ.**, v. 466, p. 127-135, 2014.
- NOTO A, FANOS V, DESSÌ A. Metabolomics in Newborns. **Adv Clin Chem**, v. 74, p. 36-71, 2016.
- OPAS/OMS. Organização Pan-Americana de Saúde e Organização Mundial de Saúde. **Aleitamento materno nos primeiros anos de vida salvaria mais de 820 mil crianças menores de cinco anos em todo o mundo**. OPAS, 2018. [Online]. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/1-8-2018-aleitamento-materno-nos-primeiros-anos-vida-salvaria-mais-820-mil-criancas>>. Acesso em: 23 mar. 2023.
- OMS. Organização Mundial de Saúde. **Amamentação**. OMS, 2019. [Online]. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab_1)>. Acesso em: 23 mar. 2023.
- ORCHNIK, L. et al. Cognitive Outcomes for Extremely Preterm/Extremely Low Birth Weight Children in Kindergarten. **J Int Neuropsychol Soc**, v. 17, n. 6, p. 1067–1069, 2011.
- 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. 647–654, 2017.
- PARK, S. et al. Cervicovaginal fluid cytokines as predictive markers of preterm birth in symptomatic women. **Obstetrics & Gynecology Science**, v. 63, n. 4, p. 455–463, 2020.
- PARKER, L. A., SULLIVAN, S., KRUEGER, C., KELECHI, T., & MUELLER, M. Effect of early breast milk expression on milk volume and timing of lactogenesis stage II among mothers of very low birth weight infants: A pilot study. **Journal of Perinatology**, v. 32, n. 3, p. 205–209, 2012.
- PARKS, D. H. et al. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 2014.

- PARKS, D. H. et al. GTDB: An ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D785–D794, 2022.
- PARRA-LLORCA, A. et al. Preterm gut microbiome depending on feeding type: Significance of donor human milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–10, 2018.
- PATEL, R. M. Short and Long-Term Outcomes for Extremely Preterm Infants. **Am J Perinatol**, v. 33, n. 3, p. 318–328, fev. 2016.
- PATEL, S. H., VAIDYA, Y. H., PATEL, R. J., PANDIT, R. J., JOSHI, C. G., & KUNJADYIA, A. P. Culture independent assessment of human milk microbial community in lactational mastitis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- PEILA, C. et al. The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: A review. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 1–19, 2016.
- PENG, C., CHANG, P. J., LIN, H. Y., CHENG, P. e SU, B. H. Intrauterine inflammation, infection, or both (Triple I): A new concept for chorioamnionitis. **Pediatrics and Neonatology**, n. 59, p. 231-237, 2018.
- PLATT, M. J. Outcomes in preterm infants. **Public Health**, v. 128, p. 399–403, 2014.
- PRENTICE, P. et al. Breast milk nutrient content and infancy growth. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 105, n. 6, p. 641–647, 2016.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.
- QUIGLEY, M.; MCGUIRE, W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 4, 2014.
- REDEUIL, K. et al. Vitamins and carotenoids in human milk delivering preterm and term infants: Implications for preterm nutrient requirements and human milk fortification strategies. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 222–228, 1 jan. 2021.
- REISENBICHLER, E.; HANLEY, K. Z. Developmental disorders and malformations of the breast. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 11–15, 2019.
- RODRÍGUEZ-CRUZ, M. et al. Effect of sample collection (Manual expression vs. pumping) and skimming on the microbial profile of human milk using culture techniques and metataxonomic analysis. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–19, 2020.
- ROLLAND-CACHERA, M. F. et al. Association of nutrition in early life with body fat and serum leptin at adult age. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 8, p. 1116–1122, ago. 2013.
- ROMERO, R.; DEY, S. K.; FISHER, S. J. Preterm labor: One syndrome, many causes. **Science**, v. 345, n. 6198, 2014.

- SAKWINSKA, O., MOINE, D., DELLEY, M., COMBREMONT, S., REZZONICO, E., DESCOMBES, P., VINYES-PARES, G., ZHANG, Y., WANG, P., & THAKKAR, S. K. Microbiota in breast milk of Chinese lactating mothers. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016.
- SCHWAB, C., VONEY, E., RAMIREZ-GARCIA, A., VISCHER, M., & LACROIX, C. Characterization of the Cultivable Microbiota in Fresh and Stored Mature Human Breast Milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- SIMPSON, M. R., AVERSHINA, E., STORRO, O., JOHNSEN, R., RUDI, K., & OIEN, T. Breastfeeding-associated microbiota in human milk following supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* La-5, and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 2, p. 889–899, 2018.
- SOUZA, R. T. et al. Use of metabolomics for predicting spontaneous preterm birth in asymptomatic pregnant women: protocol for a systematic review and meta-analysis. **BJM Open**, p. 1–5, 2019.
- STEVENSON, D. K. et al. The contributions of genetics to premature birth. **Pediatric Research**, v. 85, n. 4, p. 416–417, 2019.
- STOUT, M. et al. Early pregnancy vaginal microbiome trends and preterm birth. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 2017.
- SWAMINATHAN, S.; THOMAS, T.; KURPAD, A. V. B-vitamin interventions for women and children in low-income populations. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 2015.
- TABATABAEI, N. et al. Vaginal microbiome in early pregnancy and subsequent risk of spontaneous preterm birth: a case-control study. **International Journal of Obstetrics and Gynecology**, 2019.
- TANAKA, M.; NAKAMAYA, J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. **Allergology International**, v. 66, n. 4, p. 515–522, 2017.
- THURL, S. et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 9, p. 1261–1271, 2010.
- TOBIN, N. H., WOODWARD, C., ZABIH, S., LEE, D. J., LI, F., ALDROVANDI, G. M. A Method for Targeted 16S Sequencing of Human Milk Samples. **J. Vis. Exp.** v. 133, 2018.
- TOGO, A. et al. Repertoire of human breast and milk microbiota: A systematic review. **Future Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 623–641, 2019.
- TOTADHRI, M., LAKSHMANAN, A., SARASWATCHY, M. P., MANE, M. S. Asymptomatic bacteriuria of pregnant women in a tertiary care centre. **J Educ Health Promot**, v. 11, 2022.
- TRAVEN, P., MAHNIC, A., RUPNIK, M., GOLOB, M., PIRS, T., MATIJASIC, B. B. and LORBEG, P. M. Evaluation of Human Milk Microbiota by 16S rRNA Gene Next-

Generation Sequencing (NGS) and Cultivation/MALDI-TOF Mass Spectrometry Identification. **Front. Microbiol.** v. 10, 2019.

TSONIS, O. et al. Female genital tract microbiota affecting the risk of preterm birth: What do we know so far? A review. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 245, p. 168–173, 2020.

TUOMINEM, H., RAUTAVA, S., COLLADO, M. C., SYRJANEN, S., & RAUTAVA, J. HPV infection and bacterial microbiota in breast milk and infant oral mucosa. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 2018.

URBANIAK, C. et al. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. **Microbiome**, v. 4, p. 1–9, 2016.

VICTORA, C. G. et al. Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **The Lancet**, 30 jan. 2016.

WALANI, S. R. Global burden of preterm birth. **Int J Gynecol Obstet**, v. 150, n. March, p. 31–33, 2020.

WARD, T. L., HOSID, S., IOSHIKHES, I., & ALTOSAAR, I. (2013). Human milk metagenome: A functional capacity analysis. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, 2013.

WOLLENBERG, M. S., CLAESEN, J., ESCAPA, I. F., ALDRIDGE, K. L., FISCHBAG, M. A., LEMON, K. P. Propionibacterium-produced Coproporphyrin III induces Staphylococcus Aureus aggregation and biofilm formation. **MBio**, v. 5, 2014.

YANG, T. et al. Breast milk macronutrient composition and the associated factors in urban Chinese mothers. **Chinese Medical Journal**, v. 127, n. 9, p. 1721–1725, 2014.

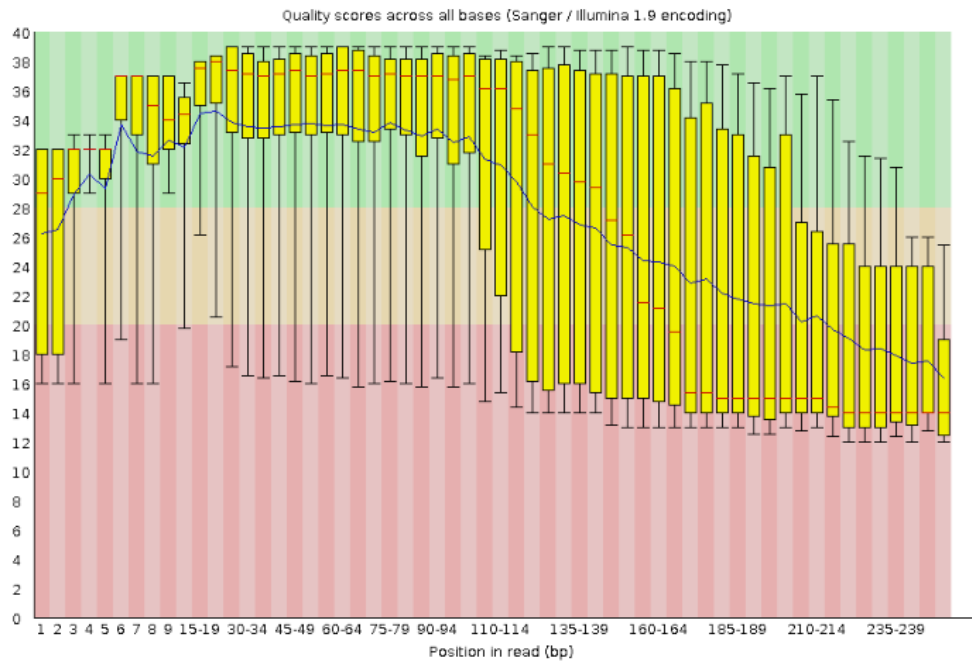
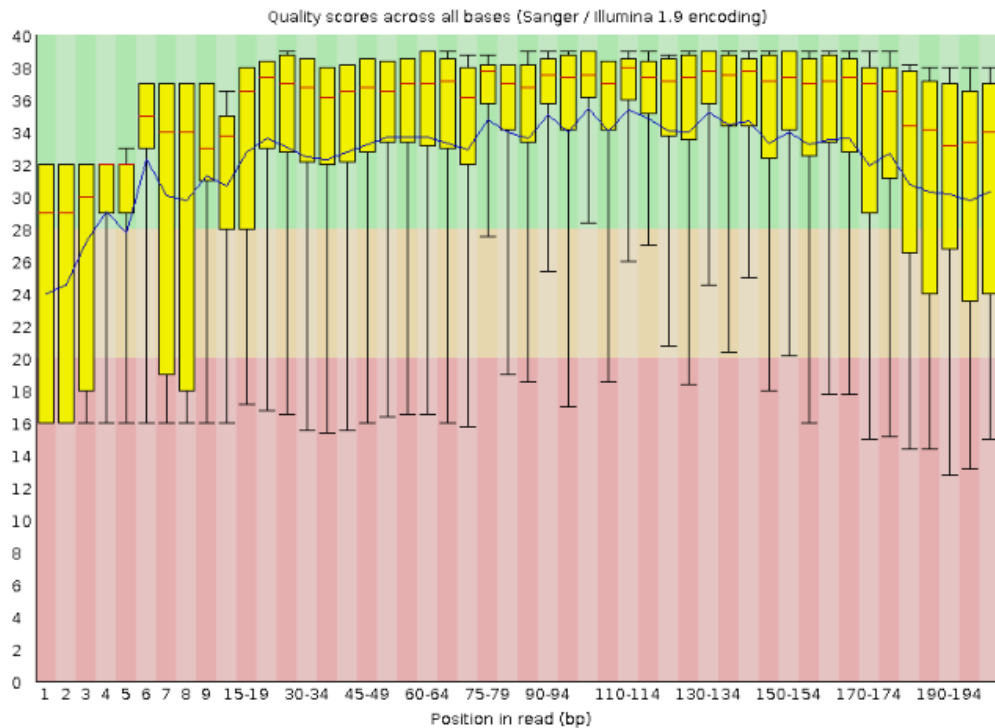
YOU, Y. et al. Blood Microbial Communities During Pregnancy Are Associated With Preterm Birth. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. June, p. 1–8, 2019.

ZHU, J.; DINGESS, K. A. The functional power of the human milk proteome. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1–27, 2019.

ZIMMERMANN, P.; CURTIS, N. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. 17–47, 2020.

ŽIVKOVIĆ, J. et al. Antioxidants and antioxidant capacity of human milk. **Acta Facultatis Medicae Naissensis**, 2015.

ZOU, L.; PANDE, G.; AKOH, C. C. Infant Formula Fat Analogs and Human Milk Fat: New Focus on Infant Developmental Needs. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, p. 139–165, 28 fev. 2016.

**APÊNDICE 1 - Exemplo do efeito das filtragens na qualidade do sequenciamento.****Amostra L14 - Antes das filtragens.****✖ Per base sequence quality****Amostra L14 - Depois das filtragens.****✔ Per base sequence quality**

**APÊNDICE 2 - Gêneros bacterianos por interseção dos grupos de leite**

<b>FIGURA 9</b>		
<b>Grupos</b>	<b>Número de gêneros</b>	<b>Gêneros</b>
LI - LM - LP	94	<i>Slackia Streptococcus Pseudoflavonifractor Brevundimonas Lawsonella Roseomonas Micrococcus Dactylosporangium Flintibacter Raoultella Pseudomonas Phocaeicola Romboutsia Methanobrevibacter Corynebacterium Mycobacterium Staphylococcus Sphingobacterium Acinetobacter Burkholderia Brachybacterium Enterococcus Enhydrobacter Delftia Clostridium sensu stricto Agathobaculum Finegoldia Pseudoxanthomonas Anaerostipes Neglecta Flavonifractor Agrobacterium Cutibacterium Halomonas Schaalia Stenotrophomonas Brevibacterium Dietzia Pseudodescherichia Haemophilus Fusobacterium Bradyrhizobium Aerococcus Massilia Bacillus Collinsella Blautia Subdoligranulum Proteus Bifidobacterium Anaerococcus Clostridioides Streptophyta Azospirillum Chryseobacterium Novosphingobium Rhodopseudomonas Sphingomonas Phascolarctobacterium Wautersiella Veillonella Salmonella Rothia Streptomyces Anaerobiospirillum Gemella Methylobacterium Dysosmobacter Turicibacter Kluyvera Pelomonas Herbaspirillum Leclercia Serratia Latilactobacillus Kocuria Prevotella Bacteroides Intestinimonas Paracoccus Ruminococcus Faecalibacterium Aeromonas Ligilactobacillus Limosilactobacillus Achromobacter Salinicoccus Kineothrix Enterobacter Klebsiella Enterocloster Pantoea Lactobacillus</i>
LI - LM	17	<i>Thiothrix Dermacoccus Lelliottia Pedococcus Modestobacter Agathobacter Treponema Aggregatibacter Lautropia Citrobacter</i>



		<i>Cronobacter Jeotgalicoccus Peptoniphilus Campylobacter Faecalimonas Cedecea Cloacibacterium</i>
LM - LP	13	<i>Ralstonia Kurthia Actinoallomurus Microvirga Curvibacter Anaerotignum Actinomyces Hymenobacter Neisseria Roseburia Megasphaera Anaerotruncus Brucella</i>
LI - LP	25	<i>Negativibacillus Rouxiella Enteractinococcus Selenomonas Fournierella Hungatella Chishuiella Comamonas Mediterraneibacter Duganella Cupriavidus Rahnella Dolosigranulum Flavobacterium Peptacetobacter Terrisporobacter Phytobacter Dyella Actinoplanes Gemmiger Nocardioides Amylibacter Merdimonas Mitsuokella Mucilaginibacter</i>
LM	32	<i>Escherichia/Shigella Facklamia Altererythrobacter Frankia Alloiococcus Murimonas Mesorhizobium Muricauda Jatrophihabitans Winkia Methylobacterium Intestinibacter Dialister Virgibacillus Erysipelatoclostridium Skermanella Eubacterium Actinomycetospora Alcanivorax Aeromicrobium Thermomonospora Falsirhodobacter Parabacteroides Allospingosinicella Diaphorobacter Rhodanobacter Alistipes Mitsuraria Devosia Leptotrichia Archangium Rheinheimera</i>
LI	48	<i>Anaerobutyricum Vulcaniibacterium Reyranella Aridibacter Flavitalea Micromonospora Daejeonella Providencia Ruania Quadrisphaera Yersinia Sphingobium Lysobacter Trabulsiella Pseudoduganella Absicoccus Qipengyuania Labeledella Candidatus Solibacter Megamonas Cytobacillus Faecalibacillus Caulobacter Fusicatenibacter Negativicoccus Gulosibacter Allobaculum Coprobacter Clostridium IV Schwartzia Granulicatella Gordonibacter Nubsella Pelobacter Luteibacter Peptostreptococcus Occallatibacter Rhodococcus Rhizobium Castellaniella</i>

		<i>Weissella Neorhizobium Nosocomiicoccus Lactococcus Alishewanella Parasutterella Porphyromonas Paraburkholderia</i>
LP	27	<i>Kosakonia Intrasporangium Yokenella Terrabacter Lysinibacillus Atlantibacter Lentzea Frisingicoccus Georgenia Tepidimonas Paenibacillus Lancefieldella Pseudoglutamicibacter Acidihalobacter Butyricicoccus Aliicoccus Siccibacter Ensifer Gleimia Chromohalobacter Mixta Lachnospira Paenarthrobacter Ewingella Hyphomicrobium Catenulispora Desulfovibrio</i>

FIGURA 10

Grupos	Número de gêneros	Gêneros
LI - LM	110	<i>Slackia Streptococcus Pseudoflavonifractor Brevundimonas Lawsonella Roseomonas Micrococcus Thiothrix Dactylosporangium Flintibacter Dermacoccus Raoultella Pseudomonas Phocaeicola Romboutsia Lelliottia Pedococcus Methanobrevibacter Modestobacter Corynebacterium Mycobacterium Staphylococcus Sphingobacterium Acinetobacter Burkholderia Brachybacterium Enterococcus Enhydrobacter Delftia Agathobacter Clostridium sensu stricto Agathobaculum Treponema Finegoldia Aggregatibacter Pseudoxanthomonas Anaerostipes Lautropia Neglecta Flavonifractor Agrobacterium Cutibacterium Halomonas Schaalia Stenotrophomonas Brevibacterium Dietzia Pseudeschierichia Haemophilus Fusobacterium Bradyrhizobium Aerococcus Massilia Bacillus Collinsella Citrobacter Blautia Subdoligranulum Proteus Bifidobacterium Anaerococcus Clostridioides Streptophyta Azospirillum Cronobacter Chryseobacterium</i>

		<p> <i>Novosphingobium Rhodopseudomonas</i>  <i>Sphingomonas Phascolarctobacterium</i>  <i>Wautersiella Veillonella Salmonella Rothia</i>  <i>Streptomyces Anaerobiospirillum Gemella</i>  <i>Methylobacterium Dysosmobacter</i>  <i>Turicibacter Kluyvera Jeotgalicoccus</i>  <i>Pelomonas Herbaspirillum Leclercia</i>  <i>Serratia Peptoniphilus Latilactobacillus</i>  <i>Campylobacter Kocuria Prevotella</i>  <i>Bacteroides Intestinimonas Paracoccus</i>  <i>Ruminococcus Faecalimonas</i>  <i>Faecalibacterium Aeromonas</i>  <i>Ligilactobacillus Limosilactobacillus</i>  <i>Achromobacter Salinicoccus Cedecea</i>  <i>Kineothrix Enterobacter Klebsiella</i>  <i>Enterocloster Cloacibacterium Pantoea</i>  <i>Lactobacillus</i> </p>
LM	45	<p> <i>Escherichia/Shigella Faeklamia</i>  <i>Altererythrobacter Frankia Ralstonia</i>  <i>Alloiococcus Murimonas Mesorhizobium</i>  <i>Muricauda Jatrophihabitans Winkia Kurthia</i>  <i>Methylorubrum Intestinibacter</i>  <i>Actinoallomurus Dialister Virgibacillus</i>  <i>Erysipelatoclostridium Microvirga</i>  <i>Curvibacter Skermanella Eubacterium</i>  <i>Actinomycespora Anaerotignum</i>  <i>Alcanivorax Aeromicrobium Actinomyces</i>  <i>Thermomonospora Hymenobacter Neisseria</i>  <i>Falsirhodobacter Roseburia Megasphaera</i>  <i>Parabacteroides Allosphingosinicella</i>  <i>Diaphorobacter Anaerotruncus</i>  <i>Rhodanobacter Alistipes Mitsuarua Devosia</i>  <i>Leptotrichia Brucella Archangium</i>  <i>Rheinheimera</i> </p>
LI	73	<p> <i>Negativibacillus Anaerobutyricum</i>  <i>Vulcaniibacterium Reyranella Rouxiella</i>  <i>Aridibacter Flavitalea Enteractinococcus</i>  <i>Selenomonas Fournierella Micromonospora</i>  <i>Daejeonella Providencia Ruania</i>  <i>Quadrisphaera Yersinia Sphingobium</i>  <i>Lysobacter Trabulsiella Pseudoduganella</i>  <i>Absicoccus Qipengyuania Hungatella</i>  <i>Chishuiella Labedella Candidatus Solibacter</i>  <i>Comamonas Mediterraneibacter Duganella</i> </p>

		<i>Megamonas Cytobacillus Faecalibacillus Caulobacter Cupriavidus Fusicatenibacter Rahnella Dolosigranulum Negativicoccus Gulosibacter Flavobacterium Peptacetobacter Terrisporobacter Phytobacter Allobaculum Coprobacter Clostridium IV Dyella Schwartzia Actinoplanes Granulicatella Gordonibacter Nubsella Pelobacter Luteibacter Gemmiger Peptostreptococcus Nocardioides Occallatibacter Rhodococcus Rhizobium Castellaniella Amylibacter Weissella Neorhizobium Nosocomiicoccus Merdimonas Lactococcus Mitsuokella Alishewanella Parasutterella Porphyromonas Paraburkholderia Mucilaginibacter</i>
--	--	--

**ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do ensaio clínico.**

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Maria Marlene de Souza Pires, PhD

Página 1 de 8



**UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE SANTA CATARINA**  
Centro de Ciências da Saúde - CCS

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Informações às Mães do Grupo Pré-termo**

**Título:** CAUSAS E EFEITOS DE MICROBIOTAS DA MÃE NO NASCIMENTO E SOBREVIDA DE RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMOS: ESTRATÉGIAS DE PROMOÇÃO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL

**Pesquisadora:** Dra. Maria Marlene de Souza Pires  
Endereço: Rua Dom Joaquim, 827, Centro, Apto 501, Florianópolis,  
Santa Catarina, CEP 88015310  
Telefone: (48) 3223-5151  
E-mail: mmspires@gmail.com

Dra. Thaise Cristina Brancher Soncini  
Endereço: Rua Padre Clemente 63 - Centro, Florianópolis - SC, CEP  
88015-350 - -  
Telefone: (48) 99987-3810  
E-mail: thaisesoncini@gmail.com

**Introdução**

Você está sendo convidada para participar de um estudo intitulado "CAUSAS E EFEITOS DE MICROBIOTAS DA MÃE NO NASCIMENTO E SOBREVIDA DE RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMOS: ESTRATÉGIAS DE PROMOÇÃO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL", como parte do grupo de mães com tempo de gestação incompleta, chamado grupo pré-termo (< 32 semanas de gestação).

É através das pesquisas que ocorrem os avanços na ciência e sua participação é de fundamental importância. Caso você aceite participar desta pesquisa, será necessária sua autorização para: (1) realizar coleta de uma amostra de secreção vaginal no seu trabalho de parto e (2) permitir um levantamento de dados do seu histórico clínico antes e durante sua gestação.

**CAUSAS E EFEITOS DE MICROBIOTAS DA MÃE NO NASCIMENTO E  
SOBREVIDA DE RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMOS: ESTRATÉGIAS DE  
PROMOÇÃO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL**

Rubrica da participante da pesquisa - Mãe (termo):

Rubrica do Pesquisador:

- (1) A coleta de secreção vaginal é um procedimento não invasivo e que não causa prejuízo a você ou ao bebê, tendo apenas o risco de desconforto ou constrangimento, pois você ficará em posição ginecológica como se fosse realizar o exame preventivo do Papanicolau. O(A) médico(a) colaborador do projeto irá coletar a amostra de secreção vaginal utilizando um cotonete longo, denominado de *swab*, em sala privativa.
- (2) O levantamento de dados do seu histórico clínico antes e durante sua gestação será obtido através da consulta ao seu prontuário de pré-natal e eventualmente, realizando perguntas diretamente a você se a informação não constar em seu prontuário. Os dados estarão relacionados às condições sócio-econômico-demográficas, aos hábitos de vida, ao histórico clínico-obstétrico e ao estado de saúde atual. Todas as informações serão confrontadas com os dados das gestantes com parto a termo.
- a) As responsáveis pela pesquisa, Dra Maria Marlene de Souza Pires (pediatra) e Dra Thaise Cristina Brancher Soncini (pediatra neonatologista), poderão ser contatadas por telefone, ou pessoalmente na própria Maternidade Carmela Dutra, para tirar qualquer dúvida a respeito do trabalho conforme consta no padrão ético vigente no Brasil.
- b) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante e depois do estudo.
- c) A participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar sua participação no estudo, ou, se aceitar a participação, você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção do seu atendimento, que está assegurado.
- e) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.
- g) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa **não** são da responsabilidade do participante e sua família.
- h) Pela participação no estudo você **não** receberá qualquer valor em dinheiro.

**Objetivos da Pesquisa:**

O leite materno é uma fonte de riqueza nutricional, de proteção imunológica e desenvolvimento neuropsicomotor para o recém-nascido. Essas qualidades são dependentes em parte da presença de microrganismos benéficos. Então é altamente desejável que o recém-nascido prematuro receba o leite da mãe até que possa estar apto para receber outros alimentos. No entanto, frequentemente as mães que enfrentam partos prematuros produzem mínimas quantidades de leite e não atingem as quantidades indicadas para seus filhos. Nesses

**CAUSAS E EFEITOS DE MICROBIOTAS DA MÃE NO NASCIMENTO E SOBREVIDA DE RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMOS: ESTRATÉGIAS DE PROMOÇÃO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL**

Rubrica da participante da pesquisa - Mãe (termo):

Rubrica do Pesquisador:

casos os bebês podem ser alimentados por leite materno de doadoras ou fórmulas infantis. Entretanto, por segurança, o leite da doadora deve passar pelo processo de pasteurização (aquecimento para inativar microrganismos patogênicos), durante o qual se perdem tanto a microbiota normal quanto parte dos anticorpos importantes para o bebê. Recentemente, foi mostrado em uma pesquisa, que o leite materno de doadoras pode ser suplementado com o leite da mãe para tentar recuperar parte desses microrganismos e anticorpos perdidos. O projeto que está sendo convidada a participar, propõe a realização de um ensaio clínico com recém-nascidos prematuros, menores de 32 semanas, que receberão leite de doadora personalizado com o leite das suas próprias mães, e verificar se esses bebês se beneficiam dessa suplementação. Entretanto, nem sempre as mães conseguem produzir leite. Além dessa avaliação, essa pesquisa pretende estudar dois grupos distintos de gestantes: um grupo de mulheres em trabalho de parto prematuro, com risco de terem o bebê pré-termo e um grupo de mulheres com gravidez em tempo normal. Essa divisão tem o intuito de avaliar as alterações na composição de microrganismos presentes no canal vaginal que podem estar relacionadas à prematuridade. Para isso também precisaremos pesquisar os hábitos de vida, o histórico clínico e as condições de saúde das gestantes dos dois grupos, uma vez que esses fatores também podem ter relação com a prematuridade.

#### **Riscos e benefícios como voluntária da pesquisa:**

##### **Riscos:**

A coleta de secreção vaginal é um procedimento não invasivo e que não causa prejuízo à gestante ou ao bebê, tendo apenas o risco de desconforto ou constrangimento à gestante. Além do risco mencionado, há risco mínimo de quebra de anonimato, alheio à vontade dos pesquisadores, o qual será minimizado armazenando suas informações em arquivos identificados por códigos. Para preservar a confidencialidade das informações coletadas, todos os seus dados serão mantidos em sigilo e de acesso somente pelos pesquisadores.

##### **Benefícios:**

Não haverá grandes riscos ao participar dessa pesquisa, e os benefícios serão ajudar à prevenção do trabalho de parto pré-termo e um tratamento apropriado a você, a outras gestantes e também, às futuras gestantes. Para seu/sua filho(a), a participação na pesquisa não trará benefícios diretos, entretanto irá contribuir com os benefícios indiretos da pesquisa. Os nossos resultados podem levar ao desenvolvimento de um processo de melhoramento do leite de doadora com mínima manipulação com alta probabilidade de sucesso. Como a estratégia de suplementação do leite da doadora é simples, próxima do processo natural e acessível para

---

#### **CAUSAS E EFEITOS DE MICROBIOTAS DA MÃE NO NASCIMENTO E SOBREVIDA DE RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMOS: ESTRATÉGIAS DE PROMOÇÃO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL**

Rubrica da participante da pesquisa - Mãe (termo):

Rubrica do Pesquisador:

ser implementado no SUS, ela poderá significar não somente a redução da taxa de mortalidade dos recém-nascidos, mas a promoção da sua qualidade de vida futura e, assim, representar ganhos para a sociedade em geral. Além disso, a estratégia possibilita também que a própria mãe possa sentir-se agindo positivamente no aleitamento do seu filho, mesmo com uma produção baixa de leite.

#### **E se algo sair errado?**

Você tem a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo poderá ser tratado primeiramente com os pesquisadores responsáveis da pesquisa cujos contatos estão especificados no item “quem devo contatar para obter informações?”. A seguir poderá ser procurada a direção do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (CCS/UFSC) pelo telefone (48) 37219525, ou pela página de internet <https://ccs.ufsc.br/contato-secretaria/>. Em última instancia poderá ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEPSH) da UFSC pelo telefone (48) 3721-6094, ou pessoalmente no próprio CEPSH no seguinte endereço: Universidade Federal de Santa Catarina Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), Horários: 10 às 12h e 16 às 18h, Rua Desembargador Vítor Lima, nº 222, sala 401 – Trindade, Florianópolis/SC, CEP: 88.040-400.

- a) Se você sofrer qualquer tipo de dano, material ou imaterial, referente à sua participação na pesquisa, previsto ou não neste termo de consentimento livre e esclarecido, você tem o direito de procurar indenização por parte dos pesquisadores e de acordo com a legislação vigente.
- b) Você não terá quaisquer custos ou forma de pagamento por autorizar a sua participação neste projeto de pesquisa. Caso algum tipo de despesa venha a ocorrer de forma extraordinária e inesperada pela sua participação na pesquisa, você poderá ser ressarcido por parte dos pesquisadores e de acordo com a legislação vigente.

#### **O que acontece com as informações coletadas sobre mim?**

- a) A equipe de pesquisa usará suas informações para pesquisa científica e para os objetivos da pesquisa. As informações serão armazenadas tanto em papel como em computador. Para proteger sua privacidade, as informações serão rotuladas de forma que não identifiquem você, uma vez que seus dados serão identificados por um código numérico. Quando os resultados da pesquisa forem publicados, sua identidade será mantida confidencial.
- b) Suas informações serão mantidas privadas e confidenciais pelo pesquisador, de acordo com todas as leis e regulamentações brasileiras pertinentes e aplicáveis.

---

#### **CAUSAS E EFEITOS DE MICROBIOTAS DA MÃE NO NASCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMOS: ESTRATÉGIAS DE PROMOÇÃO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL**

Rubrica da participante da pesquisa - Mãe (termo):

Rubrica do Pesquisador:



- c) A identidade dos participantes da pesquisa será sempre tratada como confidencial.
- d) Você pode pedir ao pesquisador para verificar suas informações coletadas, e pode solicitar que quaisquer erros sejam corrigidos. Se você decidir deixar a pesquisa a qualquer momento, o pesquisador ainda poderá usar suas informações coletadas até aquele momento.
- e) Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido você autoriza a utilização dos seus dados, conforme descrito acima.

**Posso mudar de ideia?**

Sim, sua participação nesta pesquisa é voluntária. Você não é obrigada a participar desta pesquisa. Você pode concordar em participar da pesquisa agora e mudar de ideia mais tarde. Você pode descontinuar sua participação na pesquisa a qualquer momento.

**Quem devo contatar para obter informações?**

Se você tiver quaisquer dúvidas sobre a pesquisa ou sentir que esta pesquisa lhe causou danos, ou caso tenha dúvidas sobre seus direitos como um participante da pesquisa, favor entrar em contato com:

**Dra. Maria Marlene de Souza Pires**

**Endereço: Rua Dom Joaquim, 827, Centro, Apto 501, Florianópolis, Santa Catarina,  
CEP 88015310**

**Telefone: (48) 3223-5151**

**E-mail: mmspiros@gmail.com**

**Dra. Thaise Cristina Brancher Soncini**

**Endereço: Rua Padre Clemente 63 - Centro, Florianópolis - SC, CEP 88015-350**

**Telefone: (48) 3251-7599**

**E-mail: thaisesoncini@gmail.com**

**OU**

**Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH)**

**Universidade Federal de Santa Catarina Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara),**

**Horários: 10 às 12h e 16 às 18h, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401 –**

**Trindade, Florianópolis/SC, CEP: 88.040- 400, Contato: (48) 3721-6094**

**E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br**

O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo,

**CAUSAS E EFEITOS DE MICROBIOTAS DA MÃE NO NASCIMENTO E  
SOBREVIDA DE RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMOS: ESTRATÉGIAS DE  
PROMOÇÃO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL**

Rubrica da participante da pesquisa - Mãe (termo):

Rubrica do Pesquisador:

vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

OU

**CEP-SES/SC localizado no Anexo I da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina, na Diretoria de Educação Permanente em Saúde- Divisão de Ciência e Tecnologia.**

**Rua Esteves Júnior 390- Anexo I SES- 2º andar, Centro.**

**CEP: 88015-130 –Florianópolis, SC- Brasil**

**Telefone: (48) 36647218/ (48) 36647242**

**E-mail: cepses@saude.sc.gov.br**

Se você consentir com sua participação, por favor leia e assine abaixo. Este termo de consentimento contém informações importantes. Estas informações lhe ajudarão a decidir se você quer participar desta pesquisa. Se você ainda tiver dúvidas, converse com o pesquisador ou com um dos membros da equipe da pesquisa antes de assinar este documento.

**IDENTIFICAÇÃO E CONSENTIMENTO DO VOLUNTÁRIO:**

Nome Completo da mãe (termo) participante da Pesquisa, em letra legível

Assinatura da Mãe

Data

**CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO:**

“Declaro que, em / / , concordei em participar, na qualidade de participante do projeto de pesquisa intitulado “CAUSAS E EFEITOS DE MICROBIOTAS DA MÃE NO NASCIMENTO E SOBREVIDA DE RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMOS: ESTRATÉGIAS DE PROMOÇÃO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL”, após estar devidamente informada sobre os objetivos, as finalidades do estudo e os termos da minha participação, assino o presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias, que serão assinadas também pelo pesquisador responsável pelo projeto, sendo que uma cópia se destina a mim (participante) e a outra ao pesquisador.”

**CAUSAS E EFEITOS DE MICROBIOTAS DA MÃE NO NASCIMENTO E SOBREVIDA DE RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMOS: ESTRATÉGIAS DE PROMOÇÃO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL**

Rubrica da participante da pesquisa - Mãe (termo):

Rubrica do Pesquisador:

“As informações fornecidas aos pesquisadores serão utilizadas na exata medida dos objetivos e finalidades do projeto de pesquisa, sendo que minha identificação será mantida em sigilo e sob a responsabilidade dos proponentes do projeto.”

“Não receberei nenhuma remuneração e não terei qualquer ônus financeiro (despesas) em função do meu consentimento espontâneo em participar do presente projeto de pesquisa.”

“Declaro que estou ciente que as amostras coletadas serão utilizadas especificamente para os procedimentos relacionados a este projeto de pesquisa e que poderão ficar armazenadas até a execução de tais metodologias, sob guarda do grupo de pesquisa.”

“Independentemente deste consentimento, fica assegurado o direito a retirar minha participação da pesquisa em qualquer momento e por qualquer motivo, sendo que para isso comunicarei minha decisão a um dos proponentes do projeto acima citados.”

\_\_\_\_\_  
Assinatura da mãe (pré-termo) participante da pesquisa

#### **Pesquisador**

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Pesquisadora (Maria Marlene de Souza Pires)

**CAUSAS E EFEITOS DE MICROBIOTAS DA MÃE NO NASCIMENTO E  
SOBREVIDA DE RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMOS: ESTRATÉGIAS DE  
PROMOÇÃO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL**

Rubrica da participante da pesquisa - Mãe (termo):

Rubrica do Pesquisador:

Florianópolis, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021.

**CAUSAS E EFEITOS DE MICROBIOTAS DA MÃE NO NASCIMENTO E SOBREVIDA DE RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMOS: ESTRATÉGIAS DE PROMOÇÃO DE SAÚDE MATERNO-INFANTIL**

Rubrica da participante da pesquisa - Mãe (termo):

Rubrica do Pesquisador:

--