



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Isis Maia Apolinário de Mello

Personalização da microbiota do leite de doadora com o leite da própria mãe: uma estratégia de modulação da colonização microbiana em recém-nascidos prematuros menores de 32 semanas

Florianópolis
2023

Isis Maia Apolinário de Mello

Personalização da microbiota do leite de doadora com o leite da própria mãe: uma estratégia de modulação da colonização microbiana em recém-nascidos prematuros menores de 32 semanas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Carlos R. Zárate-Bladés, Dr.

Florianópolis

2023

Mello, Isis Maia Apolinário

Personalização da microbiota do leite de doadora com o leite da própria mãe : uma estratégia de modulação da colonização microbiana em recém-nascidos prematuros menores de 32 semanas / Isis Maia Apolinário Mello ; orientador, Carlos Rodrigo Zárate-Bladés, 2023.

125 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Microbiota. 3. Amamentação. 4. Prematuridade. I. Zárate-Bladés, Carlos Rodrigo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Isis Maia Apolinário de Mello

Personalização da microbiota do leite de doadora com o leite da própria mãe: uma estratégia de modulação da colonização microbiana em recém-nascidos prematuros menores de 32 semanas

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 20 de julho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Edroaldo Lummertz da Rocha, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Fabíola Branco Filippin Monteiro, Dra.
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 Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Carlos Rodrigo Zárate Bladés, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho aos meus pais, Anna Flávia Brasil e Ivan Maia,
que sempre me apoiaram e acreditaram que eu era capaz.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais por todo o carinho, compreensão e dedicação ao longo de todos esses anos, me ajudando a estruturar minha carreira com todo o apoio e suporte que eu precisei. E ao meu namorado, Gustavo Barros, pela companhia, paciência, suporte emocional e toda a ajuda no geral para facilitar no desenvolvimento desse projeto de forma menos estressante. Passar por tudo isso com uma pandemia no meio só foi possível por que tinha você ao meu lado.

Gostaria de deixar meus agradecimentos à minha colega de laboratório, Izadora Frizzo, que se tornou uma grande amiga, presentinho do mestrado pra vida. Sem você tudo isso seria mil vezes mais difícil, muito obrigada mesmo!

Quero agradecer ao meu orientador, Carlos Zárate, por toda a paciência e pelos valiosos ensinamentos. E também às professoras Thaís Sincero e Jussara Palmeiro por todas as contribuições e aprendizados proporcionados.

Deixo aqui meus agradecimentos às neonatologistas Thaise Soncini e Eloísa Bartmeyer, pelo suporte com as amostras e coleta de dados clínicos, assim como aos médicos, enfermeiros e todo o pessoal da Maternidade Carmela Dutra pelas contribuições com o projeto.

Agradeço os colegas Lucas Soveral e Lívia Eslabão por me ajudarem diretamente a desenvolver o projeto e pelos conhecimentos compartilhados. E os bioinformatas Dany Mesa e Rodrigo Cardoso pela ajuda com as análises do sequenciamento.

Agradeço os professores Oscar Romero e Edison Silva pelo suporte com os freezers para armazenamento das amostras. Bem como a todo o pessoal do MIMA e do LBMMS pelo suporte estrutural e por todo o amparo com materiais e reagentes. E as instituições de fomento CAPES, FAPESC e PPSUS pelo suporte financeiro, e à UFSC por proporcionar toda a sua estrutura.

Quero agradecer também aos meus lindos amigos Andre Akira, Gabriel Cipriani, Mariana Fontes, Evelyse Porto, Luiza Hubner, Poliana Lanzarin, Gustavo Zambonin, Wilker Cavalcante, Laura Menegatti, Satyabhama Weihermann, e muitos outros que fizeram a experiência do mestrado ser mais leve com todo o amparo emocional. Obrigada por todos os abraços e risadas! E aos meus sogros queridos, Rosângela e Itagiba Barros, que estão sempre proporcionando momentos alegres, assim como me deram bastante suporte. Por fim, agradeço às minhas gatas, Amora e Margherita pelo carinho em me acompanhar por muitas madrugadas estudando e escrevendo.

RESUMO

A colonização pelos componentes da microbiota ocorre através da transferência entre mãe e recém-nascido (RN), sendo o momento do parto e o período de amamentação os mais cruciais nesse processo. O colostro e o leite materno contam com a presença de centenas de espécies de bactérias distintas. Assim, é recomendada a amamentação logo a partir da primeira hora de vida para todo RN. No entanto, em muitos partos prematuros, a mãe produz pouco leite ou nenhum. Nestes casos, a melhor alternativa torna-se o leite de doadora (LD). Porém o processo de pasteurização ao qual o LD é submetido resulta na inativação de vários dos compostos bioativos e na depleção da microbiota do leite. O objetivo deste estudo é de determinar as diferenças de composição e diversidade do microbioma intestinal de RNs prematuros menores de 32 semanas de idade gestacional que receberam LD ou LD com reconstituição da microbiota do leite da própria mãe (LM), e sua correlação com as características clínicas. Para isso, foi coletado LM e misturado com LD em uma proporção de 10% LM para 90% LD, seguido de incubação a 37 °C por 4h. Os RNs foram divididos em dois grupos de acordo com o tipo de dieta. Os microbiomas das fezes do décimo dia de vida foram estudados através de sequenciamento de DNA na plataforma MiSeq (Illumina Inc.). A análise do sequenciamento mostrou que a microbiota das fezes estudadas possui baixa diversidade e alta variabilidade interindividual, concordando com estudos prévios sobre microbiota de neonatos prematuros. Entretanto, a microbiota dos RNs estudados não apresentou diferença estatística significativa na diversidade e abundância de táxons, comparando os grupos de acordo com a dieta. Em contraste, as características “peso ao nascer” e “infecções maternas” provocaram mudanças significativas na microbiota dos RNs. Esses achados indicam a necessidade de realizar análises complexas que considerem tanto as características clínicas, a composição da microbiota e metaboloma dos leites, assim como as microbiotas das fezes dos RNs para que seja possível determinar os alcances reais da intervenção realizada.

Palavras-chave: prematuridade; amamentação; microbioma.

ABSTRACT

Colonization by the microbiota components occurs through transfer between mother and newborn (NB), the moment of delivery and breastfeeding are the most crucial in this process. Colostrum and breast milk contain hundreds of different species of bacteria. Thus, breastfeeding as soon as the first hour of life is recommended for every NB. However, in many premature births, the mother produces little to no milk. In these cases, the best alternative becomes donor's milk (DM), but the pasteurization process to which the DM is submitted results in the inactivation of several of the bioactive compounds and the depletion of the milk microbiota. The purpose of this study is to determine the differences in composition and diversity of the gut microbiota of preterm infants younger than 32 weeks gestation fed with DM or with DM restored by MM's microbiota, and its correlation with the clinical features. For this, MM was collected and mixed with DM in a ratio of 10% MM to 90% DM, followed by incubation at 37 °C for 4 hours. NB were divided into two groups according to the diet. The fecal microbiome at the tenth day of life was studied through DNA sequencing on the MiSeq platform (Illumina Inc.). The sequencing indicated that the fecal microbiota studied has low diversity and high inter-individual variability, in agreement with previous studies on the microbiota of preterm neonates. However, the microbiota of the NBs studied did not show significant statistical difference in diversity and abundance of taxa, comparing groups according to diet. In contrast, the characteristics "birth weight" and "maternal infections" caused significant changes in the NB's microbiota. These findings indicate the need to perform complex analyzes that consider the clinical characteristics, the composition of the milk microbiota and metabolome, as well as the NB's fecal microbiota, so that it is possible to determine the real scope of the intervention carried out.

Keywords: prematurity; breast-feeding; microbiome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do tratamento de dados.....	31
Figura 2 - Diagrama de Venn com a quantidade de gêneros identificados em cada grupo.....	38
Figura 3 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com os grupos do estudo.....	39
Figura 4 – Abundância dos dez gêneros predominantes em amostras do grupo controle.....	40
Figura 5 – Abundância dos dez gêneros predominantes em amostras do grupo intervenção.....	41
Figura 6 – Proporção de sequências identificadas como <i>Prevotella</i> sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com os grupos do estudo.	42
Figura 7 – Abundância relativa dos dez gêneros predominantes na microbiota dos RNs de acordo com os grupos do estudo mostrada individualmente.....	43
Figura 8 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com os grupos do estudo.....	44
Figura 9 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com o tipo de parto.	45
Figura 10 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a comparação entre os tipos de parto e os grupos do estudo.	46
Figura 11 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com o tipo de parto.	47
Figura 12 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a classificação de idade gestacional.....	48
Figura 13 – Proporção de sequências identificadas como <i>Clostridium</i> sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com a classificação de idade gestacional.	49
Figura 14 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a comparação entre a classe de IG e os grupos do estudo.	50
Figura 15 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com a classificação de idade gestacional.....	51
Figura 16 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a classificação de peso ao nascer.	52

Figura 17 – Proporção de sequências de gêneros da microbiota intestinal dos RNs de acordo com a classificação de peso ao nascer comparando os três grupos.	53
Figura 18 – Proporção de sequências identificadas como <i>Pantoea</i> sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com a classificação de peso ao nascer comparando os grupos MBPN com EBPN.....	54
Figura 19 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a comparação entre a classe de peso ao nascer e os grupos do estudo.	55
Figura 20 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com a classificação de peso ao nascer.	56
Figura 21 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com o uso de antibióticos.	57
Figura 22 – Proporção de sequências de gêneros da microbiota intestinal dos RNs de acordo com o uso de antibiótico.	58
Figura 23 – Abundância dos dez gêneros predominantes de acordo com a comparação entre o uso de antibiótico e os grupos do estudo.....	59
Figura 24 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com o uso de antibióticos.	60
Figura 25 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a presença de infecções.....	61
Figura 26 – Proporção de sequências identificadas como <i>Turicibacter</i> sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com a presença de infecção.....	62
Figura 27 – Abundância dos dez gêneros mais expressivos da microbiota dos RNs de acordo com a comparação entre a presença de infecção e os grupos do estudo.....	63
Figura 28 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com a presença de infecções.....	64
Figura 29 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com o consumo de FM.	65
Figura 30 – Proporção de sequências de gêneros da microbiota intestinal dos RNs de acordo com o consumo de FM.	66
Figura 31 – Abundância dos dez gêneros mais expressivos da microbiota dos RNs de acordo com a comparação entre o consumo de FM e os grupos do estudo.....	67
Figura 32 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com o consumo de FM.	68

Figura 33 – Proporção de sequências identificadas como <i>Veillonella</i> sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com a presença de infecção nas mães durante a gestação.	69
Figura 34 – Avaliação da diversidade alfa e beta da microbiota intestinal de RNs de acordo com infecções nas mães durante a gestação.	69
Figura 35 – Proporção de sequências identificadas como <i>Veillonella</i> sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com a presença de infecção nas mães após o parto...	70
Figura 36 – Avaliação da diversidade alfa e beta da microbiota intestinal de RNs de acordo com infecções nas mães após o parto.	71
Figura 37 – Proporção de sequências identificadas como <i>Kluyvera</i> sp. na microbiota intestinal de RNs do grupo intervenção de acordo com a presença de infecção nas mães após o parto.	71
Figura 38 – Avaliação da diversidade alfa e beta da microbiota intestinal de RNs do grupo intervenção de acordo com infecções nas mães após o parto.	72
Figura 39 – Proporção de sequências identificadas como <i>Enterobacter</i> sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com uso de antibiótico pelas mães.	73
Figura 40 – Avaliação da diversidade alfa e beta da microbiota intestinal de RNs de acordo com uso de antibiótico pelas mães.	73
Figura 41 – Proporção de sequências identificadas como <i>Enterobacter</i> sp. na microbiota intestinal de RNs do grupo intervenção de acordo com uso de antibiótico pelas mães.	74
Figura 42 - Gráficos de medidas de alfa e beta diversidade comparando os grupos de acordo com uso de antibiótico pelas mães, somente no grupo intervenção.	74
Figura 43 – Diagrama de Venn com a quantidade de gêneros identificados nas amostras de fezes do grupo intervenção e nos leites materno e inoculado.	75
Figura 44 – Abundância relativa dos dez gêneros bacterianos predominantes na microbiota dos RNs do grupo intervenção e na dos leites LM, LI de acordo com a comparação entre os binômios mãe-RN.	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Número de espécies identificadas por banco de dados.....	37
Quadro 2 – Resumo dos resultados.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas dos RNs e das mães.....	35
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCCs – Ácidos graxos de cadeia curta
ANOVA – Análise de variância
ASV – Variante de sequência de amplicon
BPN – Baixo peso ao nascer
CAAE – Certificado de apresentação de apreciação ética
CEPSH – Comitê de ética em pesquisa com seres humanos
DBP – Displasia broncopulmonar
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DMG – Diabetes mellitus gestacional
EBPN – Extremo baixo peso ao nascer
ECN – Enterocolite necrotizante
EPT – Extremo pré-termo
FM – Fortificante do leite materno
FP – Fezes do paciente
HAS – Hipertensão arterial sistêmica
HIV – Hemorragia intraventricular
IG – Idade gestacional
IgA – Imunoglobulina do tipo A
iREG – Laboratório de Imunorregulação
ITU – Infecção do trato urinário
LCR – Líquido cefalorraquidiano
LD – Leite de doadora
LI – Leite inoculado
LM – Leite materno
LP – Leite pasteurizado
LPV – Leucomalácia periventricular
MBPN – Muito baixo peso ao nascer
MIMA – Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada
MPT – Muito pré-termo
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina
NE – Nutrição enteral
NP – Nutrição parenteral
NVO – Nada via oral
OLH – Oligossacarídeo do leite humano
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCoA – Análise de coordenadas principais
PN – Peso ao nascer
PPSUS – Programa Pesquisa para o SUS
PT – Pré-termo
R1 – Fita senso
R2 – Fita antisenso
ReBEC – Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos
RN – Recém-nascido
RNA – Ácido ribonucleico
ROP – Retinopatia da prematuridade
STAMP – Statistical analysis of taxonomic and functional profiles
SUS – Sistema Único de Saúde
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UTI-neo – Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	PREMATURIDADE	16
1.2	COLONIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL	20
1.3	BENEFÍCIOS DO LEITE MATERNO	23
2	HIPÓTESE	25
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL:	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	26
4.2	RECRUTAMENTO DE BINÔMIOS	26
4.3	COLETA E REGISTRO DOS DADOS CLÍNICOS	27
4.4	RESTAURAÇÃO DA MICROBIOTA DO LEITE	28
4.5	COLETA, ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	28
4.6	EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	29
4.7	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	30
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5	RESULTADOS	32
5.1	RESULTADOS CLÍNICOS	33
5.2	RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO	36
5.2.1	Características da microbiota intestinal dos RNs por grupo do estudo	38
5.2.2	Influência do tipo de parto na composição microbiana dos RNs	44
5.2.3	Influência da IG na composição microbiana dos RNs	47
5.2.4	Influência do peso ao nascer na composição microbiana dos RNs	51
5.2.5	Influência do uso de antibiótico pelo RN em sua composição microbiana	57
5.2.6	Influência de infecções nos RNs em sua composição microbiana	60
5.2.7	Influência do consumo de FM pelo RN em sua composição microbiana	64
5.2.8	Fatores maternos influenciando a composição microbiana dos RNs	68
5.2.8.1	<i>Infecções nas mães durante a gestação</i>	68
5.2.8.2	<i>Infecções nas mães após o parto</i>	70
5.2.8.3	<i>Uso de antibiótico pelas mães</i>	72
5.2.9	Comparação da microbiota dos leites com a microbiota das fezes	74

5.2.10	Recapitulação dos resultados mais importantes de cada sessão.....	76
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÕES.....	90
	REFERÊNCIAS.....	92
	ANEXO 1 – TCLE	102
	ANEXO 2 – ANTIBIÓTICOS (MÃES).....	110
	ANEXO 3 – INFECÇÕES (MÃES)	112
	ANEXO 4 – ANTIBIÓTICOS (RNS)	114
	ANEXO 5 – USO DO FM	116
	ANEXO 6 – CULTURAS POSITIVAS (RNS).....	117
	ANEXO 7 – ABUNDÂNCIA DE FILOS	119
	ANEXO 8 – DIVERSIDADE PARA PESO AO NASCER.....	120
	ANEXO 9 – ABUNDÂNCIA SEGUNDO INFECÇÃO GESTACIONAL.....	121
	ANEXO 10 – ABUNDÂNCIA SEGUNDO INFECÇÃO NO PÓS PARTO....	122
	ANEXO 11 – PROPORÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE <i>VEILLONELLA</i> SP. ...	123
	ANEXO 12 – ABUNDÂNCIA SEGUNDO USO DE ATB PELAS MÃES	124

1 INTRODUÇÃO

1.1 PREMATURIDADE

A prematuridade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o nascimento anterior à idade gestacional (IG) de 37 semanas e possui três subclassificações, definindo que recém-nascidos (RNs) com IG inferior a 28 semanas são considerados extremo pré-termos, entre 28 e 32 semanas são muito pré-termos e entre 32 e 36 semanas são pré-termos moderados a tardios. Essas classificações se fazem importantes clinicamente pois quanto menor a IG maiores são os riscos de casos de morbimortalidade (HARRISON; GOLDENBERG, 2016; WALANI, 2020).

Estimativas com base no ano de 2020 relatam que 13,4 milhões de neonatos nasceram prematuramente no mundo inteiro, o que equivale a 9,9% de todos os nascidos vivos. Desses, 15% são nascimentos anteriores a 32 semanas de idade gestacional, quando a sobrevivência costuma depender da internação em Unidades de Tratamento Intensivo neonatal (UTI-neo) (KINNEY; VAZ, 2020; WHO; UNICEF, 2023).

No Brasil, a proporção de prematuridade dentre os nascidos vivos em 2019 foi de 9,95%, e assim como nos outros países, as mulheres com idade materna avançada (acima de 45 anos) e adolescentes (entre 10 a 14 anos) foram as que apresentam as maiores taxas de partos prematuros (MARTINELLI et al., 2021). Especificamente em Santa Catarina, um estudo realizado para análise da prevalência da prematuridade entre 2016 e 2018 constatou que, em 2018 a taxa de prematuridade no estado foi de 10,4% entre os nascidos vivos daquele ano (GINAR; NAZÁRIO, 2020).

Partos prematuros podem ser espontâneos ou induzidos por profissionais de saúde. A indução do parto prematuro por via vaginal ou cesárea normalmente é recomendada quando a continuação da gravidez apresenta um risco para a saúde da mãe e/ou do feto, e as principais indicações para indução de um parto prematuro incluem: pré-eclâmpsia/eclâmpsia, anormalidades placentárias (por exemplo, placenta acreta), restrição grave do crescimento fetal e condições maternas pré-existent (GRIGGS et al., 2020; WHO; UNICEF, 2023). A escolha da indução do parto ou agendamento da cesárea anterior às 39 semanas de gestação completas sem uma indicação médica é amplamente desencorajada, por constatação de que nascimentos no início do período a termo (entre 37 e 39 semanas) já representam maiores riscos de morbimortalidades aos RNs, com mais chances de apresentar síndrome do desconforto respiratório, taquipneia transitória do RN, necessidade do uso de ventilação mecânica e pneumonia, em comparação com neonatos nascidos a termo após o período mencionado (ADA et al., 2017; GRIGGS et al., 2020; WHO; UNICEF, 2023).

Enquanto isso, partos prematuros espontâneos podem decorrer de múltiplos fatores, dentre os quais destacam-se predisposições genéticas (como incompetência cervical, restrição de crescimento intrauterino, anomalia congênita, entre outros riscos advindos da genética familiar), condições médicas crônicas subjacentes (tal como diabetes, hipertensão, anemia, asma, doenças da tireoide e obesidade), infecções (especialmente infecções do trato urinário, corioamnionite, vaginose bacteriana, bacteriúria assintomática, ou pelo vírus da imunodeficiência humana, sífilis e malária) e resposta inflamatória materna (quando há distúrbio no balanço entre a defesa efetiva do sistema imune materno contra uma possível infecção e a manutenção da imunotolerância ao feto). Como também correm maior risco de acontecer devido à gravidez na adolescência ou idade materna avançada, intervalo intergestacional curto, gravidez múltipla (gestações com gemelares naturais ou por reprodução assistida), desnutrição ou deficiências de micronutrientes, estilo de vida (tabagismo, consumo de álcool, uso de drogas recreativas, excesso de trabalho e atividade física intensa), distúrbios psicológicos maternos (depressão e violência contra a gestante) e até por fatores ambientais, como exposição à poluição do ar ou estresse térmico (GOMEZ-LOPEZ et al., 2022; GRIGGS et al., 2020; KÖCK et al., 2010; VOGEL et al., 2018; WANG et al., 2022; WHO; UNICEF, 2023).

Mundialmente, o nascimento prematuro constitui um problema de saúde pública de alta relevância, sendo considerado uma das principais causas de mortes evitáveis em crianças menores de 5 anos, assim como complicações de parto. As últimas estatísticas apontam que no ano de 2021, 5 milhões de crianças morreram antes de completar 5 anos de idade, das quais, aproximadamente 2,3 milhões morreram durante o primeiro mês de vida (ou seja, em torno de 6.400 neonatos a cada dia). O período neonatal, que consiste dos 28 primeiros dias de vida, representa o período de maior vulnerabilidade para a sobrevivência infantil. No ano de 2020, assim como em 2021, aproximadamente 900.000 mortes do período neonatal foram resultado direto das complicações do parto prematuro. Sem contar que a maioria dos natimortos são prematuros, os quais não estão incluídos nas estimativas levantadas acima, o que significa que o esforço investido na prevenção primária de partos prematuros pode ajudar a reduzir os 1,9 milhão de casos de natimortos todos os anos (HUG et al., 2022; WHO; UNICEF, 2023).

Para além das possíveis complicações durante o parto, a mãe e o RN prematuro podem vir a enfrentar grandes e contínuos desafios no período pós-parto, colocando em risco não apenas a sobrevivência do neonato em si, mas também a possibilidade de uma sobrevivência saudável (HARRISON; GOLDENBERG, 2016). Durante o período neonatal, e

nos meses subsequentes, RNs prematuros estão predispostos a passarem por uma série de complicações que muitas vezes podem estar correlacionadas entre si ou também com a inerente e necessária exposição prolongada ao ambiente da UTI-neo. As complicações de curto prazo da prematuridade incluem condições respiratórias neonatais, infecções generalizadas, condições neurológicas adversas, bem como dificuldades de alimentação e problemas metabólicos (VOGEL et al., 2018).

Destacam-se como complicações graves e que mais afetam esse grupo de indivíduos a displasia broncopulmonar (DBP), a hemorragia intraventricular (HIV), a leucomalácia periventricular (LPV), a retinopatia da prematuridade (ROP), a enterocolite necrotizante (ECN) e quadros de sepse, sendo essas duas últimas observadas muito frequentemente (BASSLER et al., 2009; CAO et al., 2021). O desenvolvimento de uma ou mais das complicações citadas, no início da vida, representa aumento do risco do comprometimento neurosensorial infantil. Todos os aspectos do desenvolvimento neurológico podem ser afetados pela prematuridade, a maioria dos RNs prematuros já apresentam menor volume cerebral ao nascer e amadurecimento mais lento de algumas regiões cerebrais em comparação àqueles nascidos a termo, mas quando na presença de alguma dessas complicações o comprometimento torna-se ainda maior (REAM; LEHWALD, 2017).

Também já foi observado que internações prolongadas na UTI-neo configuram um fator de risco para perda auditiva devido ao fato de ser um ambiente ruidoso com sons arrítmicos e de alta frequência. Ruídos altos estão associados ao aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, diminuição da frequência respiratória e da saturação de oxigênio, assim como causam sobressaltos que podem interferir no sono e resultar em choro, aumentando a pressão intracraniana. A qualidade da experiência acústica no período neonatal é importante para a formação cognitiva infantil, pois o desenvolvimento auditivo está intimamente ligado às habilidades posteriores de linguagem e aquisição da fala. Dito isso, uma forma simples de mitigar esses impactos é a exposição neonatal à voz da própria mãe, o que pode promover plasticidade cortical (REAM; LEHWALD, 2017).

Dessa forma, torna-se evidente que complicações associadas à prematuridade também resultam em prejuízos de longo prazo na saúde, especialmente para os sistemas neurológico, respiratório e cardíaco dos RNs sobreviventes. Algumas sequelas do nascimento prematuro podem durar toda a vida, em casos mais graves existe um risco aumentado de paralisia cerebral, epilepsia, distúrbios visuais ou auditivos e aumento da incidência de doenças crônicas na idade adulta. Novas pesquisas mostram ainda que o nascimento prematuro potencialmente provoca distúrbios de aprendizagem e de comportamento, afetando

substancialmente o desempenho acadêmico e a integração social (BARFIELD et al., 2019; REAM; LEHWALD, 2017; WHO; UNICEF, 2023; TU et al., 2019).

Além disso, também existem impactos psicossociais e econômicos associados às complicações advindas da prematuridade que afetam as mães, a família e a comunidade em geral (HARRISON; GOLDENBERG, 2016; VOGEL et al., 2018). Financeiramente, já foi verificada a existência de um custo direto considerável proveniente da assistência hospitalar aos RNs prematuros, no qual o grau de prematuridade está diretamente relacionado ao aumento desse custo. Em um estudo realizado no Brasil avaliando dados de nascimentos prematuros em 2018, observou-se que a prematuridade extrema demonstrou um custo 15,5 vezes maior comparado à tardia (DE MELO et al., 2022).

Vale ressaltar que muitas dessas complicações são evitáveis, configurando assim, um marcador sensível da qualidade do atendimento. Um exemplo disso é a cegueira ou deficiência visual resultante da ROP, sobre a qual tem aparecido relatos frequentes na última década, especialmente na América Latina e no Sudeste Asiático, e tem chance de ser prevenida com uso seguro de oxigênio (evitando saturações acima de 95%) e ampliação da triagem e tratamento (WHO; UNICEF, 2023).

Outro grande desafio enfrentado pelo neonato prematuro é a forma de se nutrir. Devido à alta imaturidade do sistema gastro-intestinal, RNs com IG inferior a 32 semanas não conseguem se alimentar por vias convencionais e necessitam do uso de sonda gástrica para nutrição enteral (NE) e de catéter intravenoso para nutrição parenteral (NP). Durante os primeiros dias de vida, quando a insuficiência intestinal fisiológica limita o uso da NE, faz-se necessário o uso da NP para atender às demandas nutricionais dos prematuros. Esses indivíduos possuem estoques insuficientes de nutrientes ao nascer, e a suplementação nutricional é essencial para o crescimento e funcionamento dos órgãos vitais (BOSCARINO et al., 2021; HOSSAIN et al., 2021).

No entanto, a falta de nutrientes intraluminais, como observado em indivíduos recebendo a NP exclusiva, tem efeitos deletérios nas funções do trato gastrointestinal, além de que em quantidade elevada pode aumentar o risco do surgimento de complicações metabólicas. À vista disso, muitos estudos recomendam que a introdução da NE ocorra o quanto antes, complementando a NP, e que o avanço da progressão enteral seja rápido, dentro dos limites de tolerância do organismo de cada RN, para que se atinja a dieta enteral plena (~150 ml/kg/dia) assim que possível. Os estudos apontam que existe um impacto positivo na saúde do RN quando se atinge a dieta enteral plena, o desenvolvimento fisiológico e metabólico é mais acelerado, assim como há uma melhora na distribuição de micronutrientes,

o que promove a maturação intestinal e do sistema imune associado, estimula a colonização da microbiota, reduz a inflamação, ajuda no crescimento como um todo, melhora o neurodesenvolvimento, e até reduz o risco de complicações associadas a dispositivos intravasculares para administração de fluidos (BOSCARINO et al., 2021; THOENE; ANDERSON-BERRY, 2021; WALSH et al., 2020).

Paralelo a isso, a exposição ao cheiro e ao leite da mãe, através da administração de colostro orofaríngeo em pequenas quantidades (conhecido como colostroterapia), mesmo antes do RN estar pronto para se alimentar por via oral, parece ser segura e promove a maturação imunológica, bem como ajuda a atenuar os efeitos da experiência alterada no paladar e no funcionamento oromotor advindo da nutrição prolongada por sonda, e assim auxilia o neonato a preparar-se para quando fizer alimentações orais. Efeitos da colostroterapia podem ainda resultar na redução do tempo de hospitalização e influenciar nos hábitos alimentares de longo prazo (HOSSAIN et al., 2021; REAM; LEHWALD, 2017).

1.2 COLONIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

A colonização pelos componentes da microbiota materna ocorre através da transferência entre mãe e RN a partir do momento do parto e intensifica-se durante o período neonatal com o ato da amamentação (MACPHERSON; AGÜERO; GANAL-VONARBURG, 2017).

Entende-se por microbiota intestinal o conjunto de microrganismos residentes na superfície da mucosa intestinal (incluindo bactérias, arqueas, vírus, fungos e protozoários) que estão em constante comunicação com os sistemas do organismo hospedeiro, constituindo uma relação de simbiose. Esses microrganismos relacionam-se com o hospedeiro metabolizando componentes da dieta, moldando o epitélio e fortalecendo a integridade intestinal, regulando o sistema imune e defendendo-o diretamente de outros microrganismos patogênicos (THURSBY; JUGE, 2017; GOMAA, 2020; MILANI et al., 2017).

De forma geral, um número relativamente baixo de patógenos também são considerados membros da microbiota intestinal e residem no hospedeiro de forma imperturbável na maior parte do tempo, tornando-se uma ameaça à saúde do hospedeiro apenas quando o ecossistema e a homeostase da microbiota intestinal se tornam perturbadas, constituindo um quadro de disbiose (MILANI et al., 2017). Dito isso, é importante salientar que a constituição da microbiota e a diversidade de microrganismos nela presente está sujeita a modificações ao longo dos acontecimentos na vida do hospedeiro, como uso de antibióticos,

doenças ou mudanças na dieta (GOMAA, 2020; MARTINO et al., 2022; ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019).

Em revisão do papel da microbiota intestinal no metabolismo de elementos da dieta em componentes alimentares bioativos, Gomaa (2020) relatou que já foi observado o potencial da microbiota em sintetizar vitaminas (como biotina, tiamina, cobalamina, riboflavina, ácidos pantotênicos, vitamina B e K), neuroquímicos, carboidratos, aminoácidos de cadeia ramificada, aminas, fenóis, ácido fenilacético, ácidos biliares, colesterol e ácidos graxos conjugados.

Mas, um dos papéis desempenhados pela microbiota mais conhecidos e que traz grandes benefícios ao organismo hospedeiro é a capacidade de metabolizar carboidratos indigeríveis como celulose, hemiceluloses, amido resistente, pectina, oligossacarídeos e lignina em ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), como ácidos acético, propiônico e butírico. Os AGCCs servem como uma fonte de energia significativa para as células epiteliais intestinais, fortalecendo a barreira da mucosa e aumentam a produção das proteínas de junções de oclusão na barreira hematoencefálica, limitando a entrada de metabólitos indesejáveis no tecido cerebral, assim como, a fermentação de AGCCs produz um aumento na absorção de cálcio, o que provoca um impacto significativo no crescimento e desenvolvimento ósseo. Esses metabólitos são produzidos principalmente por espécies dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, assim como por alguns microrganismos intestinais anaeróbios (GOMAA, 2020; ROOKS; GARRETT, 2016).

Além disso, a microbiota intestinal também apresenta estreita colaboração com o sistema imunológico da mucosa intestinal, desempenhando funções vitais em sua maturação. Tanto que organismos que apresentam uma interação prejudicada entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico da mucosa manifestam maior incidência de doenças inflamatórias (SHI et al., 2017). Estudos realizados em camundongos livres de germes (ou seja, desprovidos de microbiota) mostraram que esses animais possuíam defeitos imunológicos importantes, especialmente no intestino, e maior suscetibilidade a infecções. Esses camundongos apresentaram redução da espessura do muco que reveste o epitélio, alteração da morfologia das criptas intestinais e placas de Peyer e linfonodos mesentéricos menores e em menor número, assim como suas células B produziam menores quantidades de IgA secretora (anticorpo essencial da mucosa, responsável por manter a integridade da barreira) e havia um desequilíbrio entre os subconjuntos de células T auxiliares (ROOKS; GARRETT, 2016).

Ao entender a extensão dos benefícios proporcionados por uma microbiota saudável, é incontestável que uma microbiota bem estruturada no início da vida contribui para o

crescimento do hospedeiro e desenvolvimento do seu sistema imunológico. Por outro lado, quando a composição da microbiota intestinal durante a vida neonatal, ou durante o início da infância, sofre grandes alterações, caracterizando-se como aberrante, existe maior probabilidade do indivíduo apresentar distúrbios pediátricos ou até doenças na idade adulta (GENSOLLEN et al., 2016; MILANI et al., 2017).

A composição da microbiota do início da vida costuma ser bastante influenciada pelo tipo de parto em RNs que nasceram a termo. Enquanto neonatos nascidos por parto vaginal serão colonizados por microrganismos associados à vagina, como *Lactobacillus* sp., os RNs que nasceram por cesárea são mais susceptíveis de serem colonizados por microrganismos da pele materna ou da equipe e ambiente hospitalar, como *Staphylococcus* sp. (MILANI et al., 2017).

Porém essa influência não parece ser tão evidente quando se tratando de RNs prematuros, possivelmente devido ao alto uso de antibióticos nos primeiros dias de vida, apresentando um desenvolvimento microbiano instável (MARTINO et al., 2022). Outra justificativa possível seria que a diminuição dessa influência decorre do fato que mães que tiveram parto prematuro já apresentam uma microbiota vaginal alterada. Um estudo que analisou a microbiota vaginal de mães que tiveram partos prematuros espontâneos verificou que as mulheres que sofrem parto prematuro apresentaram diversidade geral de microrganismos aumentada em suas amostras, assim como redução significativa da espécie *Lactobacillus crispatus* e aumento significativo de dois táxons previamente associados a condições adversas da saúde vaginal, *Megasphaera* tipo 1 e TM7-H1 (FETTWEIS et al., 2019).

Existe também uma influência da microbiota da mãe no desenvolvimento do sistema imune do feto. Apesar de não haver transferência da microbiota da mãe para feto antes do nascimento, muitos metabólitos, incluindo os AGCCs provenientes da microbiota materna, são transferidos pela placenta e possuem efeitos na imunidade fetal, podendo, por exemplo, gerar proteção contra o desenvolvimento de asma mais tarde na vida. Além disso, o uso materno de antibióticos e doenças relacionadas ao trato gastrointestinal na mãe durante a gestação, também parecem aumentar o risco do surgimento de doenças nos filhos, mais tarde em sua vida, devido à influência exercida por essas condições no sistema imunológico fetal (KENNEDY et al., 2021; MARTINO et al., 2022).

1.3 BENEFÍCIOS DO LEITE MATERNO

O leite materno e o colostro possuem uma grande quantidade de nutrientes e compostos bioativos que influenciam diretamente no crescimento e desenvolvimento de sistemas do RN. Estão presentes vários compostos imunomoduladores, como oligossacarídeos do leite humano (OLH), citocinas reguladoras, fatores de crescimento, imunoglobulinas, principalmente do tipo A (IgA), fatores imunes inatos, peptídeos antimicrobianos e lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas, mas também outros fatores ativos inespecíficos, como lisozima e lactoferrina. De modo geral, já está bem estabelecido que o leite humano atua tanto na prevenção quanto no tratamento da ECN e outras morbidades gastrointestinais (COLLADO et al., 2015; FORD et al., 2019; MARTINO et al., 2022; FERNÁNDEZ et al., 2018).

O leite de mães que fizeram parto prematuro contém níveis mais altos de proteína, sódio, cloreto, cálcio, zinco, cobre e folato do que o leite materno a termo. O colostro dessas mães é especialmente rico em componentes imunoprotetores em comparação com o leite materno maduro. Esse tipo de leite pode fornecer uma elevada quantidade de IgA, que atua inibindo o crescimento de patógenos na superfície da mucosa; e de antioxidantes, que protege o dano da mucosa causado pelos radicais livres, conservando a membrana saudável e conferindo maior proteção da barreira intestinal. Já foi verificado também que os biofatores do colostro podem proteger os RNs prematuros de condições como a NEC, a ROP, a DBP, seps, problemas neurocognitivos e cardiovasculares (HOSSAIN et al., 2021).

Dentre os compostos bioativos encontrados no leite, destacam-se os OLHs, componente que traz numerosos benefícios à saúde do RN, como imunomodulação e proteção contra doenças infecciosas. OLHs também são considerados prebióticos naturais, pois estimulam ativamente o crescimento de membros específicos da microbiota intestinal infantil, aumentando, em especial, o crescimento de espécies do gênero *Bifidobacterium*. Isso ocorre devido ao fato de que são poucas as bactérias que expressam toda a maquinaria necessária para degradação dos OLHs, grande parte delas têm a capacidade apenas de clivar e metabolizar elementos específicos da molécula. No entanto, as comunidades microbianas podem agir em conjunto, degradando sequencialmente e metabolizando em um esforço de equipe a estrutura complexa de um OLH. Para outros tipos de microrganismos os OLHs possuem um efeito contrário, atuando como antimicrobiano, um exemplo disso é o *Streptococcus* do grupo B (GBS), que tem seu crescimento restringido na presença de OLHs. Vale ressaltar ainda que nem todo RN que recebe leite humano é exposto ao mesmo conjunto de OLHs, pois a quantidade total e a composição estrutural são altamente variáveis entre

diferentes mulheres, podendo ainda o leite de uma mesma mãe apresentar mudanças em sua composição ao longo da lactação. Isso contribui para a modulação de comunidades microbianas infantis distintas com potenciais consequências de curto e longo prazo (MARTINO et al., 2022; MILANI et al., 2017; FERNÁNDEZ et al., 2018).

Além da modulação através dos OLHs, a amamentação tem um grande efeito no desenvolvimento da microbiota do neonato, justamente por possuir sua própria comunidade microbiana (MARTINO et al., 2022). Em um estudo que realizou a comparação entre RNs alimentados com leite de doadora pasteurizado e RNs alimentados com leite da própria mãe, as amostras desse segundo grupo apresentaram aumento na diversidade da comunidade microbiana intestinal nos níveis de filo e gênero, assim como aumento significativo na abundância de *Bifidobacterium* sp. e *Bacteroides* sp. (ambos associados à prevenção da NEC), os RNs desse grupo também apresentaram melhor tolerância alimentar e crescimento superior (FORD et al., 2019).

Dessa forma, fica evidente que a amamentação é uma medida simples, mas que contribui fortemente para evitar grande parte das mortes e condições adversas que afetam os RNs no período neonatal. Inclusive, a OMS recomenda que a amamentação na primeira hora de vida seja estimulada a todo RN, seja exclusiva até os 6 meses de vida, e continuada complementando a alimentação até dois anos ou mais (WHO; UNICEF, 2023). Neonatos que não são amamentados na primeira hora de vida ou que são pouco amamentados no geral, correm maior risco de morte decorrente de diarreia ou outras infecções e ainda possuem maior tempo de hospitalização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Além disso, alguns estudos também relacionam o aleitamento materno com uma melhora no coeficiente intelectual e boa preparação para a escola, podendo ter um impacto duradouro na cognição, assim como reduz o risco de câncer de mama nas mães (BLESA et al., 2019; VICTORA et al., 2015; UNARMUNGUÍA et al., 2017).

Os RNs prematuros são especialmente necessitados dos componentes do leite cru da própria mãe (LM), devido às características apresentadas anteriormente de imaturidade dos órgãos e do seu sistema imune, estando expostos a uma série de complicações e microrganismos potencialmente patogênicos. No entanto, em uma grande quantidade de partos prematuros a mãe não consegue produzir uma quantidade adequada de leite ou até mesmo qualquer quantidade. Nestes casos, a melhor alternativa torna-se o leite de doadora (LD) disponível nos bancos de leite humano, os quais precisam passar pelo processo de pasteurização a fim de garantir maior segurança contra patógenos, ao RN. Mesmo pasteurizado, o LD ainda garante um aporte nutricional importante aos neonatos e também

parece fornecer maior proteção contra ECN, em comparação ao uso de fórmula infantil (COLLADO et al., 2015). Por outro lado, o processo de pasteurização também resulta na inativação de vários dos compostos bioativos (como fatores de crescimento, hormônios, OLH e outros fatores imunológicos) e na depleção da microbiota do leite, tornando-o menos benéfico para a tolerância alimentar e prevenção de infecções (FERNÁNDEZ et al., 2018; FORD et al., 2019).

Tendo em vista a queda de qualidade do LD em relação ao LM e as necessidades apresentadas pelos RNs prematuros, é fortemente estimulada a produção de leite, mesmo que em pequenas quantidades, nas UTI-neo. Essas pequenas quantidades podem ser utilizadas para personalização do LD. Segundo Cacho e colaboradores (2017), é possível restabelecer microrganismos de ocorrência natural potencialmente benéficos no LD a partir da inoculação de 10% do LM, 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).

2 HIPÓTESE

A inoculação do LM no LD resulta na restauração parcial da microbiota do leite, sendo suficiente para modular a colonização microbiana intestinal de RNs prematuros para um perfil de microbiota diferente daquele dos RNs alimentados com LD.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Determinar as diferenças de composição e diversidade do microbioma intestinal de RNs prematuros menores de 32 semanas de IG alimentados com LD ou com LD com reconstituição (LD-R) da microbiota do LM e sua correlação com as características clínicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar se há diferenças nas características clínicas gerais dos RNs e mães dos grupos (controle e intervenção) estudados.
- Determinar se há diferenças significativas na composição da microbiota entre as amostras de fezes dos RNs dos grupos estudados.
- Determinar se há diferenças significativas nos índices de diversidade da microbiota entre as amostras de fezes dos RNs dos grupos estudados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente trabalho faz parte de um projeto maior titulado “Causas e efeitos de microbiotas da mãe no nascimento e sobrevivência 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, o qual foi contemplado no Edital de Chamada Pública Fapesc nº 16/2020 – Programa Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde – PPSUS. Esse projeto principal foi submetido ao comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEPSH) da Maternidade Carmela Dutra e da UFSC, incluindo termos de consentimento livre e esclarecido (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-729kr8x. Seguindo as normativas do CEPSH, o projeto de mestrado referente a esta dissertação também foi submetido ao comitê informando a sua ligação com o projeto principal acima citado e foi aprovado no processo CAAE 48288921.0.0000.0121.

4.2 RECRUTAMENTO DE BINÔMIOS

O projeto principal incluiu binômios mãe-RNs prematuros menores de 32 semanas, nascidos na Maternidade Carmela Dutra e internados na UTI-neo no período de abril de 2021 a fevereiro de 2023. A maternidade Carmela Dutra é 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.

Os binômios participantes do estudo principal dividem-se em dois grupos: 40 binômios mãe-RN para o grupo que recebeu o LD-R e 40 binômios mãe-RN para o grupo controle que recebeu o LD como feito rotineiramente. O tamanho amostral foi calculado considerando os dias livres sem dieta plena enteral e baseia-se nas seguintes informações: alfa de 5%, poder de 80% para detectar uma diferença de pelo menos 4 dias entre os grupos. Para o cálculo foram utilizados a média (4,33) e o desvio padrão (2,87) de dias livres sem dieta plena nos últimos 4 anos do serviço em questão e acrescido 20% para eventuais perdas.

4.3 COLETA E REGISTRO DOS 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 (UFSC). O manejo nutricional do prematuro foi mantido de acordo com o protocolo já realizado na maternidade: todos os lactentes com muito baixo peso ao nascer (MBPN) receberam nutrição parenteral no primeiro dia de vida com uma solução parenteral padronizada. A nutrição enteral mínima (10 a 20 ml/kg/dia) foi iniciada nas primeiras horas de vida, quando as condições hemodinâmicas permitiram, com colostro materno ou LD não fortificado e aumentada progressivamente de 20 a 30 ml/kg/dia até 150 a 170 ml/kg/dia de acordo com a tolerância. A nutrição parenteral suplementar foi interrompida quando a ingestão enteral atinja 100 a 120 ml/kg/dia. A fortificação leite materno com FM85® padrão (informações nutricionais vide página: <https://www.pediatrianestle.com.br/produtos/fm-85r>) foi introduzida a 25% quando o volume enteral atingiu 100 ml/kg/d.

As medidas de crescimento desde o nascimento até o décimo quinto dia de vida foram registradas da seguinte maneira: o peso foi registrado diariamente usando uma balança eletrônica (em gramas), o perímetro cefálico (em centímetros) e o comprimento (em centímetros) foram aferidos semanalmente por meio de fita métrica e estadiômetro, respectivamente. Além disso, também foram avaliados a velocidade de ganho ponderal (g/kg/dia) na média de 4 dias e o tempo para recuperar o peso de nascimento.

Foram coletados dados clínicos de 80 binômios Mãe-RN, contendo as seguintes informações: nome da mãe e RN, data de nascimento do RN, idade da mãe, escolaridade, estado civil, etnia, número da gestação, número de abortos, pré-natal, gestação múltipla, número de fetos, infecção congênita (qual), outras patologias, uso de medicamentos, diabetes mellitus gestacional, hipertensão arterial sistêmica/doença hipertensiva da gravidez, uso de corticoide pré-natal e doses, uso de sulfato de magnésio, ruptura prematura de membranas, tempo BR(h), interrupção eletiva, infecção, antibiótico intraparto (qual), sexo do RN, tipo de parto, idade gestacional, new Ballard, data da última menstruação, ultrassonografia, Apg 1 e 5, peso ao nascer, comprimento, perímetro cefálico, uso de surfactantes, uso de corticoides pós-natal, ventilação mecânica invasiva (dias), ventilação mecânica não invasiva (dias), dias de O₂, dias de cateter central, ECN, tratamento persistência do canal arterial, convulsão, ultrassonografia de crânio, sepse precoce (agente), sepse tardia (agente), uso de antibióticos (qual, quantos dias e indicação do uso), culturas positivas (local), antifúngicos (qual), DBP, retinopatia da prematuridade, doença metabólica óssea, Losec/IBP, sangue nas fezes,

procedimentos cirúrgicos (qual), icterícia, fototerapia, transfusão sanguínea, reanimação, colostroterapia (dias), dias para início da dieta enteral, dias na dieta plena enteral, dias de nutrição parenteral periférica, uso de FM, uso de fórmula infantil durante a internação (qual), dieta na alta, dias de internação e óbito. Os quais foram retirados dos prontuários médicos de cada paciente.

4.4 RESTAURAÇÃO DA MICROBIOTA DO LEITE

As mães que aceitaram participar do estudo, compreenderam e assinaram o TCLE (Anexo 1) foram encaminhadas ao banco de leite humano da maternidade logo após internação na UTI-neonatal, para que pudessem 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, o leite foi etiquetado e colocado sob refrigeração. O processo de inoculação do LD com o LM cru ocorreu da seguinte forma: foi coletado LM e misturado com LD em uma proporção de 10% do LM e 90% do LD (CACHO et al., 2017). Essa mistura foi colocada em uma estufa própria a 37 °C por um período de 4h. Em seguida, guardado em recipiente em geladeira por um período de até 24h.

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 estavam dentro dos procedimentos indicados para cada caso e rotineiramente realizados na Maternidade Carmela Dutra. Assim, no caso da adição (em 10%) de LM ao LD, foi realizada quando a mãe já produzia pelo menos 10% do volume total do leite prescrito para seu próprio filho. Já os casos de não suplementação corresponderam àqueles casos nos quais a mãe não produziu leite ou ela apresentou alguma característica que dificultasse a realização da amamentação direta ou da ordenha do leite ou a não produção da quantidade mínima necessária para a inoculação do LD.

4.5 COLETA, ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A fim de analisar a microbiota fecal dos RNs, eles foram divididos em dois grupos de acordo com o tipo predominante de dieta, podendo ser (> 95% do volume total) em: LD ou LD-R. As amostras de fezes dos RNs prematuros foram coletadas a partir das fraldas que foram preservadas pelos membros da equipe da UTI-neonatal durante a atenção de rotina dos RNs em três tempos: uma no primeiro dia de vida, uma no quinto dia e a última no décimo dia do nascimento.

Todas as amostras de fezes coletadas foram mantidas refrigeradas por, no máximo, 24 horas em geladeira na UTI neonatal até a sua entrega aos membros do time de pesquisa do Laboratório de Imunorregulação (iREG) e do Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) da UFSC. Todos os materiais necessários para a coleta e transporte das amostras foram fornecidos pelos laboratórios da UFSC.

O transporte das amostras foi realizado em caixas e sacolas térmicas e transportadas aos laboratórios da UFSC para alíquotagem. O conteúdo presente nas fraldas foi dividido em três alíquotas de até 500 mg, dois tubos continham a amostra de fezes pura e no terceiro tubo foi adicionado 500 µl de DNA/RNA shield™ (Zymo Research). 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 39 amostras do terceiro tempo (fezes do décimo dia de vida do RN). Essas amostras foram enviadas para a empresa contratada em duas levadas: a primeira com 16 amostras e a segunda com 23 amostras.

4.6 EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Para extração de DNA metagenômico, foram utilizados 250 mg das amostras de fezes com o kit Quick-DNA Soil/Fecal Microbe (Zymo Research). A qualidade dos DNAs extraídos foi verificada por meio da quantificação em Nanodrop (Thermo Scientific™). A região V3 a V4 do gene da subunidade ribossomal 16S foi amplificada utilizando 20 ng de DNA, com os primers 357F/805R em sistema GoTaqG2 (Promega), de acordo com protocolo validado da Illumina.

Primers utilizados na amplificação:

16S_357F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCW
GCAG

16S_805R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTA
TCTAATCC

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

4.7 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

O primeiro grupo de amostras (n=16) sequenciadas resultou em sequências de ótima qualidade com alto número de leituras por amostra, no entanto, o segundo grupo de amostras (n=23) resultou em sequências de baixa qualidade (em especial a fita antisense, R2), com número baixo de leituras por amostra (o que se agravou após etapas de filtragens das análises). Diante desse cenário, repetiu-se o sequenciamento do segundo grupo (ou apenas algumas das amostras) mais duas vezes, na tentativa de obter melhores resultados, sem sucesso. Portanto a solução encontrada para melhor aproveitamento dos dados obtidos foi de analisar em conjunto, usando os dados dos três sequenciamentos do segundo grupo de amostras.

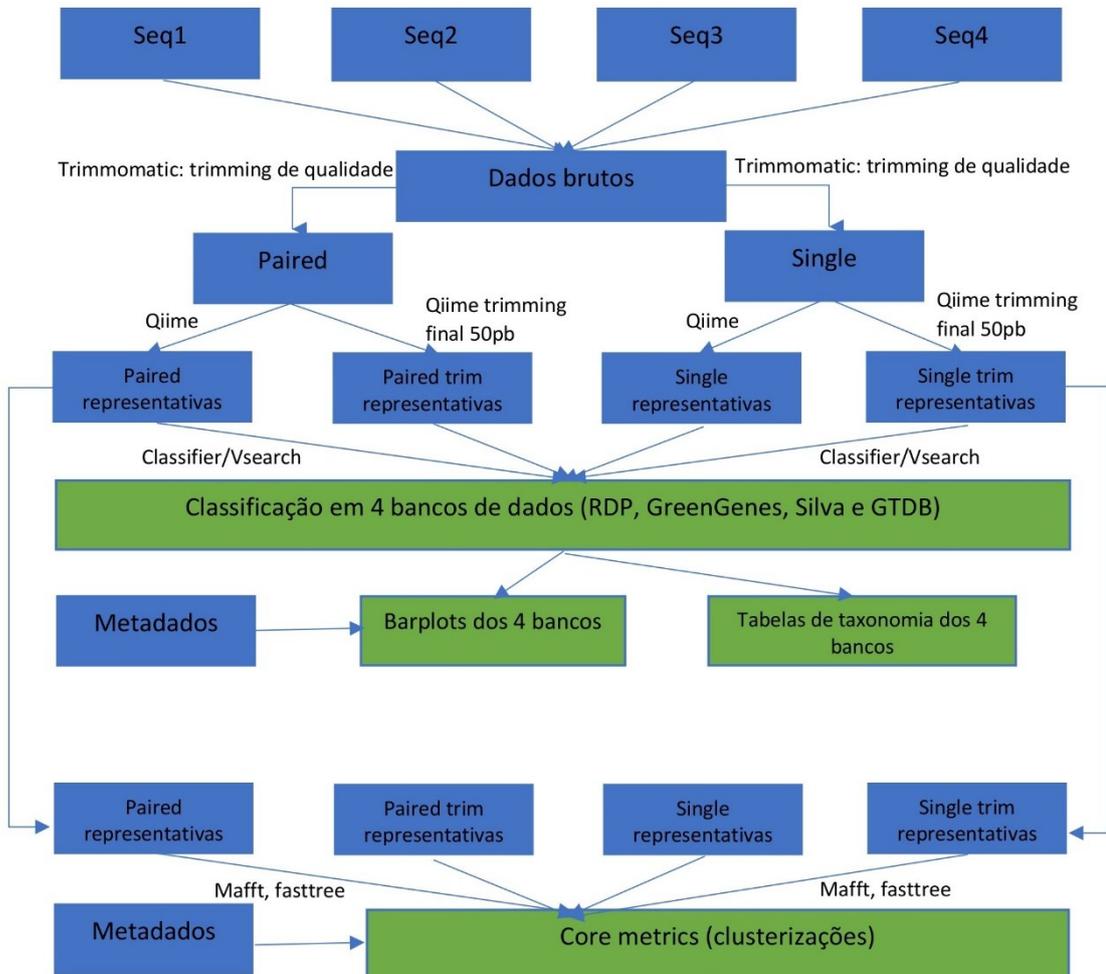
A análise das sequências geradas foi realizada por protocolos validados para análise da composição microbiana de amostras geradas por metabarcoding. Inicialmente, foi realizada a análise da qualidade das sequências com o programa FastQC (ANDREWS, 2010). Em seguida, os dados brutos passaram por corte de qualidade com o programa Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Na etapa seguinte foi utilizada a plataforma QIIME 2TM (BOLYEN et al., 2019), onde as sequências trimadas passaram por mais 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 (KATO et al., 2002). Posteriormente, foi feita então a identificação taxonômica com pacote Classifier/Vsearch (BOKULICH et al., 2018) e o banco 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 50pb, dados apenas do R1 e dados apenas do R1 trimando 50pb), para que fosse possível escolher um protocolo que apresente os resultados de forma mais confiável e com maior profundidade (maior número de espécies), o fluxograma do trabalho está representado na figura 1.

Por fim, a taxonomia atribuída pelo banco de dados de escolha com o tipo de tratamento de dados selecionado foi organizada em tabelas que foram importadas para os softwares de análise estatística R Studio versão 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022) e STAMP versão 2.1.3 (PARKS et al., 2014). Para obtenção da representação gráfica de abundância absoluta e relativa ou de diversidade alfa e beta, foram utilizados os pacotes phyloseq

(MCMURDIE; HOLMES, 2013), tidyverse (WICKHAM et al., 2019) e ggplot2 (WICKHAM, 2016) no R Studio. Enquanto que a representação gráfica da proporção de sequências identificadas para cada gênero foi obtida através da interface do STAMP.

Figura 1 - Fluxograma do tratamento de dados.



Legenda: Seq: sequenciamento. Trimming/trim: corte/cortado. Paired: dados pareados. Single: apenas R1.

Fonte: Elaborado por colaboradores (2023).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realizar as análises estatísticas dos dados clínicos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA). Para variáveis numéricas foram aplicados testes de normalidade, seguidos do teste t de Student para amostras independentes quando os dados seguiam distribuição normal ou testes Mann-Whitney e Kolmogorov-Smirnov quando não seguiam a normalidade. E para comparação das variáveis categóricas foi aplicado o teste Qui-quadrado ou teste Exato de

Fisher (se frequência absoluta de casos fosse menor que 5 para alguma das caselas das tabelas de contingência analisadas). Por fim, os dados foram organizados em uma tabela apresentada na sessão de resultados, variáveis numéricas foram descritas por média e desvio-padrão (DP), enquanto que variáveis categóricas foram descritas a partir da distribuição de frequências em porcentagem.

Para calcular o valor da diferença entre proporções de sequências identificadas como cada gênero por grupos foram aplicados os testes T de Welch (quando comparados dois grupos) e ANOVA com teste Tukey-Kramer como post-hoc (quando comparados três grupos) através do STAMP.

Por fim, foi utilizado o R Studio para análise da alfa diversidade, empregando os índices Observed, Shannon, Simpson e o de Simpson Invertido (InvSimpson). Primeiro foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida, se eram analisados apenas dois grupos, aplicou-se o teste T de Welch (quando seguia a distribuição normal) ou o teste de Wilcoxon (quando não seguia a distribuição normal). No caso da análise de alfa diversidade para mais de dois grupos foi aplicado o teste ANOVA seguido do teste de Tuckey (quando seguia a distribuição normal) ou o teste de Dunn (quando não seguia a distribuição normal). E para beta diversidade foi utilizada a representação gráfica da análise de coordenadas principais (PCoA), através da matriz de distância pelo método de Bray-curtis, com posterior análise de significância por teste de homogeneidade de dispersões multivariadas, teste de permutações de adonis e post-hoc com teste de Tukey para verificar comparações de médias entre grupos, também através do R Studio.

Em todos os testes descritos o nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

No projeto como um todo, foi realizada a coleta e armazenamento de 240 amostras de fezes, referente a 80 RNs em três tempos diferentes, e 216 amostras de leites (incluindo três tipos de leite LM, LI e LP) referente a 36 mães em dois tempos diferentes.

Os resultados apresentados neste trabalho referem-se aos RNs, e suas mães, que tiveram amostras devidamente sequenciadas. Foram 39 RNs, 18 do grupo controle e 21 do grupo intervenção, e as amostras aqui estudadas são referentes ao terceiro tempo do estudo, ou seja, dez dias após o nascimento. Além disso, foram estudadas 36 mães, sendo 17 do grupo controle e 19 do grupo intervenção, das quais três são mães de gêmeos. Somente as 19 mães do grupo intervenção tiveram amostras de leite coletadas, tendo em vista que as mães do

grupo controle não possuíam leite suficiente, ou nenhum, para doarem ao estudo, e justamente por isso foram alocadas nesse grupo.

5.1 RESULTADOS CLÍNICOS

De forma geral, os RNs do estudo nasceram com IG em torno de 29 semanas e seis dias, na média. A maioria dos RNs (82,05%) se enquadram na classificação de “muito pré-termo” (MPT), a qual inclui nascimentos entre 28 a 31 semanas e seis dias, e apenas 7 RNs (17,95%) classificam-se como “extremo pré-termo” (EPT), ou seja, nascidos com menos de 28 semanas de IG (HARRISON; GOLDENBERG, 2016).

A média do peso ao nascer dos RNs estudados foi de aproximadamente 1.339 gramas, do comprimento corporal foi de 38 cm e a média do perímetro cefálico foi de 27 cm. Boa parte dos RNs (43,59%) classificam-se como possuindo “baixo peso ao nascer” (BPN), classificação que abrange neonatos com menos de 2.500 g ao nascer; 35,90% enquadram-se na classificação “muito baixo peso ao nascer” (MBPN), ou seja, apresentando menos de 1.500 g ao nascer; e 20,51% foram classificados como “extremo baixo peso ao nascer” (EBPN), neonatos nascidos com menos de 1.000 g (CUTLAND et al., 2017). Apesar das proporções apresentadas, apenas 3 RNs do estudo (2 no grupo intervenção e 1 no grupo controle) foram classificados como “pequenos para a idade gestacional”, ou seja, neonatos cujo peso ao nascer estava abaixo do décimo percentil da população de referência, de acordo com a IG (CUTLAND et al., 2017). Ademais, 64,10% dos neonatos eram do sexo feminino e apenas 35,90% eram do sexo masculino.

A distribuição de RNs pelo tipo de parto foi equivalente, com 51,28% nascidos por cesárea e 48,72% por parto vaginal. Essa quantidade de partos do tipo cesárea influenciou no tanto de mães fazendo uso de antibióticos (83,33%), já que 9 das 30 mães que utilizaram, fizeram o uso pontualmente para profilaxia devido ao tipo de parto, o restante das 21 mães que fizeram o uso foi com a finalidade de combater alguma infecção durante a gestação (36,11% das mães) e/ou uma infecção nos primeiros dias após o parto (22,22% das mães). Para mais informações sobre os antibióticos utilizados pelas mães do estudo e sobre as infecções ou comorbidades que elas apresentaram, verificar os Anexos 2 e 3, respectivamente.

A maioria dos RNs do estudo fizeram uso de antibióticos (66,67%) e de fortificante de leite materno (71,79%) antes do momento da coleta das amostras (para saber quais antibióticos foram utilizados pelos RNs e por quantos dias cada um deles utilizaram o FM verificar os Anexos 4 e 5, respectivamente). 15,38% dos neonatos apresentaram quadro de sepsis tardia, e 43,59% apresentaram resultados de cultura positivos em algum momento

durante o período de hospitalização. Para 9 dentre os 17 RNs que tiveram resultados de cultura positivos, a coleta da amostra para cultura foi feita antes do dia de coleta da amostra de fezes para o estudo, os quais serão analisados em uma próxima sessão como o grupo de RNs com infecção (para mais detalhes ver Anexo 6). Dois RNs do estudo apresentaram casos de sepse precoce presumida (um controle e outro intervenção), outros dois, casos de ECN (ambos controles), e nenhum deles fez uso de fórmula infantil antes do período de coleta de amostras.

Uma proporção menor de mães em ambos os grupos apresentou quadros de diabetes mellitus gestacional (DMG) ou de hipertensão arterial sistêmica (HAS). E, apesar do grupo intervenção ter uma maior quantidade de mães apresentando essas comorbidades que o grupo controle, a diferença não é significativa estatisticamente.

Através da separação dos dados entre os dois grupos, apresentados na tabela 1, foi possível notar que os RNs do grupo controle eram levemente mais velhos (maior média de idade gestacional), mais pesados (maior média de peso ao nascer) e maiores em tamanho e perímetro cefálico, mas todos esses parâmetros sem diferença estatística entre os grupos. Também foi possível perceber que os RNs do grupo intervenção atingiram a dieta enteral em menos dias (na média), aguentaram receber alimentação por via oral por mais tempo (na média) e tiveram uma menor proporção de indivíduos com culturas positivas e com quadro de sepse tardia ao longo do período de internação, em comparação aos RNs do grupo controle. Porém, não foi identificada diferença significativa entre os neonatos do grupo controle e os do grupo intervenção em nenhum parâmetro analisado, sugerindo que a intervenção na dieta não provocou um efeito clínico para essa parcela dos RNs avaliada. Assim como não houve diferença significativa entre os grupos em nenhuma das características clínicas citadas anteriormente, denotando a homogeneidade dos indivíduos entre os grupos analisados.

Não foi possível apresentar dados relativos ao peso e estado nutricional materno devido a limitações apresentadas pelos profissionais da maternidade responsáveis pelas entrevistas com as mães. Apesar disso, os prontuários médicos das mães avaliadas nesse trabalho relatam que todas estavam se alimentando bem nos primeiros dias do puerpério.

Tabela 1– Características clínicas dos RNs e das mães.

Dados dos RNs	Grupo Controle (n=18)	Grupo Intervenção (n=21)
<i>Idade gestacional (semanas)</i>	29,98 ± 1,65	29,55 ± 1,83
<i>Peso ao nascer (g)</i>	1407,78 ± 342,95	1280,48 ± 346,69
<i>Tamanho (cm)</i>	39,07 ± 2,91	37,64 ± 3,22
<i>Circunferência da cabeça (cm)</i>	27,97 ± 2,14	26,86 ± 2,31
<i>Início da dieta enteral plena² (dias)</i>	13,22 ± 14,27	12,24 ± 8,93
<i>Período em NVO¹ (dias)</i>	2,50 ± 2,36	2,05 ± 2,36
<i>Tipo de parto</i>		
Cesáreo	25,64% (n=10)	25,64% (n=10)
Vaginal	20,51% (n=8)	28,21% (n=11)
<i>Gênero do RN</i>		
Feminino	28,21% (n=11)	35,90% (n=14)
Masculino	17,95% (n=7)	17,95% (n=7)
<i>Classificação de prematuridade</i>		
EPT	5,13% (n=2)	12,82% (n=5)
MPT	41,03% (n=16)	41,03% (n=16)
<i>Classificação de peso ao nascer</i>		
EBPN	7,69% (n=3)	12,82% (n=5)
MBPN	15,38% (n=6)	20,51% (n=8)
BPN	23,08% (n=9)	20,51% (n=8)
<i>Uso de antibióticos¹</i>		
Sim	25,64% (n=10)	41,03% (n=16)
Não	20,51% (n=8)	12,82% (n=5)
<i>Uso de fortificante de leite materno¹</i>		
Sim	28,21% (n=11)	43,59% (n=17)
Não	17,95% (n=7)	10,26% (n=4)
<i>Sepse tardia²</i>		
Sim	5,13% (n=2)	10,26% (n=4)
Não	41,03% (n=16)	43,59% (n=17)
<i>Culturas positivas²</i>		
Sim	23,08% (n=9)	20,51% (n=8)
Não	23,08% (n=9)	33,33% (n=13)
Dados das mães:	Controle (n=17)	Intervenção (n=19)
<i>Idade (anos)</i>	26,29 ± 5,91	31,11 ± 8,77
<i>Raça</i>		

Branca	36,11% (n=13)	44,44% (n=16)
Preta	0,00% (n=0)	5,56% (n=2)
Parda	11,11% (n=4)	2,78% (n=1)
<i>DMG</i>		
Sim	17,65% (n=3)	31,58% (n=6)
Não	82,35% (n=14)	68,42% (n=13)
<i>HAS</i>		
Sim	23,53% (n=4)	26,32% (n=5)
Não	76,47% (n=13)	73,68% (n=14)
<i>Infecção gestacional</i>		
Sim	13,89% (n=5)	22,22% (n=8)
Não	33,33% (n=12)	30,56% (n=11)
<i>Infecção pós-parto¹</i>		
Sim	8,33% (n=3)	13,89% (n=5)
Não	38,89% (n=14)	38,89% (n=14)
<i>Uso de antibióticos¹</i>		
Sim	41,67% (n=15)	41,67% (n=15)
Não	5,56% (n=2)	11,11% (n=4)

Legenda: ¹Contabilizado até o dia de coleta da amostra. ² Contabilizado em qualquer período da internação. NVO: nada via oral. EPT: extremo pré-termo. MPT: muito pré-termo. EBPB: extremo baixo peso ao nascer. MBPN: muito baixo peso ao nascer. BPN: Baixo peso ao nascer. DMG: diabetes mellitus gestacional. HAS: hipertensão arterial sistêmica.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.2 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento obteve um total de 3.859.830 leituras, sendo a média por amostra $98.970 \pm 54.843,83$. A amostra com maior quantidade inicialmente (FP34) possuía 240.665 leituras e a menor (FP29) possuía 5.895 leituras. Após as filtragens no Qiime2, restaram 3.376.484 leituras, com a média de $86.576,51 \pm 52.394,90$ leituras por amostra. A amostra de maior quantidade ao final das filtragens (passou a ser a FP22) ficou com 218.359 leituras e a com o menor (permaneceu a FP29) passou a ter 2.174 leituras.

As sequências obtidas já filtradas foram identificadas em quatro bancos de dados diferentes, GreenGenes, GTDB, Silva e RDP, para depois avaliar qual seria o melhor para prosseguir com a análise dos dados. Para isso foi feita uma contagem do número de espécies identificadas em cada banco de dados. O RDP foi o banco que obteve a maior quantidade de espécies identificadas para a abordagem escolhida (Quadro 1).

Quadro 1 – Número de espécies identificadas por banco de dados.

Banco de Dados	Abordagem	Nº de espécies identificadas
GreenGenes	Paired	34
	Paired/trimmed	40
	Single	48
	Single/trimmed	61
GTDB	Paired	37
	Paired/trimmed	59
	Single	66
	Single/trimmed	86
Silva	Paired	64
	Paired/trimmed	88
	Single	118
	Single/trimmed	128
RDP	Paired	177
	Paired/trimmed	245
	Single	330
	Single/trimmed	379

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

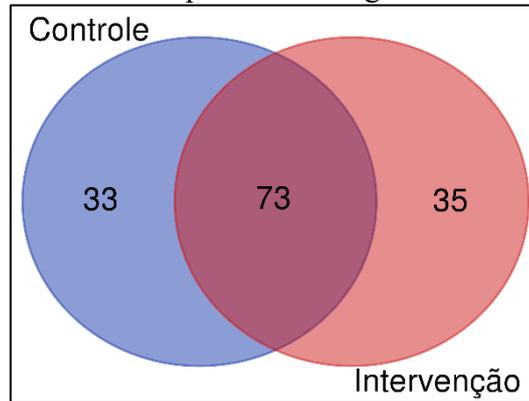
O banco de dados RDP foi capaz de fazer a identificação de 1.636.733 sequências no grupo controle e 1.685.310 no grupo intervenção. Ademais, um total de 22.020 sequências ficaram classificadas como “não identificadas” no grupo controle e 32.421 no grupo intervenção.

Através da identificação taxonômica com o RDP, foi constatada a presença dos filos Proteobacteria e Firmicutes com maior abundância em ambos os grupos de amostras estudadas, no grupo intervenção também foi encontrada uma abundância relativamente alta do filo Bacteroidetes, em seguida também foram identificados os filos Actinobacteria, Fusobacteria, Cyanobacteria, Euryarchaeota, Plantae e Spirochaetes, mas em quantidades muito inferiores aos três citados inicialmente. Gráficos de abundância absoluta e relativa podem ser verificados no Anexo 7.

Apesar dos bancos de dados terem feito a identificação a nível de espécie, optou-se por utilizar o nível de gênero nas avaliações de abundância e diversidade dos táxons encontrados nas amostras devido à maior confiabilidade da identificação desse nível taxonômico para sequências obtidas com o sequenciamento do gene 16S.

Logo, foram analisados 141 gêneros, dos quais 33 estavam presentes exclusivamente nas amostras do grupo controle, 35 presentes exclusivamente nas amostras do grupo intervenção e 73 comuns a ambos os grupos (Figura 2).

Figura 2 - Diagrama de Venn com a quantidade de gêneros identificados em cada grupo.



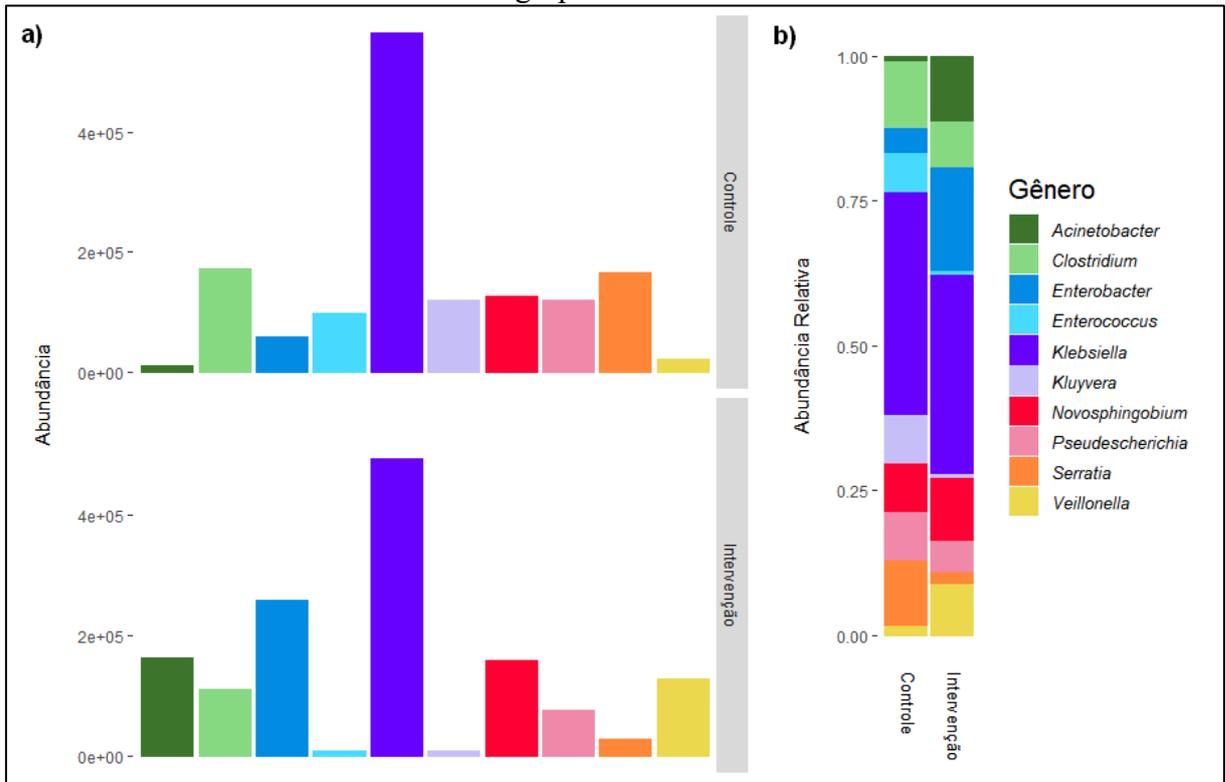
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As análises da microbiota das fezes dos RNs que serão apresentadas em seguida, estão focadas na avaliação da diversidade alfa e beta, e da abundância absoluta e relativa. Para melhor visualização dos resultados, foram selecionados os dez gêneros bacterianos mais abundantes dentre todas as amostras avaliadas para serem exibidos nos gráficos de abundância absoluta e de abundância relativa.

5.2.1 Características da microbiota intestinal dos RNs por grupo do estudo

Dentre os dez gêneros bacterianos identificados em maior quantidade em todas as amostras estudadas, os gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Novosphingobium* e *Veillonella* aparecem em maior abundância nas amostras do grupo intervenção do que nas do grupo controle (Figura 3). Enquanto que os gêneros *Clostridium*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pseudoscherichia* e *Serratia* apresentaram-se em maior quantidade nas amostras do grupo controle que nas do grupo intervenção (Figura 3).

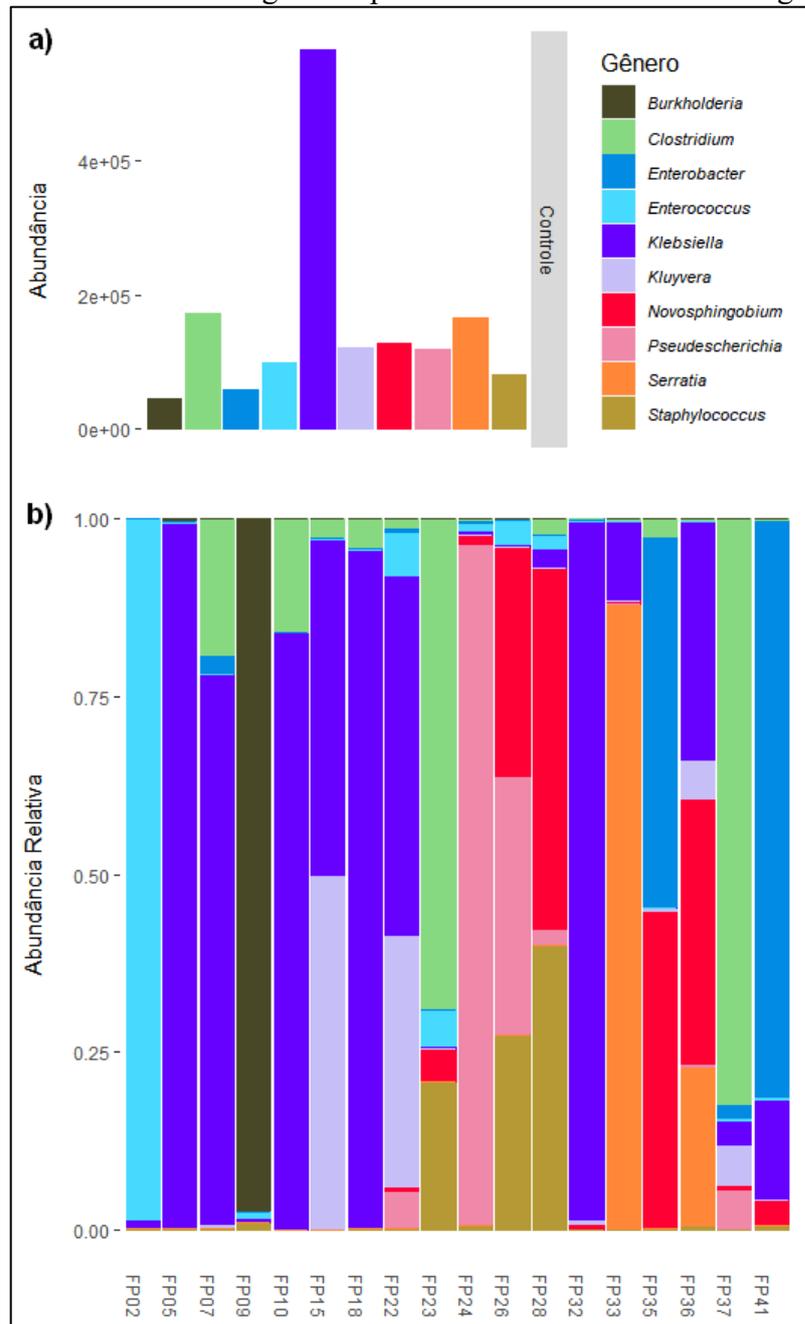
Figura 3 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com os grupos do estudo.



Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras agrupadas.
 Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Quando feito o levantamento dos dez gêneros bacterianos identificados em maior quantidade somente nas amostras do grupo controle, aparecem os gêneros *Staphylococcus* e *Burkholderia* em maior quantidade que *Acinetobacter* sp. e *Veillonella* sp. para este grupo (Figura 4).

Figura 4 – Abundância dos dez gêneros predominantes em amostras do grupo controle.

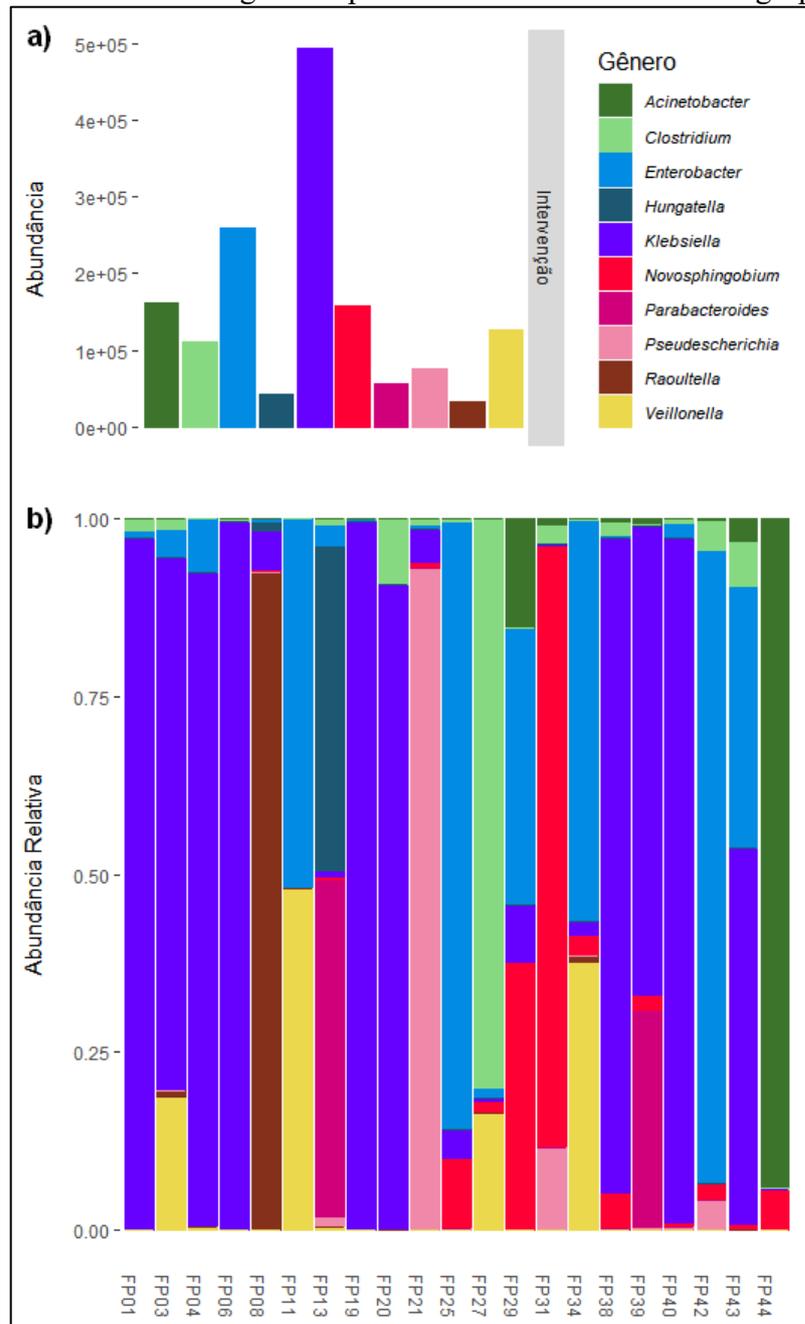


Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras individuais. FP: código identificador das amostras de fezes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Enquanto que no levantamento dos dez gêneros bacterianos identificados em maior quantidade somente nas amostras do grupo intervenção, não aparecem mais os gêneros *Enterococcus*, *Kluyvera* e *Serratia*, dando espaço para os gêneros *Hungatella*, *Parabacteroides* e *Raoultella*, mais abundantes nas amostras desse grupo (Figura 5).

Figura 5 – Abundância dos dez gêneros predominantes em amostras do grupo intervenção.

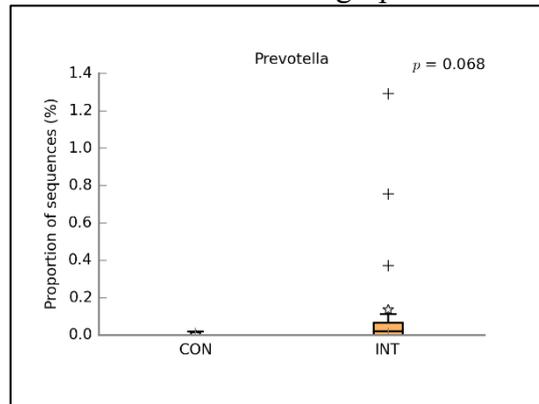


Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras individuais. FP: código identificador das amostras de fezes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No entanto, nenhum dos gêneros identificados no estudo apresentou diferença estatística significativa quando comparada a proporção de sequências entre os grupos controle e intervenção. O gênero que apresentou a maior diferença em sua distribuição foi *Prevotella* sp., estando mais presente em amostras do grupo intervenção (Figura 6).

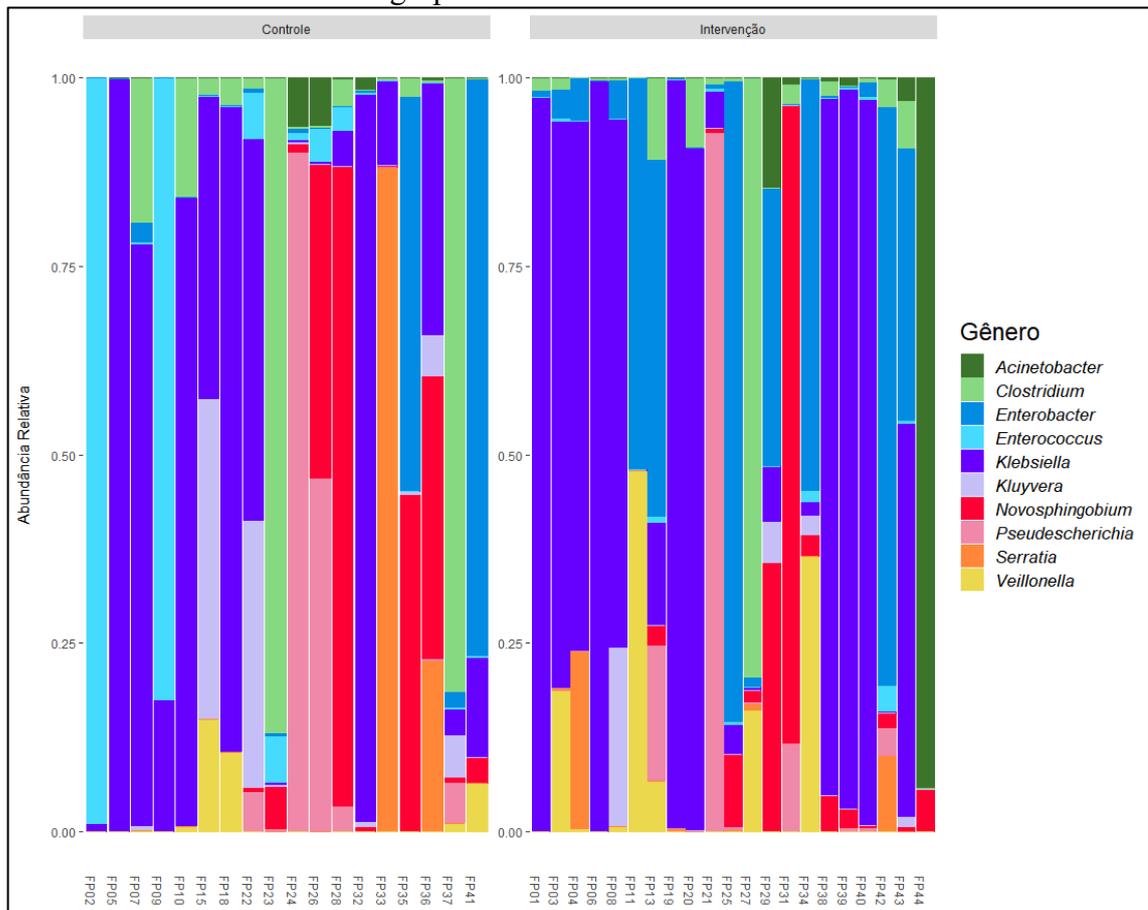
Figura 6 – Proporção de sequências identificadas como *Prevotella* sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com os grupos do estudo.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Através do gráfico de abundância relativa com amostras individuais apresentado na figura 7 é possível notar que muitas das amostras, de ambos os grupos, são bastante dominadas por apenas um gênero bacteriano, sendo *Klebsiella* sp. o gênero com maior predominância dentre as amostras sequenciadas.

Figura 7 – Abundância relativa dos dez gêneros predominantes na microbiota dos RNs de acordo com os grupos do estudo mostrada individualmente.

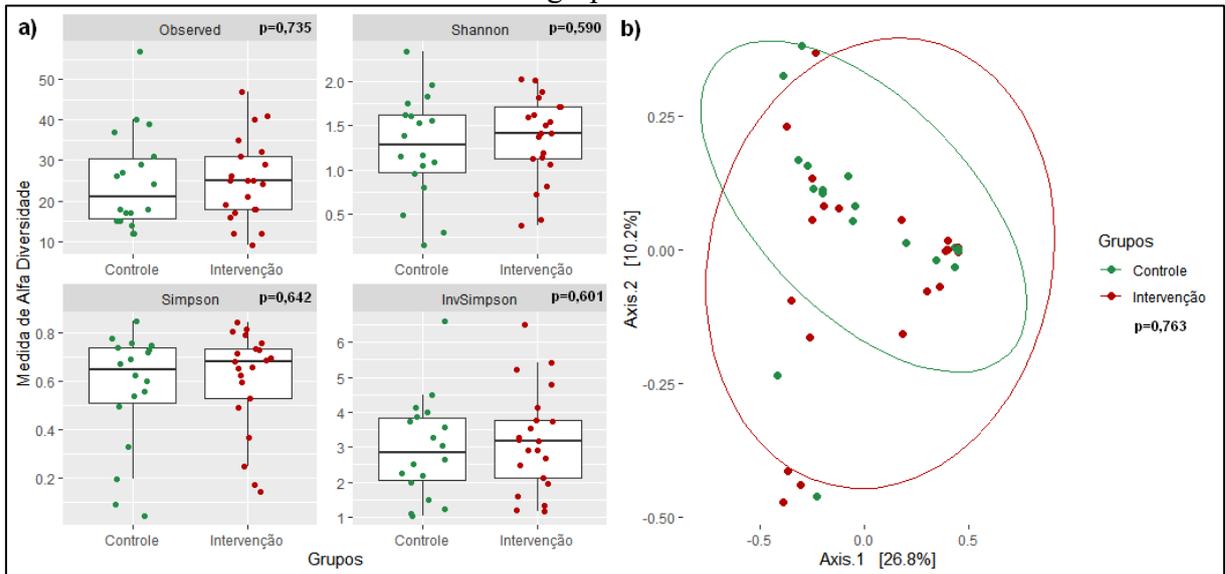


Legenda: FP: código identificador das amostras de fezes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os índices utilizados para avaliar a diversidade alfa indicaram que não houve diferença estatística significativa na riqueza e que a microbiota dos RNs apresentou uma distribuição de abundâncias bastante uniforme entre os grupos controle e intervenção (Figura 8a). De forma semelhante, na PCoA apresentada na figura 8b, comparando as comunidades bacterianas dos grupos estudados, foi encontrada uma proximidade muito grande entre os grupos, sem diferença estatística para beta diversidade.

Figura 8 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com os grupos do estudo.



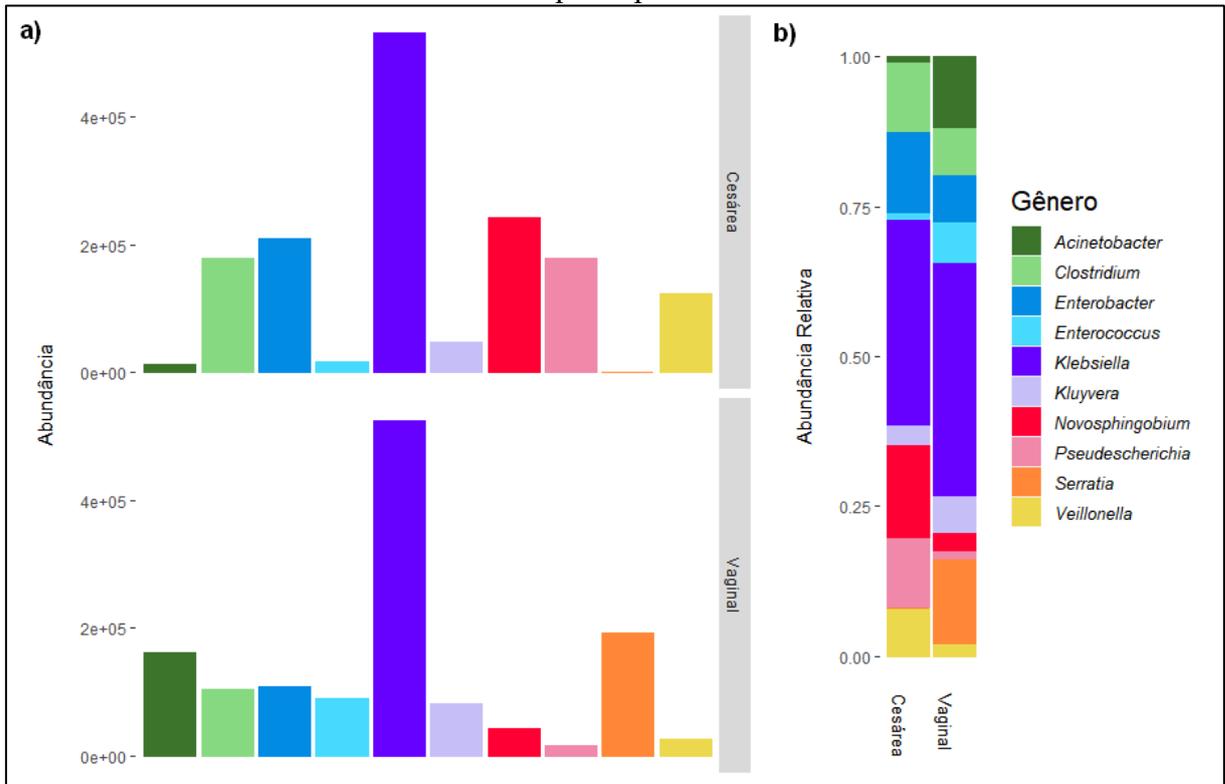
Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.2.2 Influência do tipo de parto na composição microbiana dos RNs

Nesta categoria, é possível notar através da figura 9, que os RNs nascidos por cesárea apresentaram um perfil de microbiota com maior predominância dos gêneros *Clostridium*, *Enterobacter*, *Novosphingobium*, *Pseudodescherichia* e *Veillonella*. Em contrapartida, os RNs nascidos por parto vaginal apresentaram um perfil de microbiota onde os gêneros *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Kluyvera* e *Serratia* são mais predominantes. Já o gênero *Klebsiella* distribuiu-se de forma equivalente entre as amostras dos RNs nascidos por ambos os tipos de parto.

Figura 9 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com o tipo de parto.



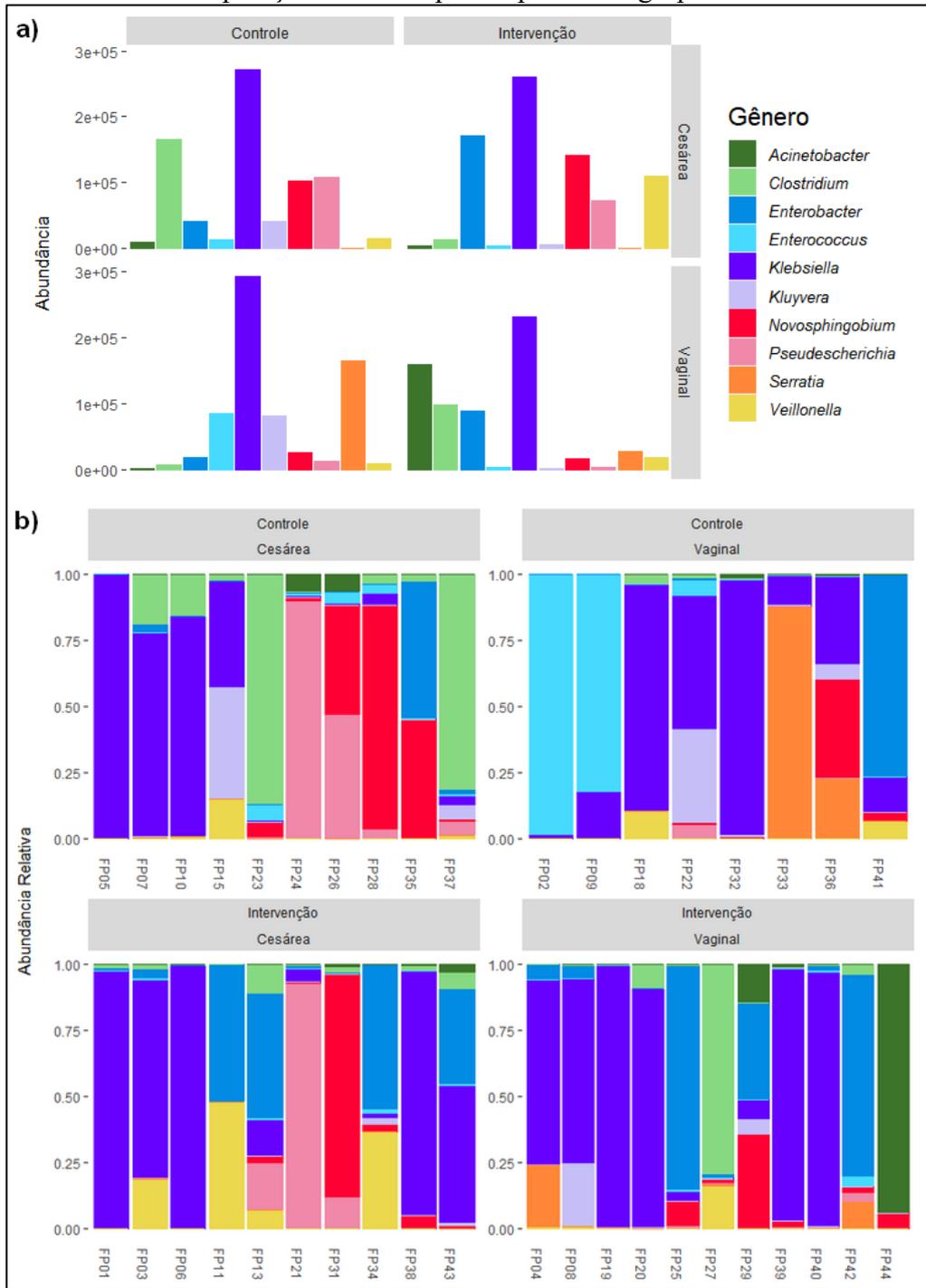
Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras agrupadas.
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Quando analisada a distribuição dos gêneros na comparação entre os tipos de parto e os grupos controle/intervenção (Figura 10), é possível notar que a predominância do gênero *Acinetobacter* no grupo de amostras de RNs que nasceram de parto vaginal ocorre de forma mais intensificada quando também pertencem ao grupo intervenção, devido à presença das amostras FP44 e FP29.

O gênero *Serratia* apresenta-se em maiores proporções nas amostras de RNs nascidos por parto vaginal, intensificado nas amostras dos controles devido à presença da amostra FP33 (figura 10). Enquanto isso, os gêneros *Novosphingobium* e *Pseudocherichia* estão bem distribuídos nas amostras de parto cesárea em ambos os grupos do estudo, o que sugere que talvez haja maior influência do tipo de parto que a intervenção na dieta para a distribuição desses gêneros. Ao contrário disso, os gêneros *Kluyvera* e *Enterococcus* apresentam-se em maiores quantidades nas amostras do grupo controle, independentemente do tipo de parto (Figura 10a).

Já *Veillonella* sp. está presente em todos os subgrupos, mas se destaca nas amostras do grupo intervenção de RNs nascidos por cesárea (Figura 10a).

Figura 10 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a comparação entre os tipos de parto e os grupos do estudo.



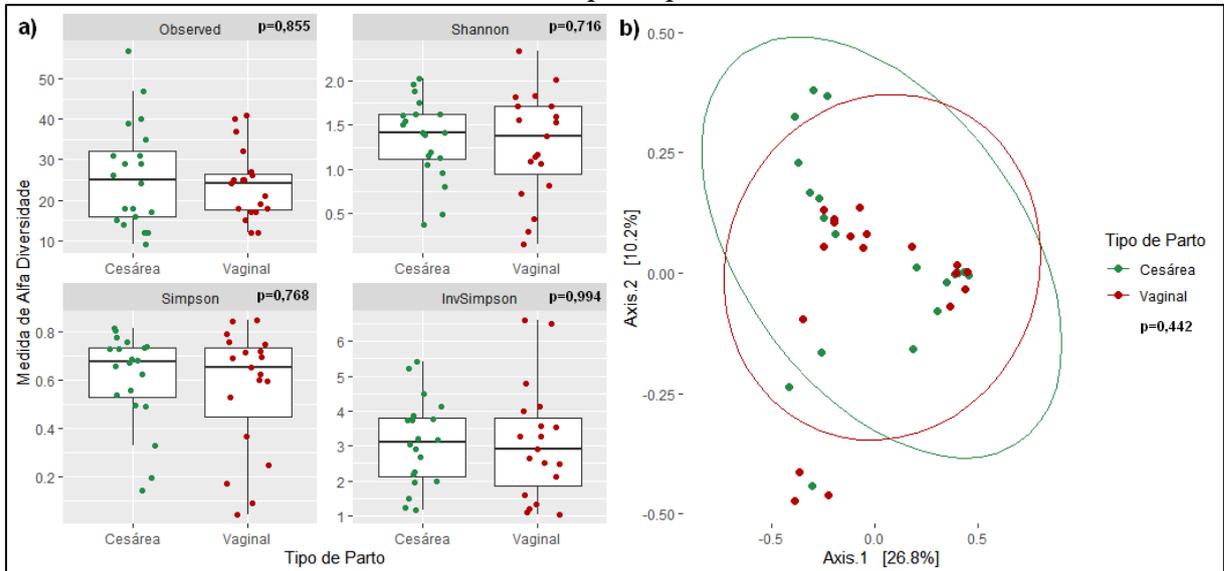
Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras individuais. FP: código identificador das amostras de fezes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As amostras dos RNs nascidos por parto vaginal não apresentaram diferença estatística significativa nas comparações de riqueza e uniformidade da distribuição das abundâncias ou nas comparações de perfil da comunidade microbiana, quando comparadas com amostras de

neonatos nascidos por cesárea, segundo índices utilizados para avaliar a diversidade alfa e testes de permutação para beta diversidade (Figura 11).

Figura 11 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com o tipo de parto.



Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

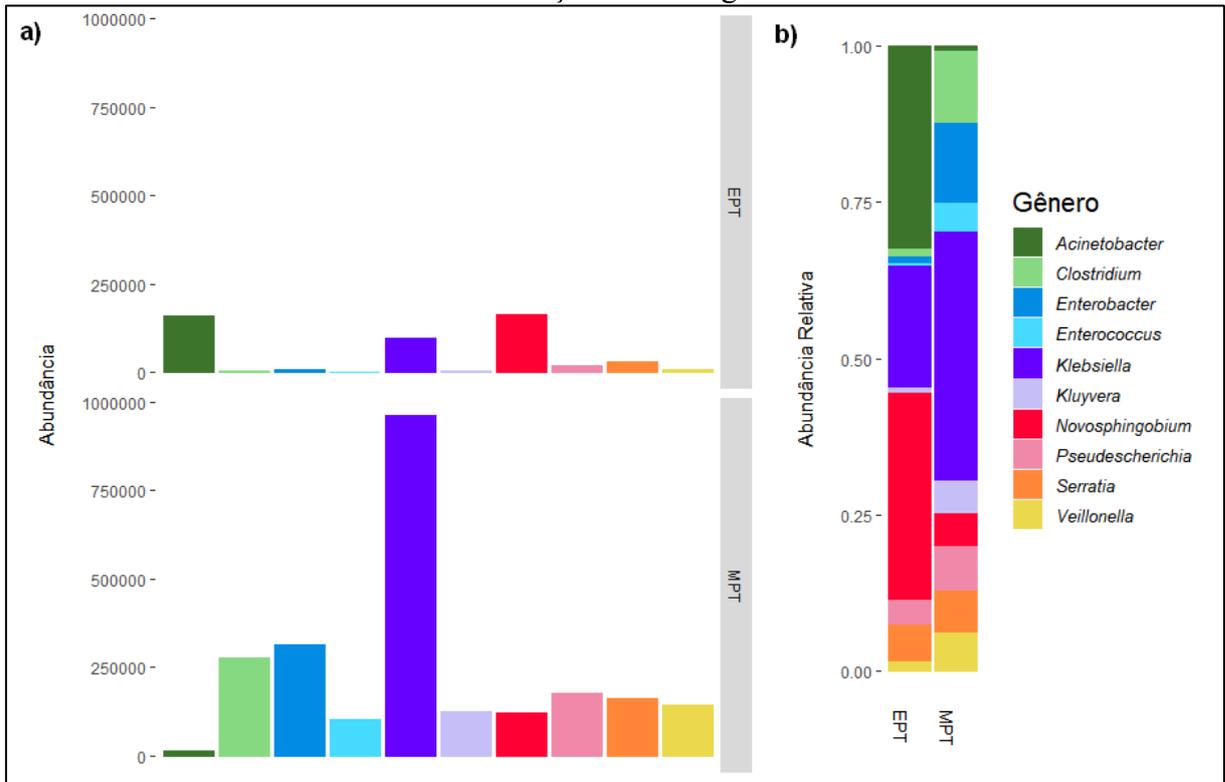
5.2.3 Influência da IG na composição microbiana dos RNs

As amostras dos RNs classificados como EPT apresentaram um perfil de baixa abundância de oito dos dez gêneros predominantes nas amostras estudadas, em comparação aos neonatos MPT. Porém, possuem valor médio de sequências correspondentes aos gêneros *Acinetobacter* e *Novosphingobium* superior aos RNs MPT (Figura 12).

Mesmo estando presente em menores quantidades nas amostras de neonatos EPT, o valor médio de sequências correspondentes ao gênero *Serratia* neste grupo é muito próximo do valor apresentado pelo grupo de RNs MPT, tanto que no gráfico de abundância relativa presente na Figura 12b as barras correspondentes a este gênero em ambos os grupos avaliados possuem tamanhos similares.

Os gêneros *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus* e *Pseudoescherichia* apresentaram diferenças na abundância um pouco maiores, enquanto que *Klebsiella* sp., *Kluyvera* sp. e *Veillonella* sp. apresentaram menores diferenças no valor médio de sequências por grupo.

Figura 12 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a classificação de idade gestacional.

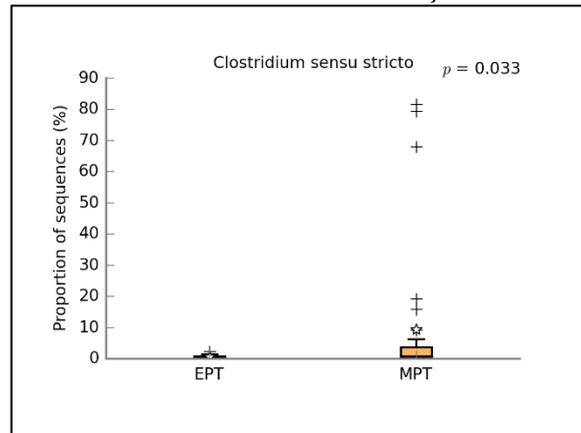


Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras agrupadas. EPT: extremo pré-termo. MPT: muito pré-termo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Estatisticamente, o gênero *Clostridium* apresentou uma diferença significativa ($p=0,033$) em sua distribuição para os grupos de idade gestacional, estando presente de forma mais expressiva no grupo de neonatos MPT (Figura 13).

Figura 13 – Proporção de sequências identificadas como *Clostridium* sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com a classificação de idade gestacional.



Legenda: EPT: extremo pré-termo. MPT: muito pré-termo.

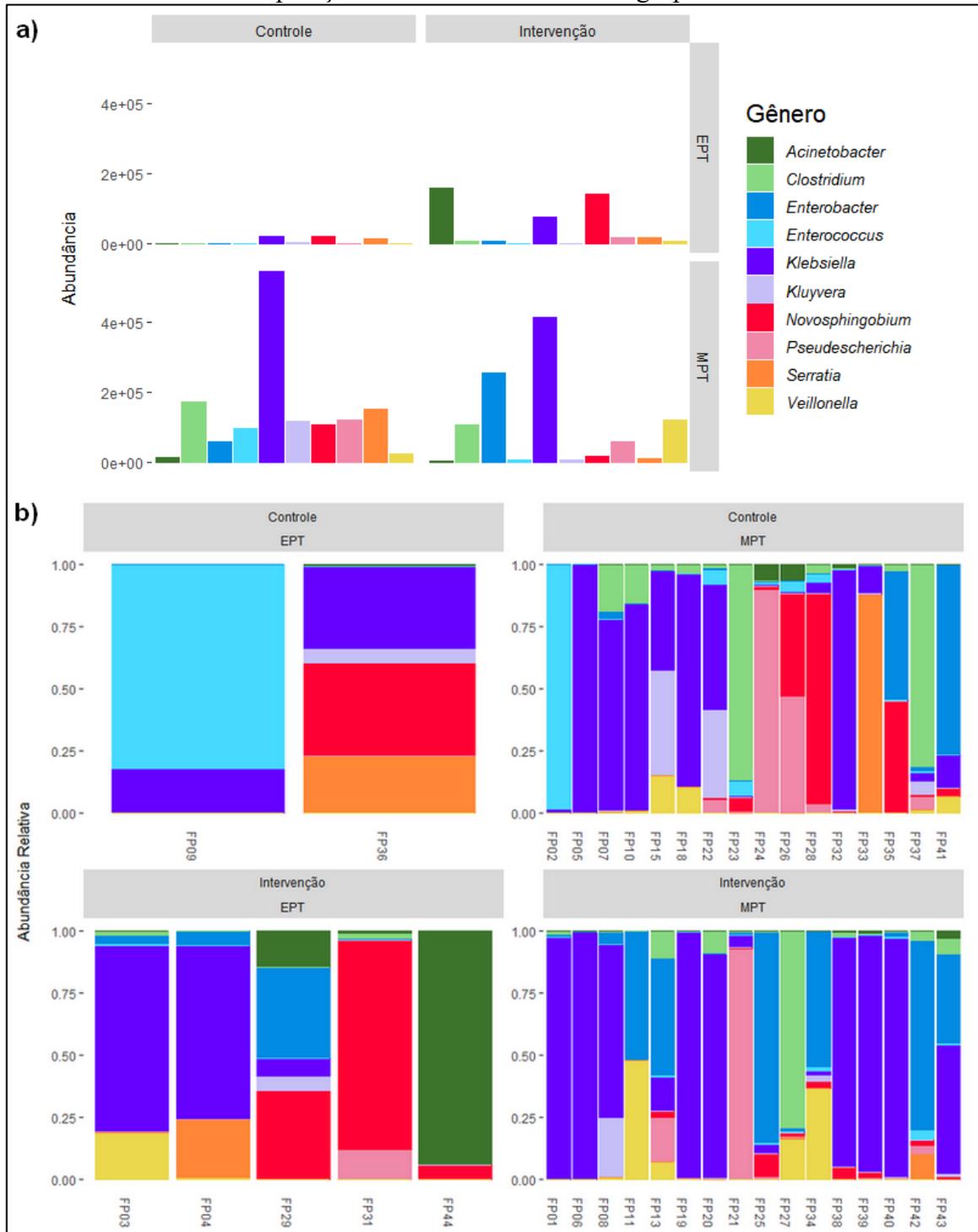
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Apenas dois RNs do grupo controle foram classificados como EPT (FP09 e FP36). Enquanto a amostra FP36 apresentou uma microbiota fecal mais variada, com presença de *Klebsiella* sp., *Novosphingobium* sp. e *Serratia* sp. em boas proporções (Figura 14b), a amostra FP09 aparenta estar dominada por *Enterococcus* sp. quando visualizada a abundância relativa em amostras individuais (Figura 14b), mas na verdade, possui alta predominância do gênero *Burkholderia* (Figura 4b, abundância de gêneros dentro do grupo controle), o que explica a baixa incidência desse táxon de modo geral no subgrupo controle EPT (Figura 14a).

Dentre as amostras dos RNs que foram classificados como EPT e que eram do grupo intervenção, as amostras FP44 e FP29 novamente são responsáveis pela alta incidência de *Acinetobacter* sp., como pode ser visto na figura 14b.

Já o gênero *Novosphingobium*, se apresenta em proporções semelhantes no subgrupo intervenção+EPT e no controle+MPT (Figura 14). De forma contrária, *Kluyvera* sp., *Serratia* sp. e *Enterococcus* sp. parecem se distribuir em maiores proporções nas amostras do subgrupo controle+MPT. Por fim, os gêneros *Clostridium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Veillonella* apresentam-se em proporções maiores no grupo MPT independente da intervenção na dieta (Figura 14).

Figura 14 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a comparação entre a classe de IG e os grupos do estudo.



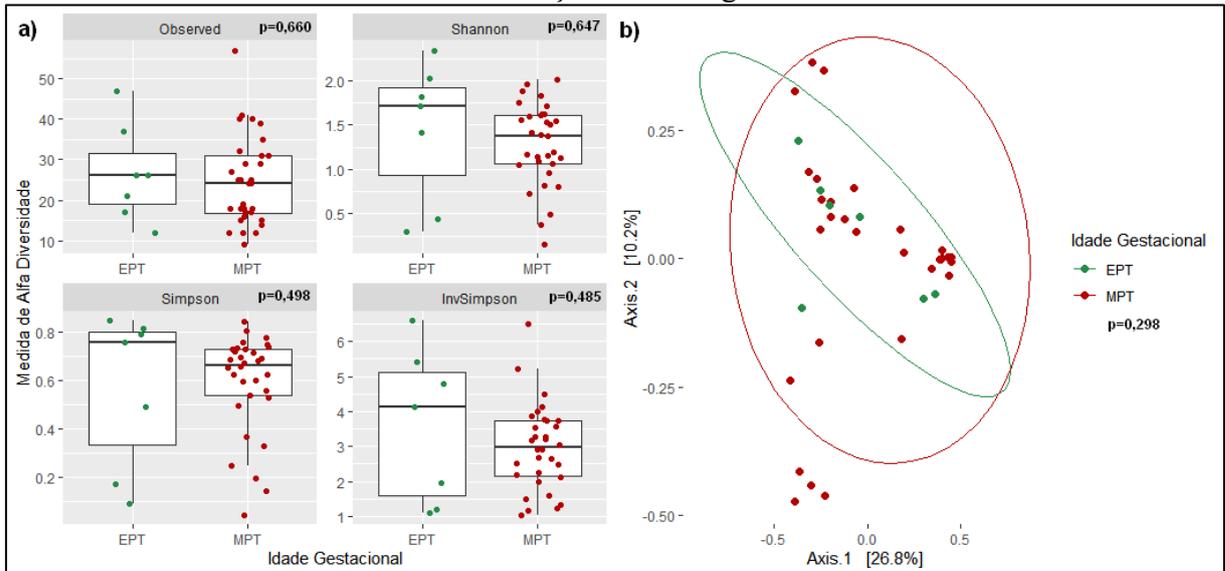
Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras individuais. EPT: extremo pré-termo. MPT: muito pré-termo. FP: código identificador das amostras de fezes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A análise de alfa diversidade das microbiotas dos RNs segundo grupos de IG não apresentou diferença estatística significativa (Figura 15a), de acordo com os índices utilizados. E o gráfico de PCoA para avaliação da influência da IG na composição de

comunidades bacterianas retrata uma maior dispersão das amostras dos RNs classificados como MPT e maior agrupamento das amostras dos RNs classificados como EPT, porém há bastante sobreposição das amostras de um grupo sobre o outro (Figura 15b). Portanto, também não apresentaram diferença estatística para beta diversidade.

Figura 15 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com a classificação de idade gestacional.



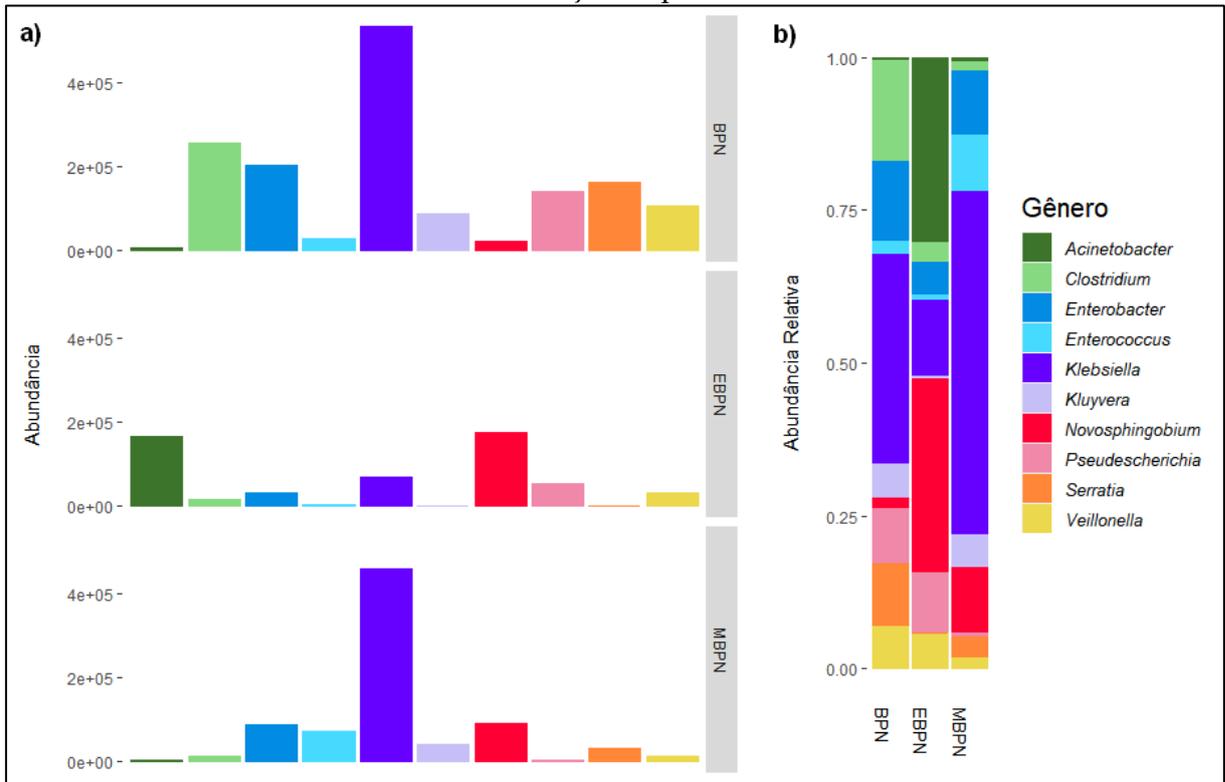
Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis. EPT: extremo pré-termo. MPT: muito pré-termo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.2.4 Influência do peso ao nascer na composição microbiana dos RNs

Na distribuição dos dez gêneros de mais alta incidência, comparando grupos com diferentes classificações de peso ao nascer, o grupo de amostras de neonatos de EBPN apresentou um perfil de abundância com os gêneros *Acinetobacter* e *Novosphingobium* em maiores proporções que os outros grupos (Figura 16). Enquanto que o grupo de amostras de RNs com MBPN teve um perfil com maiores proporções dos gêneros *Klebsiella* e *Enterococcus*, em comparação aos outros grupos (Figura 16). E os seis gêneros restantes apareceram em maiores proporções no grupo BPN (Figura 16), sendo *Clostridium* o gênero que apresentou maior diferença na sua distribuição.

Figura 16 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a classificação de peso ao nascer.

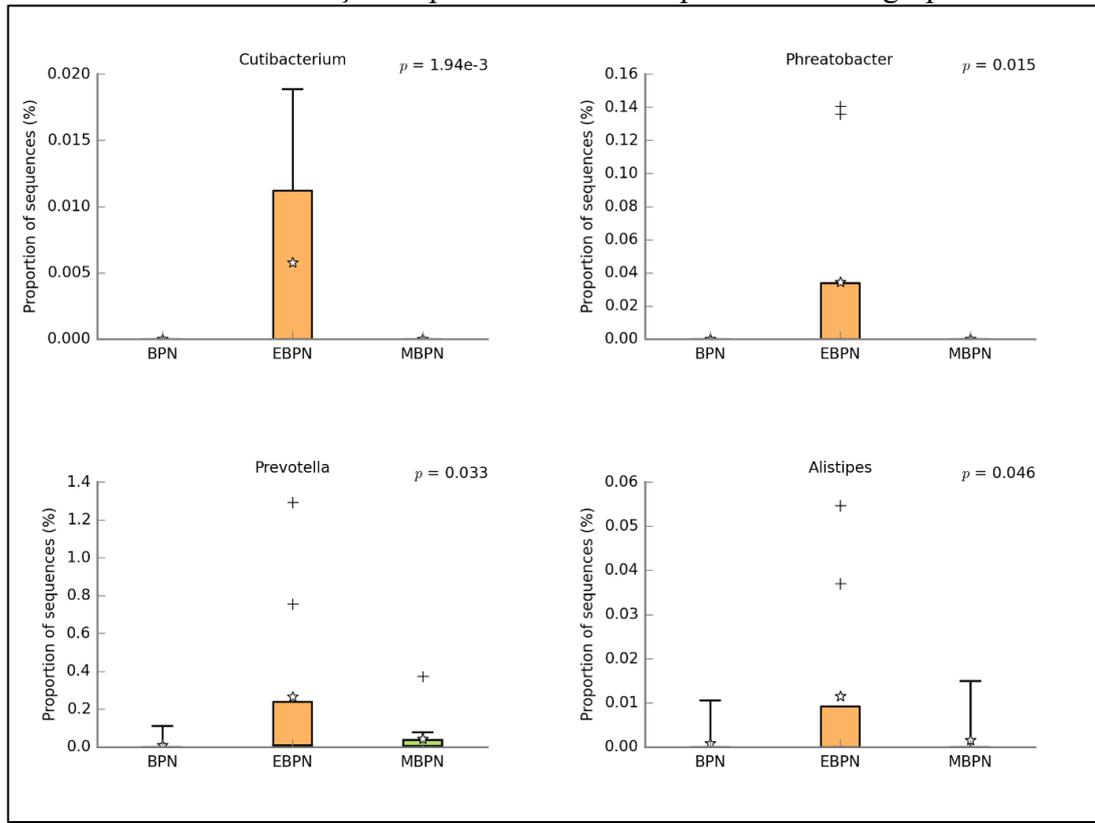


Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras agrupadas. BPN: baixo peso ao nascer. MBPN: muito baixo peso ao nascer. EBPN: extremo baixo peso ao nascer.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Estatisticamente, alguns gêneros bacterianos de menor incidência apresentaram diferenças significativas em sua distribuição, mostrando-se com maior predominância em amostras de RNs com EBPN em relação aos outros grupos de peso ao nascer, são eles: *Cutibacterium* sp. ($p=1,94e^{-3}$), *Phreatobacter* sp. ($p=0,015$), *Prevotella* sp. ($p=0,033$) e *Alistipes* sp. ($p=0,046$). A proporção de sequências desses gêneros por grupo está demonstrada graficamente através da figura 17.

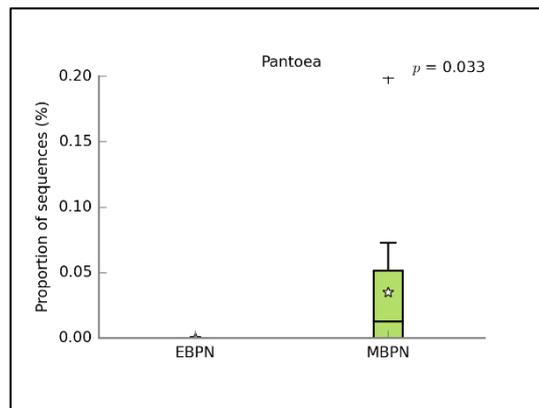
Figura 17 – Proporção de seqüências de gêneros da microbiota intestinal dos RNs de acordo com a classificação de peso ao nascer comparando os três grupos.



Legenda: BPN: baixo peso ao nascer. MBPN: muito baixo peso ao nascer. EBPN: extremo baixo peso ao nascer.
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No grupo de amostras dos RNs com MBPN, o gênero *Pantoea* esteve significativamente aumentado ($p=0,033$), em relação ao grupo de neonatos com EBPN (Figura 18).

Figura 18 – Proporção de sequências identificadas como *Pantoea* sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com a classificação de peso ao nascer comparando os grupos MBPN com EBPN.



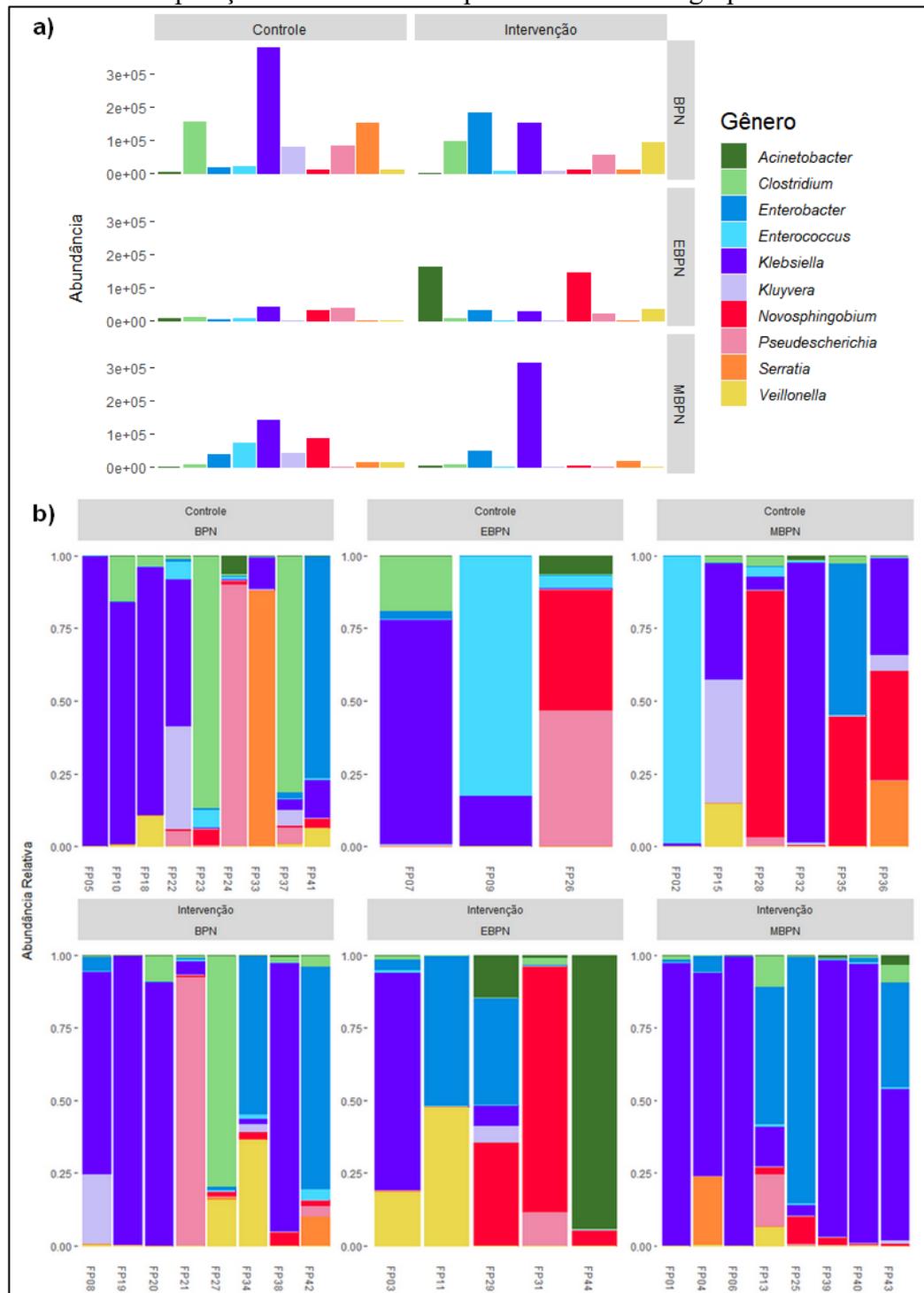
Legenda: MBPN: muito baixo peso ao nascer. EBPN: extremo baixo peso ao nascer.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Quando feita a comparação dos grupos de peso ao nascer com os grupos do estudo (Figura 19b), nota-se que, da mesma forma que na comparação dos grupos de idade gestacional, o gênero *Acinetobacter* prevalece no grupo de EBPN devido à presença das amostras FP44 e FP29. Já o gênero *Serratia* se apresenta em maiores proporções nos grupos MBPN e BPN, tanto no grupo controle, quanto intervenção, mas prevalece no subgrupo controle+BPN com a presença da amostra FP33 (Figura 19b).

O gênero *Clostridium* aparece com maiores quantidades no grupo de BPN independente da intervenção na dieta (Figura 19a). Enquanto que os gêneros *Kluyvera* e *Enterococcus* mal aparecem no grupo de EBPN, estando presentes nos outros dois grupos de peso ao nascer, em especial nas amostras que também são do grupo controle (Figura 19). E *Pseudodescherichia* sp. aparece em quantidades muito baixas no grupo MBPN, distribuindo-se bem nos outros grupos, independente da dieta (Figura 19a).

Figura 19 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a comparação entre a classe de peso ao nascer e os grupos do estudo.



Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras individuais. BPN: baixo peso ao nascer. MBPN: muito baixo peso ao nascer. EBPN: extremo baixo peso ao nascer. FP: código identificador das amostras de fezes.

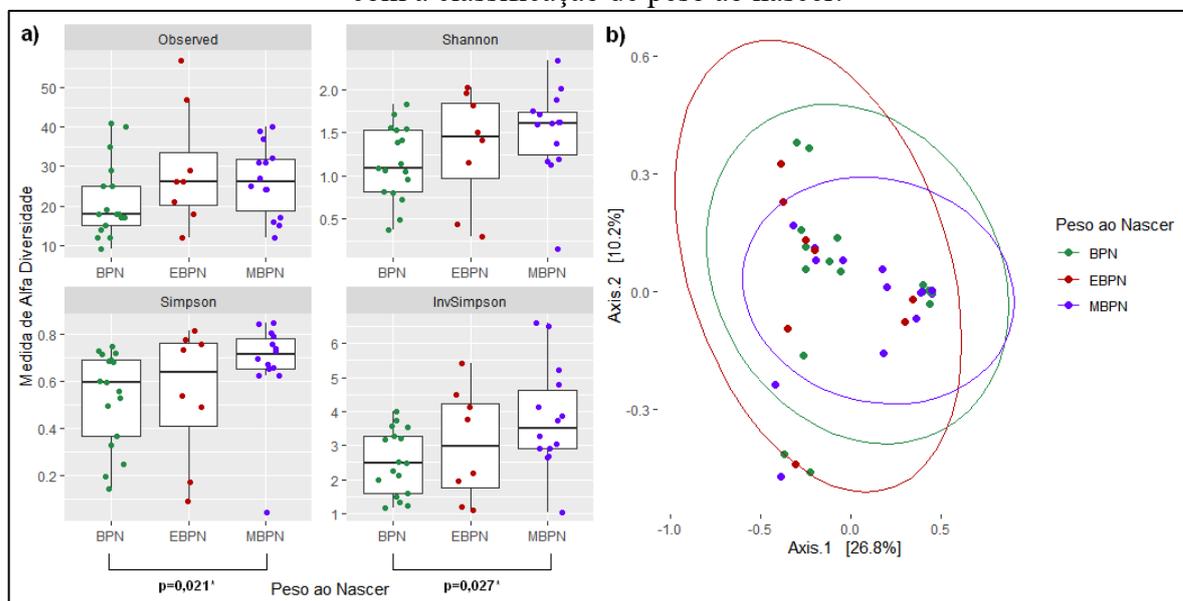
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na análise da alfa diversidade, os índices de Simpson e o InvSimpson acusaram diferença estatística significativa ($p=0,021$ e $p=0,027$, respectivamente) na comparação entre

o grupo de amostras de neonatos com BPN e o grupo de amostras dos RNs com MBPN (Figura 20). O grupo de BPN apresentou menor riqueza e uma distribuição menos uniforme em sua abundância do que o grupo de MBPN, segundo o índice de Simpson, a média do valor de alfa do grupo com BPN foi de 0,532 e do grupo com MBPN foi de 0,678. E com o índice InvSimpson as médias foram de 2,51 para BPN e de 3,81 para MBPN. O restante dos índices para análise de alfa diversidade não apontou diferenças significativas em nenhuma das comparações entre os grupos de amostras (vide tabela no anexo 3).

Entretanto, com auxílio do gráfico apresentado na figura 20, é possível notar que as comunidades bacterianas presentes em cada grupo de amostras de acordo com a classe de peso ao nascer compartilham muitas semelhanças entre si, com todos os três grupos demonstrando ampla dispersão e sobreposição das amostras. Dito isto, os grupos BPN e EBPN aparentam possuir maior proximidade no perfil das comunidades, enquanto que EBPN e MBPN parecem apresentar menor proximidade, mas sem diferenças significativas para nenhuma das comparações. Os valores de diferença calculados para análise de beta diversidade também podem ser verificados na tabela no anexo 8.

Figura 20 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com a classificação de peso ao nascer.



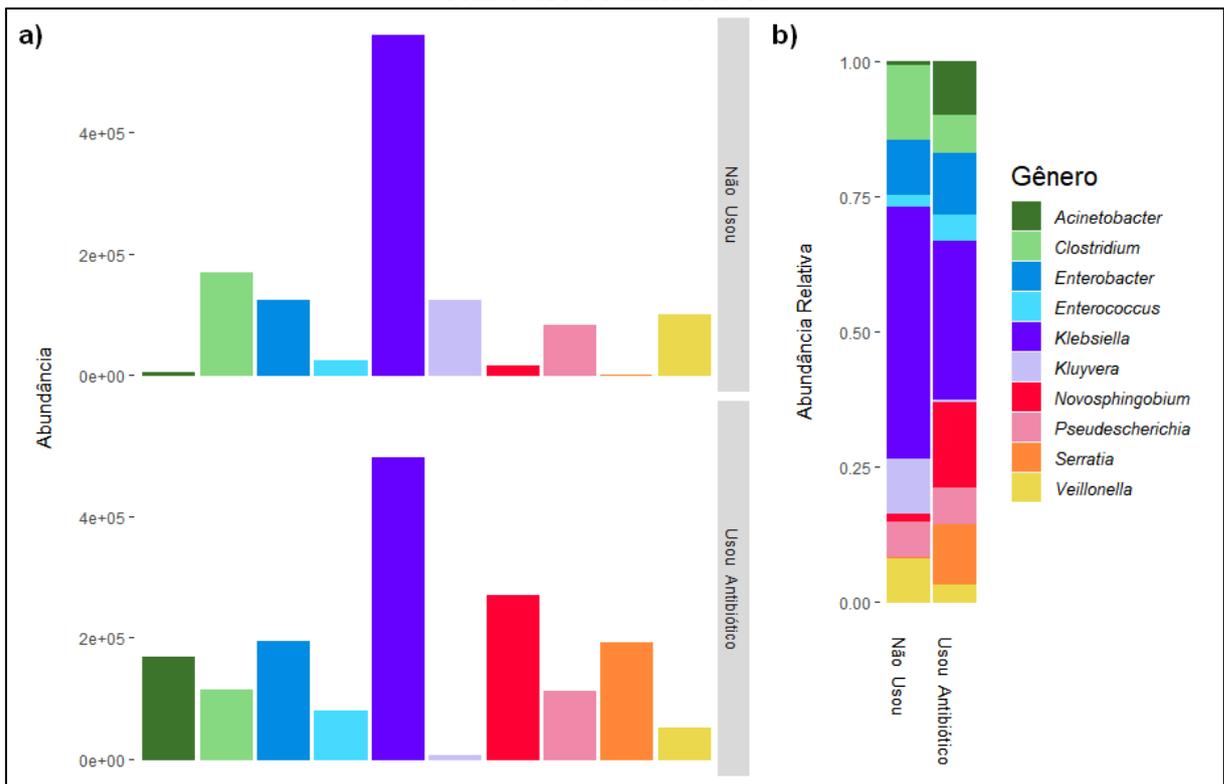
Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis. BPN: baixo peso ao nascer. MBPN: muito baixo peso ao nascer. EBPN: extremo baixo peso ao nascer. *Valores com diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.2.5 Influência do uso de antibiótico pelo RN em sua composição microbiana

Na avaliação da influência do uso de antibiótico pelo RN nos primeiros dias de vida sobre a abundância dos dez gêneros predominantes nas amostras do estudo (Figura 21), nota-se que o grupo de amostras de RNs que utilizaram antibióticos antes da coleta de amostra possui um perfil com os gêneros *Novosphingobium*, *Serratia*, *Acinetobacter* e *Enterococcus* em maiores proporções que o grupo que não fez uso. E, apesar de também apresentar maior abundância absoluta dos gêneros *Enterobacter* e *Pseudomonas* (Figura 21a), nota-se pelas dimensões das barras do gráfico de abundância relativa (Figura 21b), que o grupo que não fez uso apresentou maiores proporções. Os demais gêneros são mais predominantes nas amostras de neonatos que não utilizaram antibiótico, com *Kluyvera* sp. apresentando a maior diferença.

Figura 21 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com o uso de antibióticos.

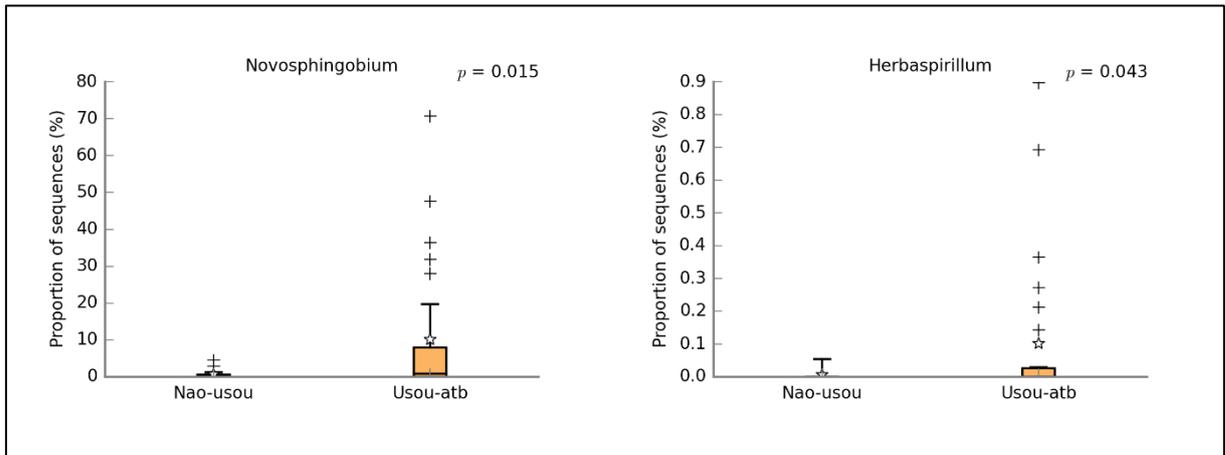


Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras agrupadas.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Estatisticamente, os gêneros *Novosphingobium* ($p=0,015$) e *Herbaspirillum* ($p=0,043$) apresentaram diferença significativa em sua distribuição, estando presentes em maiores proporções no grupo de amostras de RNs que usaram antibiótico (Figura 22).

Figura 22 – Proporção de sequências de gêneros da microbiota intestinal dos RNs de acordo com o uso de antibiótico.



Legenda: atb: antibiótico.

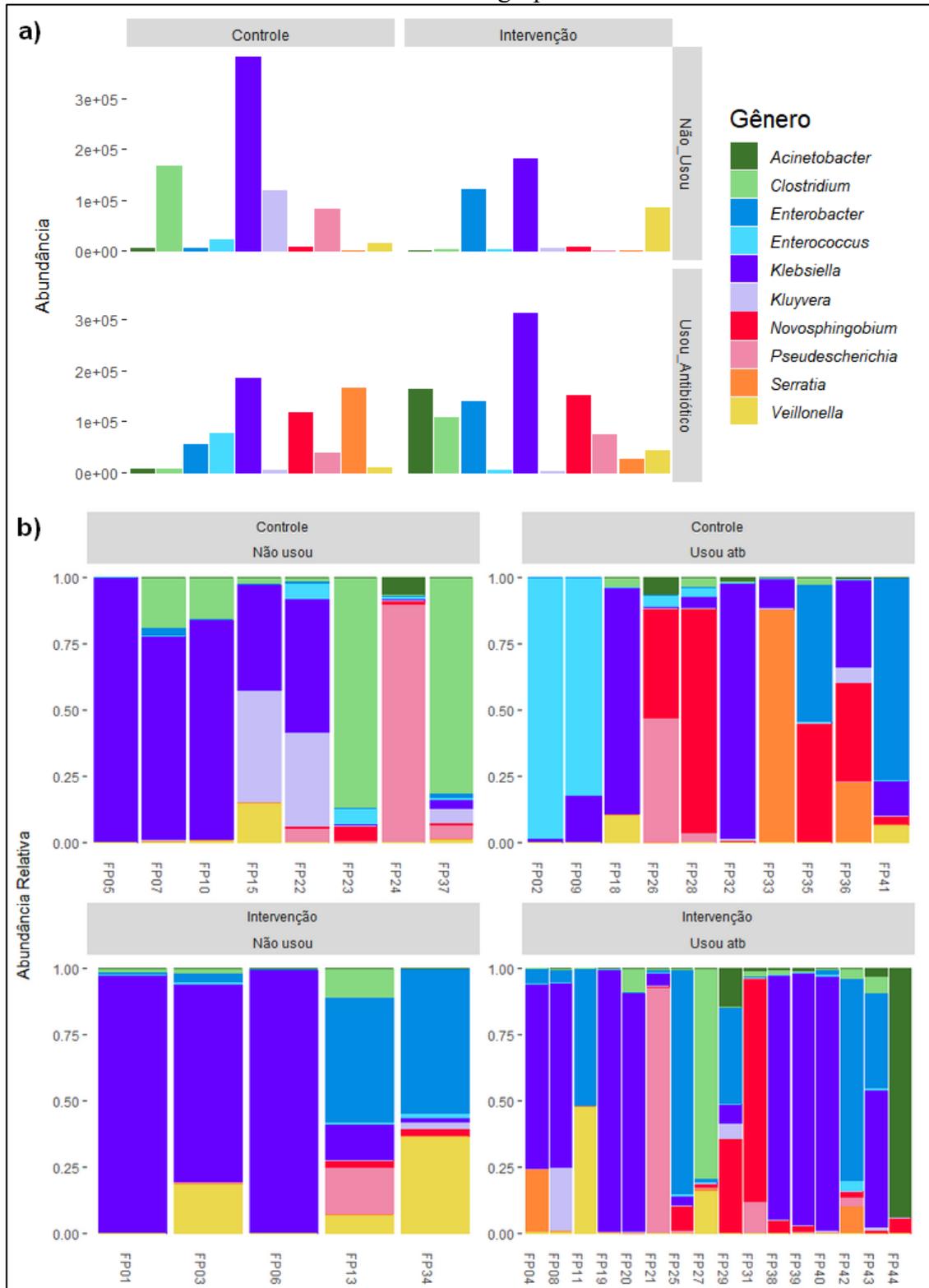
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A análise dos gráficos apresentados na figura 23 sugere que os gêneros *Novosphingobium* e *Serratia* se apresentam com maiores abundâncias nas amostras de RNs que utilizaram antibióticos em ambos os grupos controle/intervenção.

Clostridium sp. se apresenta em altas proporções tanto no subgrupo controle que não usou antibiótico quanto no subgrupo intervenção que usou. Enquanto que *Kluyvera* sp. destaca-se nas amostras do grupo controle que não fizeram o uso (Figura 23).

O gênero *Enterococcus* apresentou-se mais abundante no grupo controle independente do uso de antibiótico. E *Acinetobacter* sp. mais uma vez demonstra sua relação forte com o grupo intervenção através das amostras FP44 e FP29, que também fazem parte do grupo que usou antibiótico (Figura 23b).

Figura 23 – Abundância dos dez gêneros predominantes de acordo com a comparação entre o uso de antibiótico e os grupos do estudo.

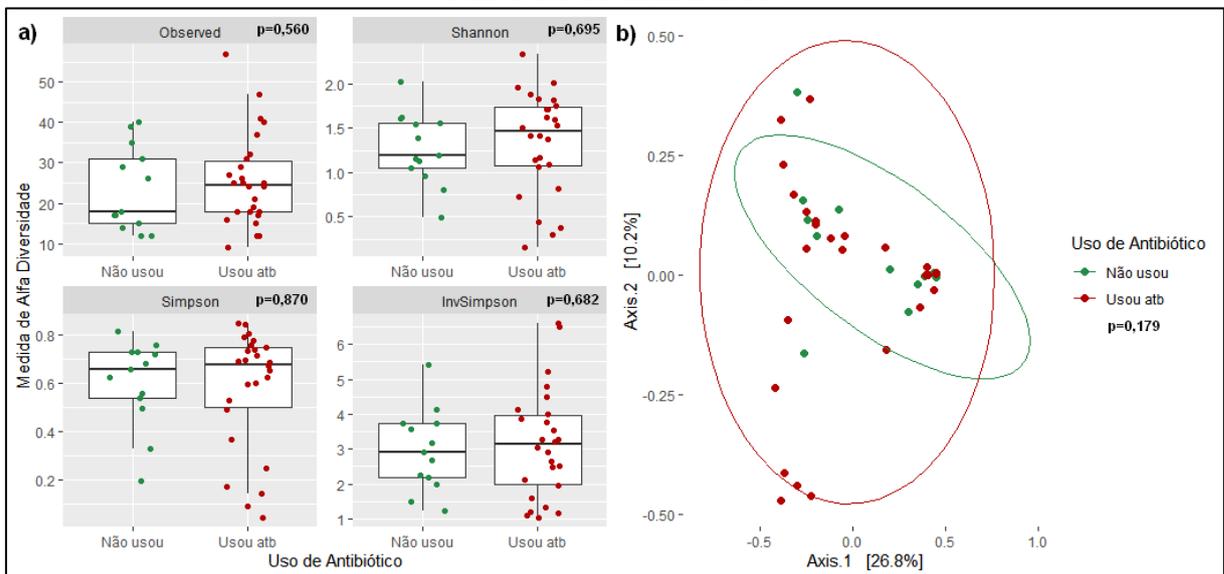


Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras individuais. atb: antibiótico. FP: código identificador das amostras de fezes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A microbiota presente nas amostras do grupo de RNs que fizeram uso de antibiótico nos primeiros dias de vida não apresentou diferença estatística significativa na riqueza ou na distribuição de abundâncias em comparação à microbiota do grupo que não utilizou (Figura 24a), segundo índices utilizados para avaliar a alfa diversidade. Além disso, nesta categoria o gráfico de PCoA também mostra uma sobreposição muito grande de amostras de grupos diferentes (Figura 24b), e mesmo que as amostras do grupo que não utilizou antibiótico apresentem maior agrupamento em comparação às do grupo que fez o uso, não foi suficiente para apresentar diferença estatística significativa para beta diversidade.

Figura 24 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com o uso de antibióticos.



Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis. atb: antibiótico.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

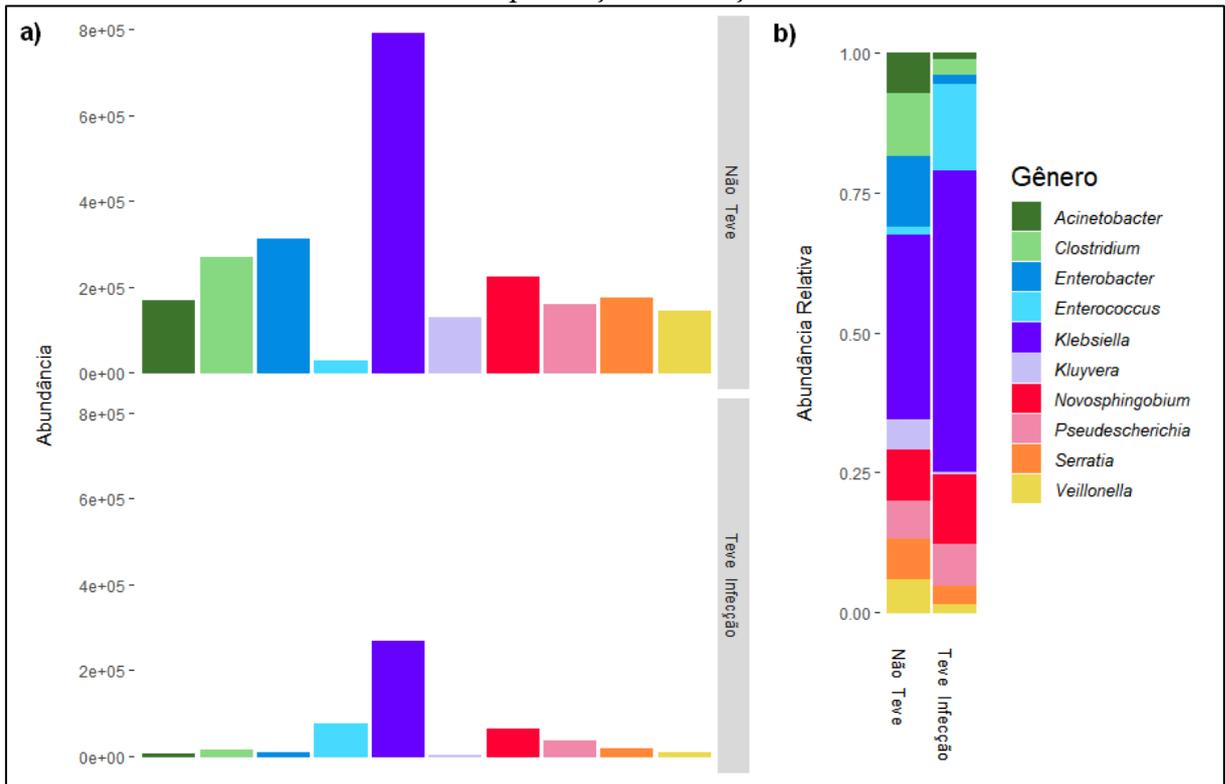
5.2.6 Influência de infecções nos RNs em sua composição microbiana

Nesta sessão foram considerados como RNs que tiveram infecções aqueles que apresentaram resultados de cultura positivos até o dia de coleta da amostra.

Na comparação da distribuição dos dez gêneros presentes em maior quantidade nas amostras do estudo segundo a presença de infecções nos RNs, o grupo de amostras dos RNs que tiveram infecção apresentou um perfil com maior abundância do gênero *Enterococcus* em comparação ao grupo sem infecção (Figura 25). Já o gênero *Klebsiella* era superior em abundância absoluta no grupo que não teve infecção, mas possui maior valor da média de sequências no grupo de RNs que teve infecção, como pode ser visto no gráfico de abundância

relativa na figura 25b. Os outros oito gêneros restantes estavam em maiores proporções no grupo sem infecção, com *Enterobacter* sp. apresentando a maior diferença na proporção média de sequências, quase que de forma significativa ($p=0,051$).

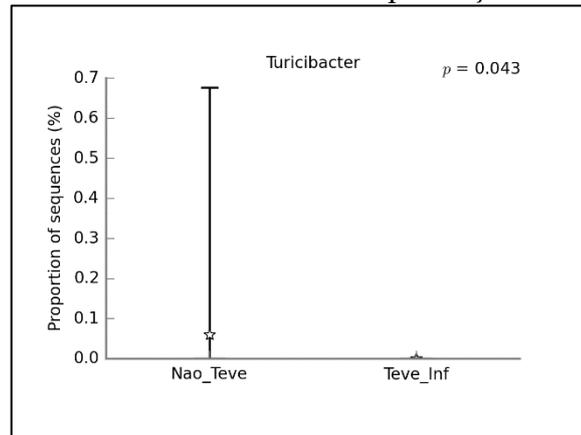
Figura 25 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a presença de infecções.



Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras agrupadas.
 Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O grupo sem infecção também apresentou o gênero *Turicibacter*, de menor incidência, com diferença significativa na proporção de sequências ($p=0,043$) em comparação ao grupo que teve infecção (Figura 26).

Figura 26 – Proporção de sequências identificadas como *Turicibacter* sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com a presença de infecção.

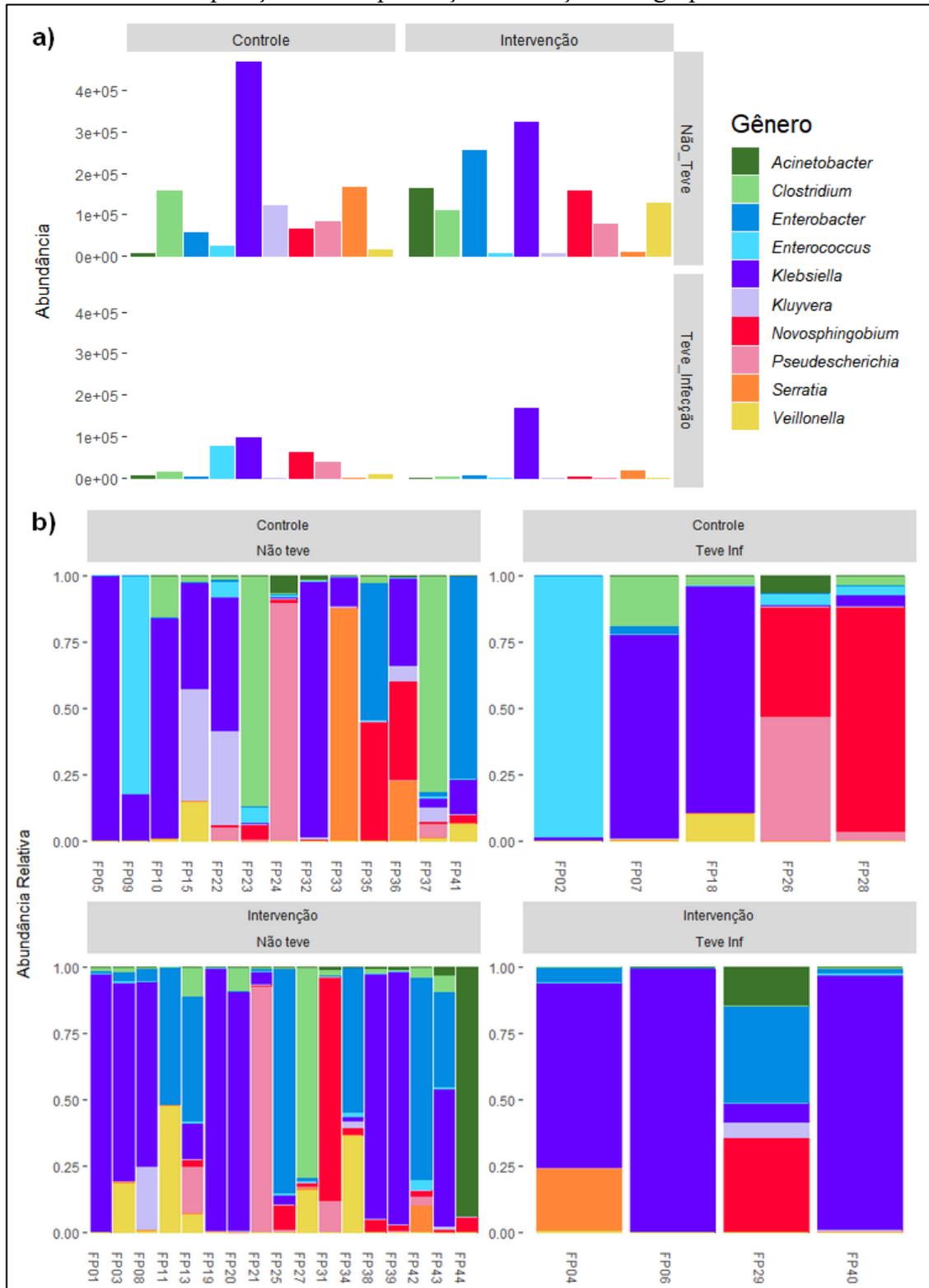


Legenda: Inf: infecção.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Através da comparação entre os grupos presença/ausência de infecção e os grupos controle/intervenção para verificação de abundância dos dez gêneros predominantes do estudo, as infecções parecem causar um efeito maior de diminuição da diversidade de gêneros no grupo intervenção (Figura 27a). E em avaliação individual da abundância relativa dos gêneros discutidos (Figura 27b), é possível verificar que as amostras FP04, FP06 e FP40, correspondentes a RNs do grupo intervenção, são responsáveis pela alta predominância do gênero *Klebsiella* no subgrupo intervenção com infecção. E que a amostra FP02 (de um RN do grupo controle) altamente dominada pelo gênero *Enterococcus*, foi principal motivo do grupo com infecção ter maiores proporções desse gênero.

Figura 27 – Abundância dos dez gêneros mais expressivos da microbiota dos RNs de acordo com a comparação entre a presença de infecção e os grupos do estudo.



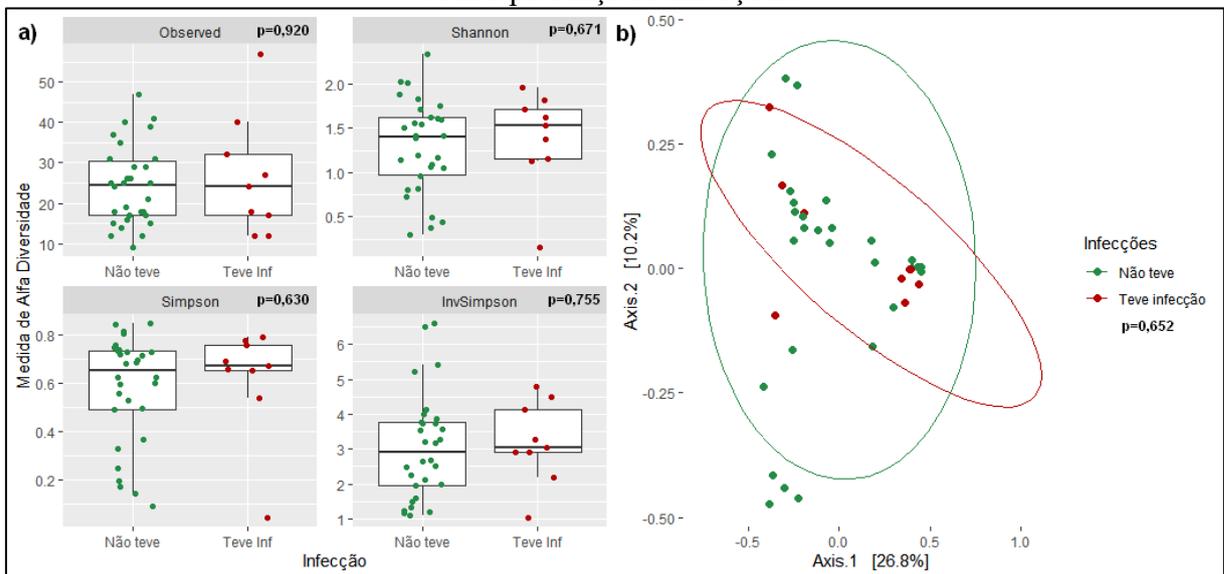
Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras individuais. Inf: infecção. FP: código identificador das amostras de fezes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Não houve diferença estatisticamente significativa na alfa diversidade, segundo índices utilizados, entre o grupo de amostras de RNs que tiveram infecções e o grupo de amostras de neonatos que não tiveram infecção no período analisado (Figura 28a).

O teste aplicado para avaliação da beta diversidade entre os grupos segundo presença de infecções apontou que este também não foi um evento que provocou diferenças significativas na composição da comunidade bacteriana entre os grupos de amostras estudadas. Como pode ser visto no gráfico de PCoA da figura 28b, há bastante dispersão de amostras em ambos os grupos, assim como muita sobreposição de um grupo sobre o outro.

Figura 28 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com a presença de infecções.



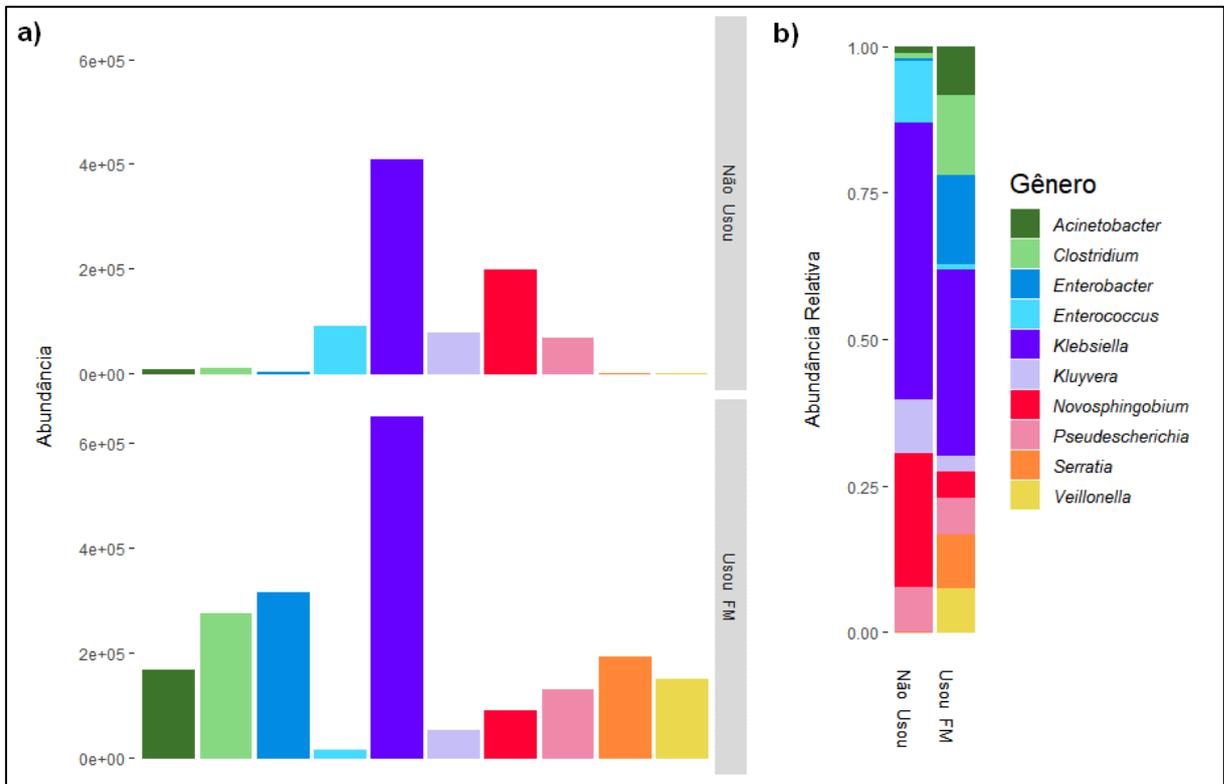
Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis. Inf: infecção.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.2.7 Influência do consumo de FM pelo RN em sua composição microbiana

Como pode ser visto nos gráficos da figura 29, os gêneros *Novosphingobium*, *Enterococcus* e *Kluyvera* foram mais predominantes nas amostras do grupo que não consumiu fortificante durante os primeiros dias de vida. Os gêneros *Klebsiella* e *Pseudescerichia* apresentaram maior abundância absoluta no grupo que fez uso de fortificante (Figura 29a), mas possuem uma média do número de sequências maior no grupo que não utilizou, demonstrando alta predominância desses gêneros na microbiota dos RNs que não consumiram fortificante (Figura 29b). Os cinco gêneros restantes foram mais abundantes nas amostras dos RNs que utilizaram fortificante.

Figura 29 – Abundância dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com o consumo de FM.

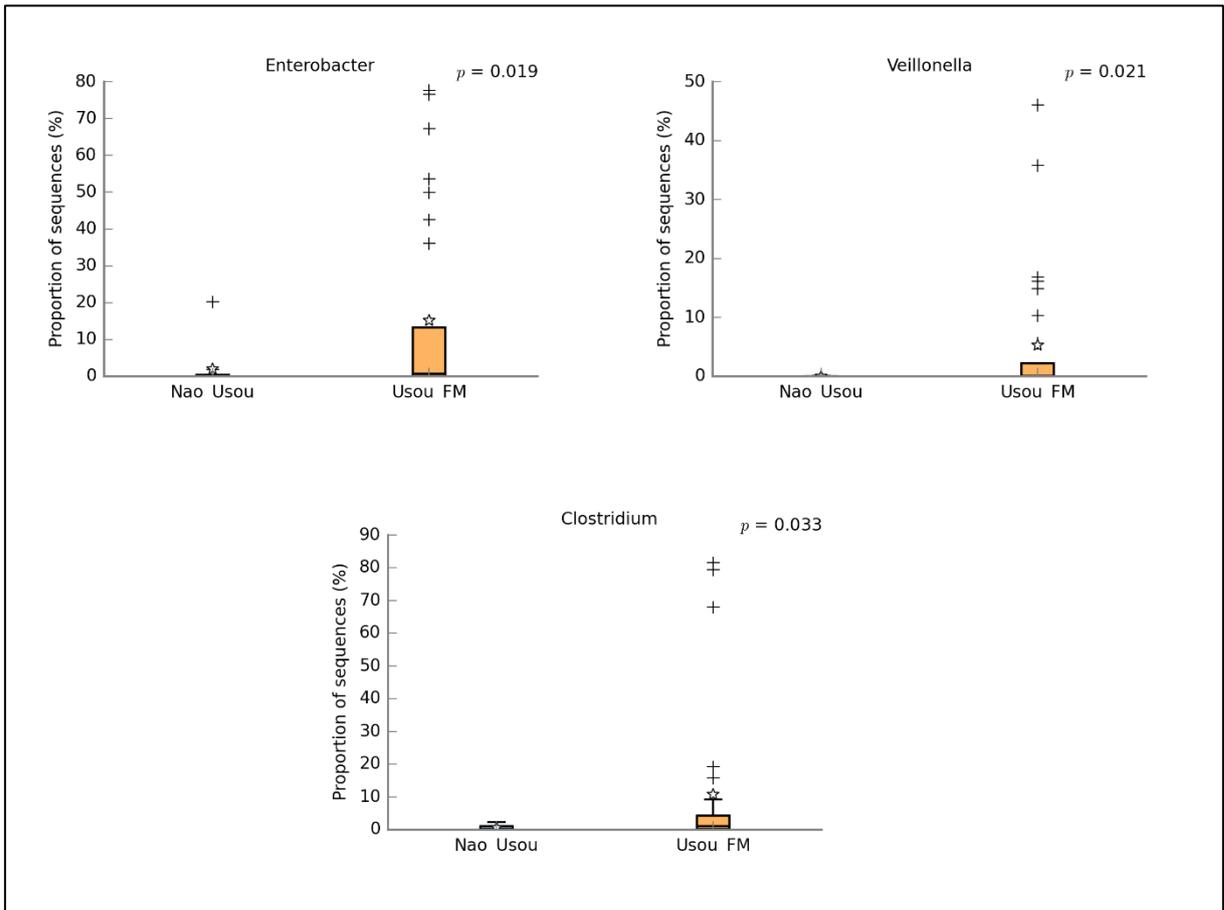


Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras agrupadas. FM: fortificante do leite materno.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Estatisticamente, os gêneros *Enterobacter* ($p=0,019$), *Veillonella* ($p=0,021$) e *Clostridium* ($p=0,033$) apresentaram diferença significativa em sua distribuição entre os grupos de acordo com o consumo de fortificante (Figura 30).

Figura 30 – Proporção de sequências de gêneros da microbiota intestinal dos RNs de acordo com o consumo de FM.

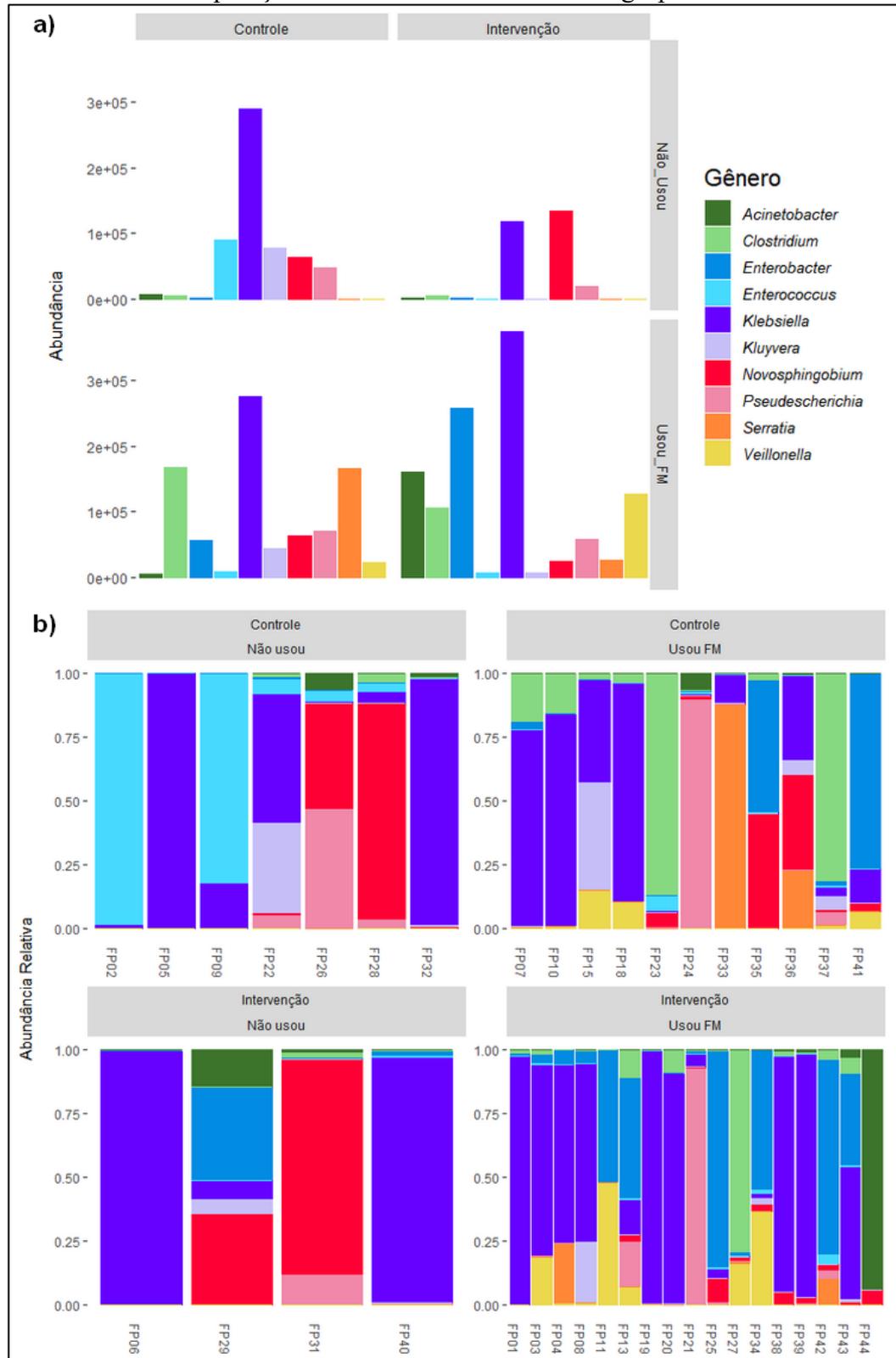


Legenda: FM: fortificante do leite materno.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A partir da comparação dos grupos de acordo com o consumo de fortificante com os grupos controle/intervenção, destaca-se a alta predominância do gênero *Enterococcus* nas amostras do grupo controle que não fizeram uso do fortificante (Figura 31).

Figura 31 – Abundância dos dez gêneros mais expressivos da microbiota dos RNs de acordo com a comparação entre o consumo de FM e os grupos do estudo.



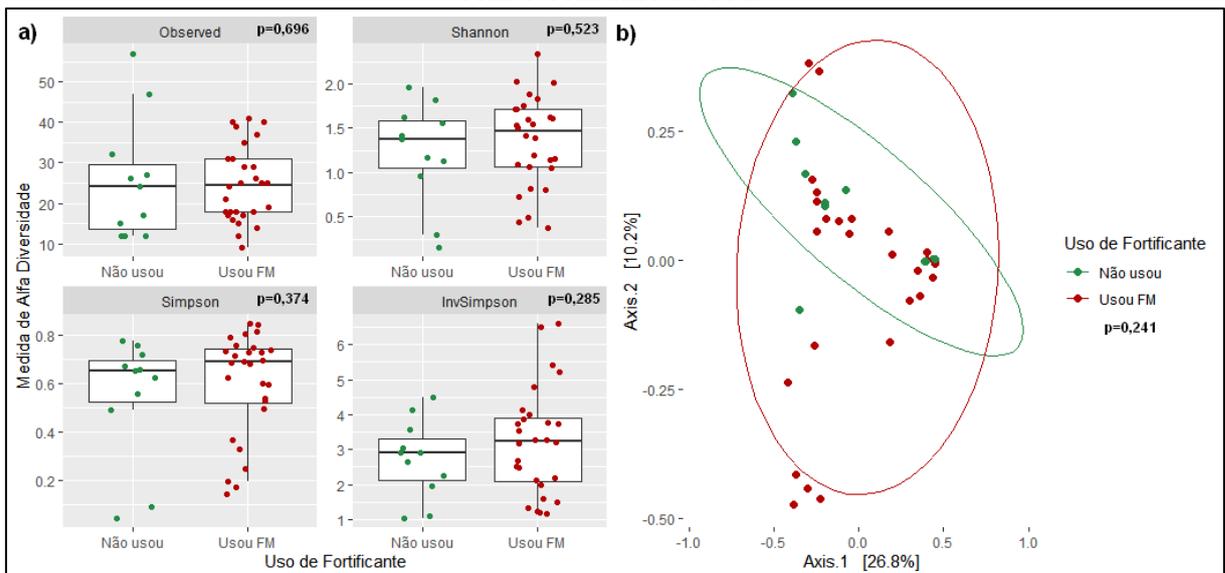
Legenda: a) abundância absoluta com amostras agrupadas. b) abundância relativa com amostras individuais. FM: fortificante do leite materno. FP: código identificador das amostras de fezes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

De acordo com os índices utilizados para medir a alfa diversidade, não houveram diferenças estatísticas significativas na riqueza ou uniformidade da distribuição de abundâncias entre os grupos de acordo com o consumo de fortificante do leite materno (Figura 32a).

O grupo de RNs que fizeram o uso de fortificante na sua dieta apresentou maior dispersão das amostras que o grupo de neonatos que não utilizaram, mas isso não foi o suficiente para diferenciação do perfil das comunidades bacterianas de cada grupo, uma vez que houve bastante sobreposição das amostras no gráfico de PCoA (Figura 32b). Logo, os grupos separados de acordo com o consumo de fortificante do leite materno não apresentaram diferença significativa para beta diversidade.

Figura 32 – Avaliação da diversidade alfa e beta na microbiota intestinal de RNs de acordo com o consumo de FM.



Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis. FM: fortificante do leite materno.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

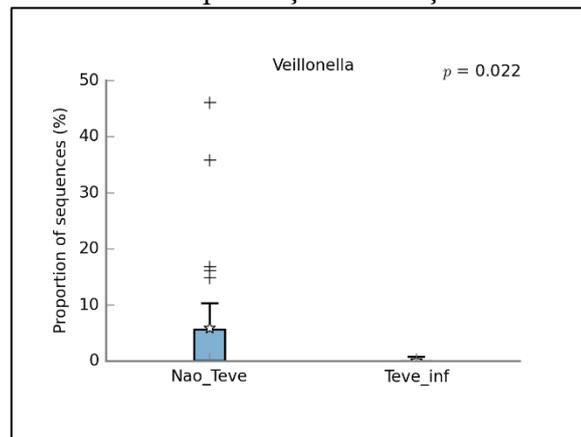
5.2.8 Fatores maternos influenciando a composição microbiana dos RNs

5.2.8.1 Infecções nas mães durante a gestação

Para esta análise foram incluídas infecções em qualquer período da gestação, desde o início até o dia do parto e foi analisada sua influência sobre todas as amostras dos RNs do estudo. No grupo controle foram 5 RNs com mães que tiveram infecção e no grupo intervenção foram 9, a abundância relativa das amostras individuais pode ser verificada no anexo 9.

Houve diferença significativa na distribuição do gênero *Veillonella* ($p=0,022$), o qual estava em maior proporção nas amostras de RNs com mães que não tiveram infecção durante a gestação (Figura 33).

Figura 33 – Proporção de sequências identificadas como *Veillonella* sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com a presença de infecção nas mães durante a gestação.

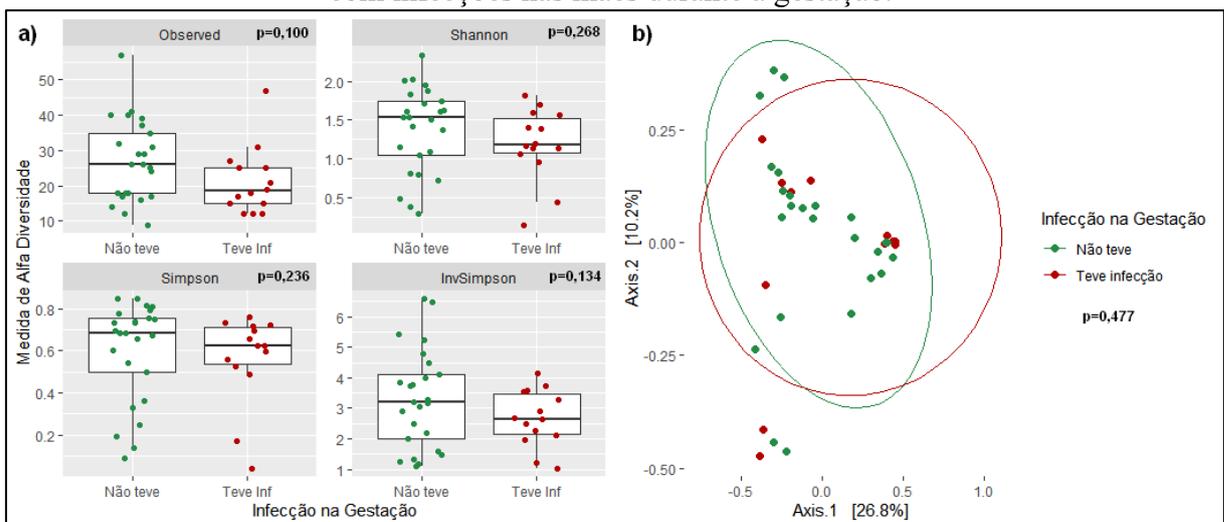


Legenda: Inf: infecção.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Por outro lado, as mães apresentarem alguma infecção durante a gestação não provocou diferenças significativas na alfa ou beta diversidade da microbiota dos RNs estudados (Figura 34).

Figura 34 – Avaliação da diversidade alfa e beta da microbiota intestinal de RNs de acordo com infecções nas mães durante a gestação.



Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis. Inf: infecção.

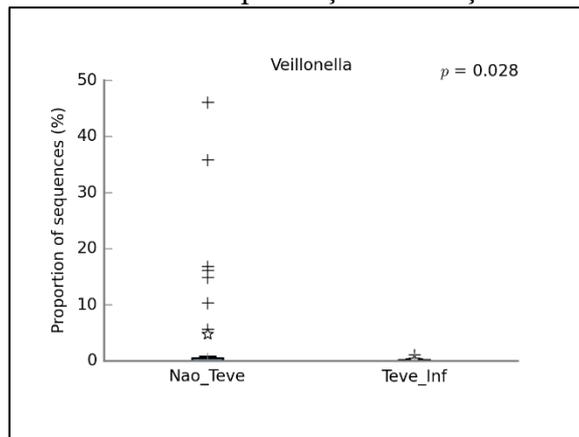
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.2.8.2 Infecções nas mães após o parto

Neste caso, foram incluídas infecções desde o momento do parto até o dia de coleta das amostras de fezes dos RNs. E sua influência foi analisada primeiro considerando todas as amostras do estudo e, em seguida, somente nos RNs do grupo intervenção, pois o esperado é que a microbiota desse grupo seja mais afetada por fatores maternos devido ao consumo do leite. No grupo controle foram 3 RNs com mães que tiveram infecção e no grupo intervenção foram 5, a abundância relativa das amostras individuais pode ser verificada no anexo 10.

Quando a análise considerou todas as amostras dos RNs, o fator infecção nas mães após o parto provocou novamente mudança significativa a abundância do gênero *Veillonella* ($p=0,028$), estando em maiores proporções no grupo de amostras dos RNs cuja mãe não teve infecção nos primeiros dias após o parto (Figura 35).

Figura 35 – Proporção de sequências identificadas como *Veillonella* sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com a presença de infecção nas mães após o parto.

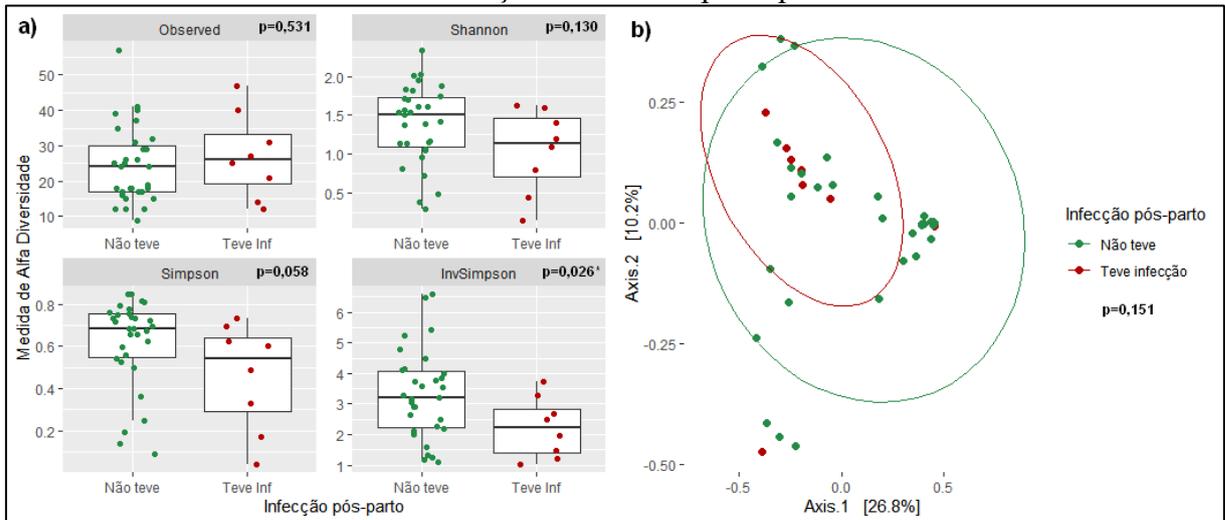


Legenda: Inf: infecção.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Esse fator também provocou diferença estatística significativa para alfa diversidade (Figura 36), segundo o índice InvSimpson ($p=0,026$), que calculou uma média no valor de 3,30 para grupo de RNs com mães sem infecção e o valor de 2,24 para grupo que a mãe teve infecção. Os índices Observed, Shannon e Simpson não deram diferença significativa, assim como os testes de permutação para análise de beta diversidade.

Figura 36 – Avaliação da diversidade alfa e beta da microbiota intestinal de RNs de acordo com infecções nas mães após o parto.

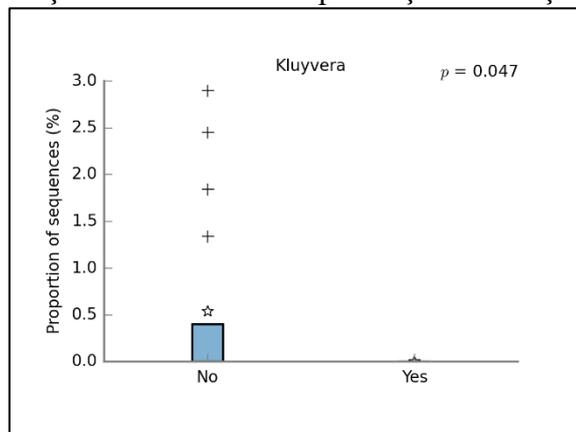


Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis. Inf: infecção. *Valor com diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

E quando analisado o fator infecção nas mães após o parto somente sobre as amostras dos RNs do grupo intervenção, se observou diferença significativa na distribuição de *Kluyvera* sp. ($p=0,047$), sendo detectado mais frequentemente no grupo de amostras de RNs com mães que não tiveram infecção (Figura 37). Para esta porção de amostras, o gênero *Veillonella* não apresentou diferença significativa ($p=0,066$), mas também teve proporção média de sequências superior no grupo em que as mães não tiveram infecção nos primeiros dias após o parto (Anexo 11).

Figura 37 – Proporção de sequências identificadas como *Kluyvera* sp. na microbiota intestinal de RNs do grupo intervenção de acordo com a presença de infecção nas mães após o parto.

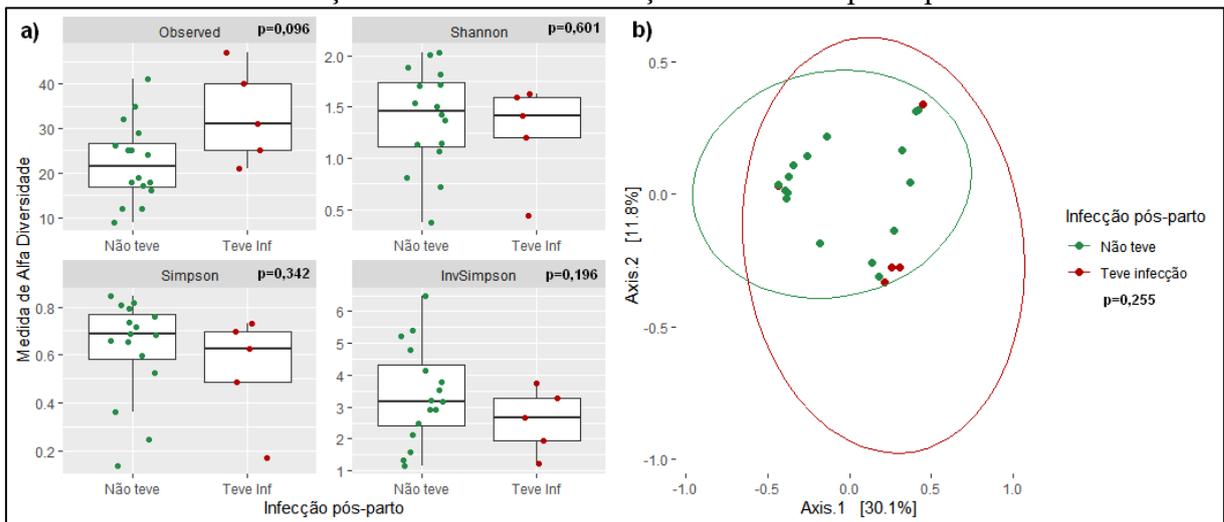


Legenda: Inf: infecção.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No entanto, não se observou diferença significativa para alfa ou beta diversidade nas amostras de RNs do grupo intervenção, considerando a presença de infecção nas mães após o parto (Figura 38).

Figura 38 – Avaliação da diversidade alfa e beta da microbiota intestinal de RNs do grupo intervenção de acordo com infecções nas mães após o parto.



Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis. Inf: infecção.

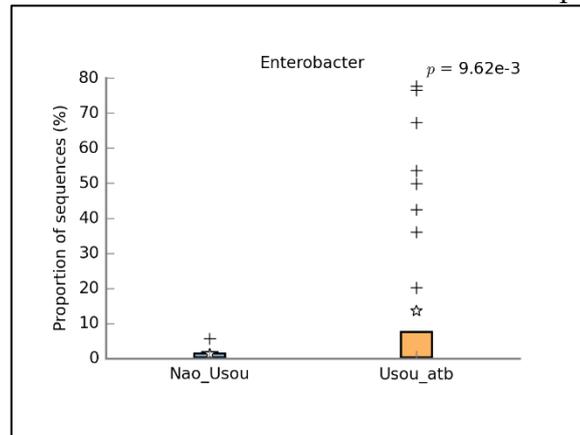
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.2.8.3 Uso de antibiótico pelas mães

Foi avaliado também a influência do uso de antibióticos pelas mães desde a gestação até o dia de coleta das amostras de fezes dos RNs. E sua influência foi analisada primeiro sobre todas amostras do estudo e depois somente nos RNs do grupo intervenção, pois o esperado é que a microbiota desse grupo seja mais afetada por fatores maternos devido ao consumo do leite. Tanto no grupo controle, quanto no grupo intervenção foram 16 RNs com mães que tomaram antibiótico, a abundância relativa das amostras individuais pode ser verificada no anexo 12.

Quando analisado sobre todas as amostras dos RNs, o fator uso de antibiótico pelas mães provocou grandes diferenças na abundância do gênero *Enterobacter* ($p=9,62e^{-3}$), presente em maior proporção no grupo de amostras de RNs cuja mãe tomou algum antibiótico (Figura 39).

Figura 39 – Proporção de sequências identificadas como *Enterobacter* sp. na microbiota intestinal de RNs de acordo com uso de antibiótico pelas mães.

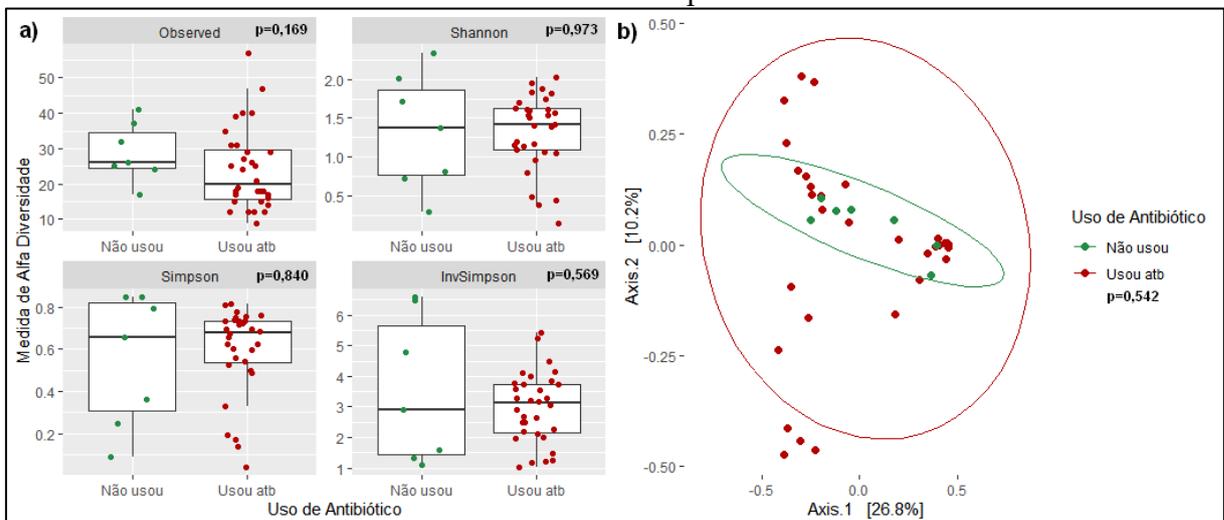


Legenda: atb: antibiótico.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Entretanto, não se observou diferenças significativas na alfa ou beta diversidade da microbiota dos RNs estudados considerando o uso de antibióticos pelas mães (Figura 40).

Figura 40 – Avaliação da diversidade alfa e beta da microbiota intestinal de RNs de acordo com uso de antibiótico pelas mães.

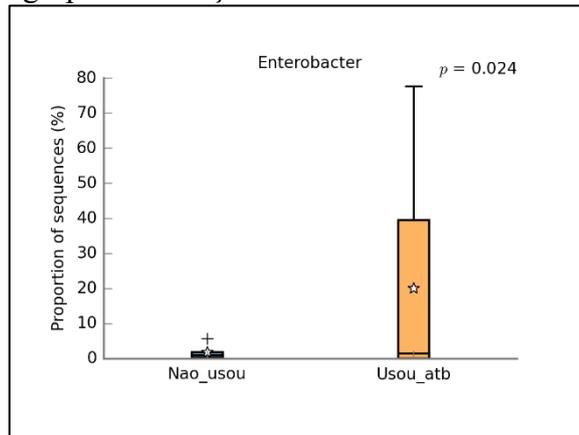


Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis. atb: antibiótico.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Quando analisado somente as amostras dos RNs do grupo intervenção, o fator uso de antibiótico pelas mães voltou a provocar diferença nas proporções do gênero *Enterobacter* de forma significativa ($p=0,024$), novamente em maior proporção no grupo de amostras de RNs cuja mãe utilizou antibiótico (Figura 41).

Figura 41 – Proporção de seqüências identificadas como *Enterobacter* sp. na microbiota intestinal de RNs do grupo intervenção de acordo com uso de antibiótico pelas mães.

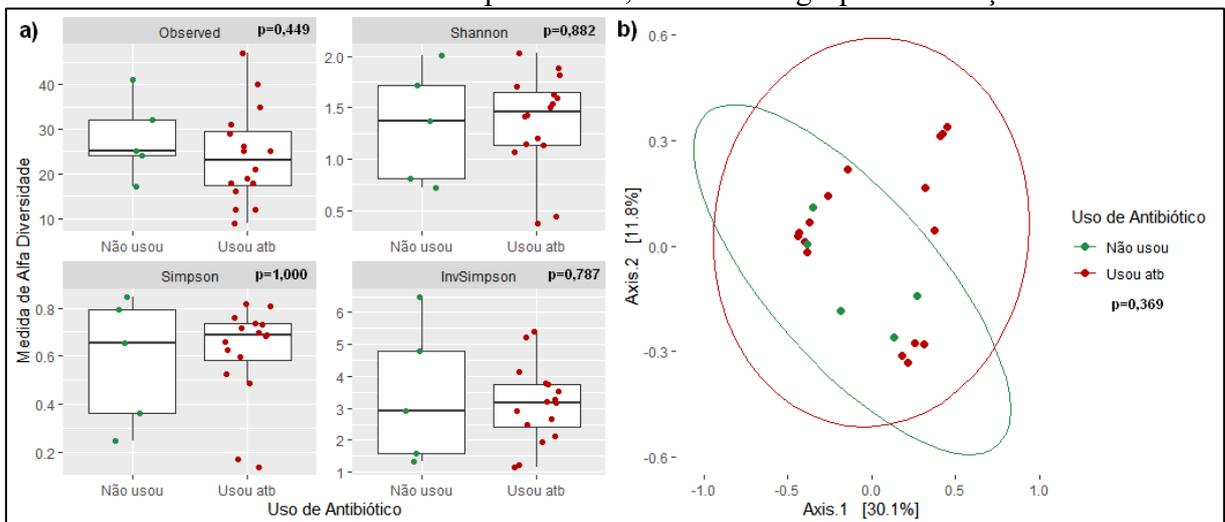


Legenda: atb: antibiótico.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No entanto, o uso de antibiótico pelas mães não provocou diferenças significativas na alfa ou beta diversidade da microbiota dos RNs do grupo intervenção (Figura 42).

Figura 42 - Gráficos de medidas de alfa e beta diversidade comparando os grupos de acordo com uso de antibiótico pelas mães, somente no grupo intervenção.



Legenda: a) medidas de alfa diversidade para os índices Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson. b) PCoA da matriz de distância pelo método Bray-Curtis. atb: antibiótico.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

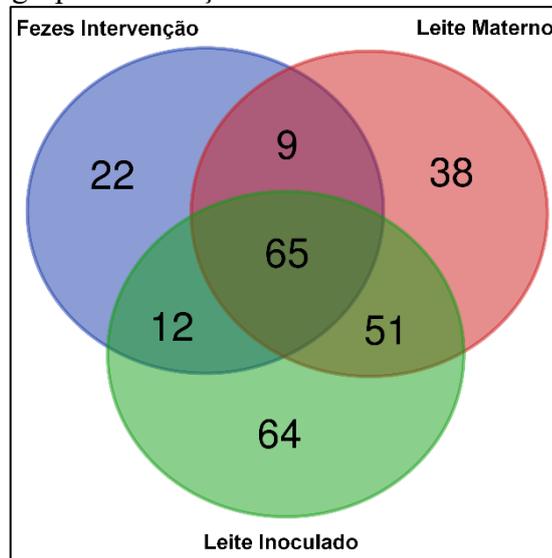
5.2.9 Comparação da microbiota dos leites com a microbiota das fezes

A análise da comparação considerou cada binômio mãe-RN. Assim, foram analisadas as amostras do leite materno cru (LM), do leite de doadora pasteurizado e inoculado com o leite dessa mãe (LI), assim como as amostras de fezes dos RNs (FP) do grupo intervenção.

Da identificação de gêneros bacterianos com o banco de dados RDP, as amostras de fezes dos RNs do grupo intervenção compartilhou 86 gêneros com as amostras de leites, dos

quais 65 foram identificados nos três tipos de amostra, 9 foram identificados em comum entre as amostras de fezes e de LM, e 12 em comum entre as amostras de fezes e de LI (Figura 43).

Figura 43 – Diagrama de Venn com a quantidade de gêneros identificados nas amostras de fezes do grupo intervenção e nos leites materno e inoculado.

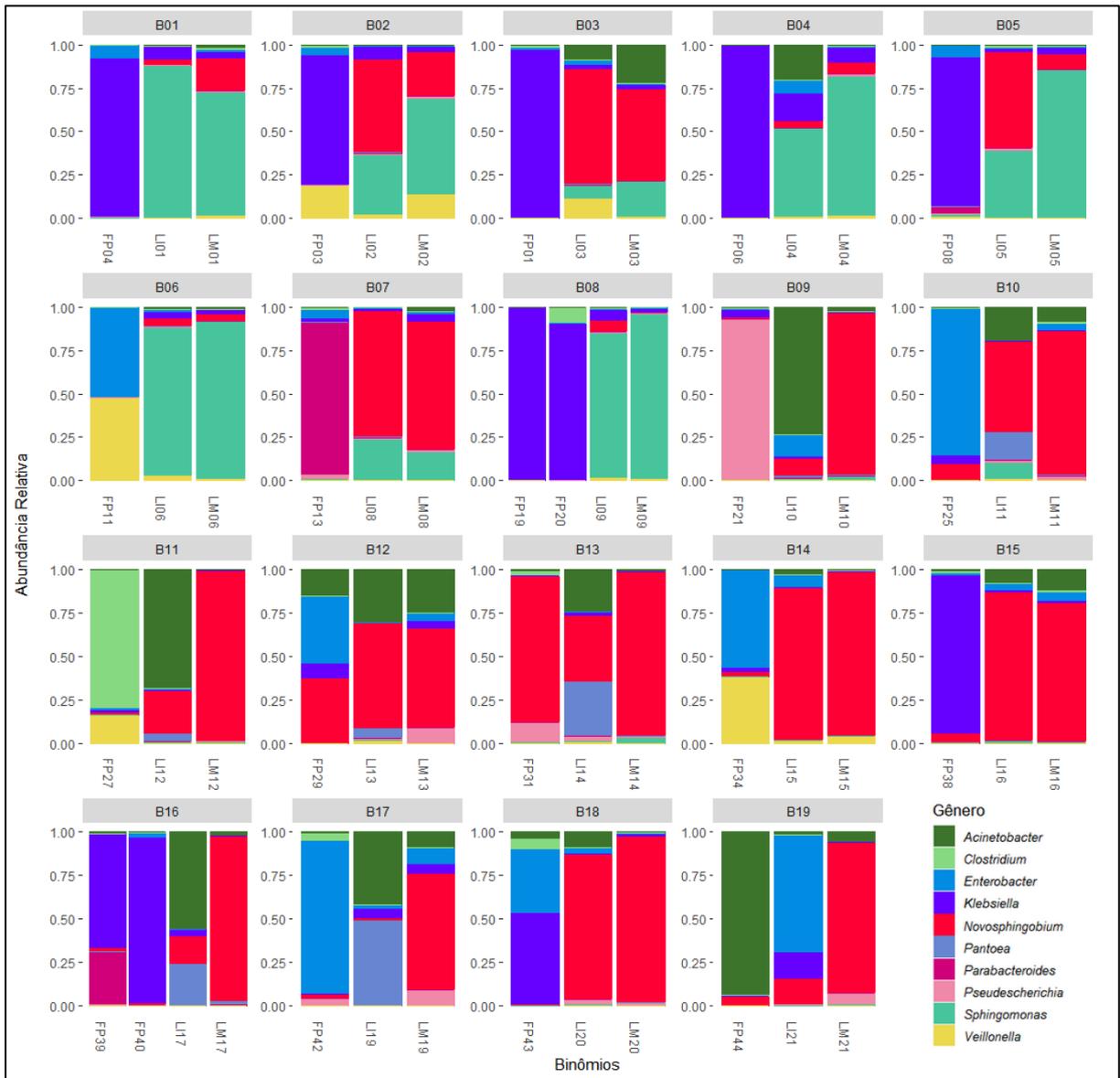


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Foi possível obter um gráfico de abundância relativa dos dez gêneros mais frequentes nos três tipos de amostras (ambos os leites e as fezes), apresentado na figura 44. A primeira linha de cada grupo (binômio) representa a amostra FP, em segundo lugar está a amostra de LI e por último a amostra do LM, com uma pequena mudança nos grupos em que aparecem amostras de gêmeos onde as duas primeiras serão de fezes, mas a ordem seguinte continua a mesma.

É possível notar que em 63,16% dos binômios (B01, B02, B03, B04, B06, B07, B08, B10, B12, B14, B15 e B18), o perfil de microbiota do LI assemelha-se bastante com o perfil do LM (“original”), sugerindo que a tentativa de reconstituição da microbiota do LM no LD obteve sucesso nesses casos. Quando se faz a observação de similaridade entre o perfil das amostras de leite e o das amostras de fezes, pode ser visto que em boa parte dos binômios existe compartilhamento visível desses gêneros abundantes entre os dois tipos de amostras, mas em apenas dois grupos apresentados (B12 e B13), a microbiota do RN parece ter a predominância dos gêneros sobre a amostra de forma mais semelhante à abundância presente nas amostras de leite.

Figura 44 – Abundância relativa dos dez gêneros bacterianos predominantes na microbiota dos RNs do grupo intervenção e na dos leites LM, LI de acordo com a comparação entre os binômios mãe-RN.



Legenda: B: código identificador do binômio. FP: código identificador das amostras de fezes. LI: código identificador das amostras de leite inoculado. LM: código identificador das amostras de leite materno.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.2.10 Recapitulação dos resultados mais importantes de cada sessão

Quadro 2 – Resumo dos resultados

RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO

Em ambos os grupos foi notada a abundância dos filos **Proteobacteria** e **Firmicutes**, mas no grupo intervenção também foi vista alta abundância do filo **Bacteroidetes**.

Dos **141 gêneros** encontrados, **10** representaram a maioria das sequências, considerando todas as amostras estudadas: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Novosphingobium*, *Clostridium*, *Pseudodescherichia*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Veillonella*, *Kluyvera* e *Enterococcus*.

❖ Características da microbiota intestinal dos RNs por grupo do estudo

Muitas das amostras, de ambos os grupos, são **bastante dominadas por apenas um gênero bacteriano**, sendo *Klebsiella sp.* o gênero com maior predominância.

O grupo **controle** apresentou os gêneros *Clostridium*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pseudodescherichia* e *Serratia* em maior quantidade. Considerando apenas as amostras desse grupo, os gêneros *Staphylococcus* e *Burkholderia* são mais abundantes.

O grupo **intervenção** apresentou os gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Novosphingobium* e *Veillonella* em maior abundância. Considerando apenas as amostras desse grupo, os gêneros *Hungatella*, *Parabacteroides* e *Raoultella* são mais abundantes.

Os índices de diversidade alfa e beta apontam muitas semelhanças entre os grupos.

❖ Influência do tipo de parto na composição microbiana dos RNs

Os RNs nascidos por cada tipo de parto apresentaram muitas semelhanças, tanto nos perfis de abundância, quanto na diversidade microbiana.

❖ Influência da IG na composição microbiana dos RNs

O gênero *Clostridium* apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,033$) em sua distribuição, presente de forma mais expressiva no grupo de neonatos **MPT**.

As amostras dos RNs classificados como **EPT** apresentaram um perfil de maior abundância somente para os gêneros *Acinetobacter* e *Novosphingobium*, os outros oito gêneros são mais predominantes nas amostras dos neonatos **MPT**.

❖ Influência do peso ao nascer na composição microbiana dos RNs

Amostras de RNs com **EBPN** apresentam maior predominância dos gêneros *Cutibacterium sp.* ($p=1,94e-3$), *Phreatobacter sp.* ($p=0,015$), *Prevotella sp.* ($p=0,033$) e *Alistipes sp.* ($p=0,046$) em relação aos outros grupos de peso ao nascer, possuindo diferenças significativas em sua distribuição.

No grupo de amostras dos RNs com **MBPN**, o gênero *Pantoea* esteve significativamente aumentado ($p=0,033$), em relação ao grupo de neonatos com **EBPN**.

Na análise da **alfa** diversidade, os índices de **Simpson** e o **InvSimpson** acusaram diferença estatística significativa ($p=0,021$ e $p=0,027$, respectivamente) na comparação entre o grupo com **BPN** e o grupo com **MBPN** (este último mais rico e diverso).

❖ Influência do uso de antibiótico pelo RN em sua composição microbiana

Os gêneros *Novosphingobium* ($p=0,015$) e *Herbaspirillum* ($p=0,043$) apresentaram diferença estatística em sua distribuição, estando presentes em maiores proporções no grupo de amostras de **RNs que usaram antibiótico**.

❖ Influência de infecções nos RNs em sua composição microbiana

O grupo **sem infecção** apresentou diferença significativa na proporção de sequências do gênero *Turicibacter* ($p=0,043$) em comparação ao grupo que teve infecção.

O grupo de amostras dos RNs que **tiveram infecção** apresentou um perfil com maior abundância do gênero *Enterococcus*. O gênero *Klebsiella* possui maior valor da média de sequências no grupo de RNs que teve infecção. E *Enterobacter* sp. apresenta a maior diferença na proporção média de sequências, quase que de forma significativa ($p=0,051$), com maiores proporções no **grupo sem infecção**.

❖ Influência do consumo de FM pelo RN em sua composição microbiana

Estatisticamente, os gêneros *Enterobacter* ($p=0,019$), *Veillonella* ($p=0,021$) e *Clostridium* ($p=0,033$) apresentaram diferença significativa em sua distribuição entre os grupos de acordo com o consumo de fortificante (Figura 30).

❖ Fatores maternos influenciando a composição microbiana dos RNs

❖ Infecções nas mães durante a gestação

Houve diferença significativa na distribuição do gênero *Veillonella* ($p=0,022$), em maior proporção nas amostras de **RNs com mães que não tiveram infecção** durante a gestação.

❖ Infecções nas mães após o parto

Considerando todas as amostras, o fator provocou novamente mudança significativa a abundância do gênero *Veillonella* ($p=0,028$), em maiores proporções no grupo de amostras dos **RNs cuja mãe não teve infecção** nos primeiros dias após o parto.

Também provocou diferença estatística significativa para **alfa diversidade**, segundo o **índice InvSimpson** ($p=0,026$), com maior diversidade no mesmo grupo do resultado anterior.

Considerando somente o grupo intervenção, se observou diferença significativa na distribuição de *Kluyvera* sp. ($p=0,047$), mais frequentemente no grupo de amostras de **RNs com mães que não tiveram infecção**.

❖ Uso de antibiótico pelas mães

Considerando todas as amostras, esse fator provocou grandes diferenças na abundância do gênero *Enterobacter* ($p=9,62e-3$), presente em maior proporção no grupo de amostras de **RNs cuja mãe tomou algum antibiótico**.

Considerando somente o grupo intervenção, o fator também provoca diferença nas proporções do gênero *Enterobacter* de forma significativa ($p=0,024$), novamente em maior proporção no grupo de amostras de RNs cuja mãe utilizou antibiótico.

❖ Comparação da microbiota dos leites com a microbiota das fezes

Na maior parte dos binômios (63,16%), o perfil de microbiota do LI assemelha-se bastante com o perfil do LM, sugerindo que a tentativa de reconstituição da microbiota do LM no LD obteve sucesso nesses casos.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

6 DISCUSSÃO

Aproximadamente 15 milhões de RNs nascem prematuramente a cada ano, dentre os quais, 15% nascem antes de completar 32 semanas de IG (BARFIELD et al., 2019; WALANI, 2020). Conseqüentemente esses neonatos apresentam imaturidade numa variedade de órgãos e sistemas, necessitando de longos períodos de internação e correndo risco de desenvolverem doenças e de apresentarem resultados adversos no neurodesenvolvimento (BARFIELD et al., 2019). Além disso, a prematuridade é uma das principais causas de morbimortalidade de crianças menores de 5 anos, sendo os primeiros 28 dias de vida o período de maior vulnerabilidade para a sobrevivência (HUG et al., 2022; KINNEY; VAZ, 2020).

Neste trabalho, que faz parte de um ensaio clínico, procurou-se avaliar se a intervenção na dieta de RNs, menores de 32 semanas, com leite de doadora pasteurizado e inoculado com leite da mãe para reconstituição da microbiota materna (de acordo com protocolo apresentado por Cacho e colaboradores, 2017), poderia estar proporcionando uma colonização da microbiota intestinal diferenciada daquela de RNs que receberam apenas o leite de doadora pasteurizado. O intuito foi que a colonização com a microbiota materna reconstituída pudesse contribuir para a aceleração no desenvolvimento e maturação de órgãos e tecidos, possibilitando ao RN vantagem na progressão para a dieta plena enteral e, conseqüentemente, ganho de peso em menos tempo. Além disso, contribuir para diminuir desdobramentos clínicos de alto risco, como sepse tardia e ECN, uma vez que a literatura aponta para resultados semelhantes a partir do consumo de leite materno pelo prematuro (KALBERMATTER et al., 2021; PANNARAJ et al., 2017; BERING, 2018; ROBERTSON et al., 2019).

As análises iniciais dos parâmetros clínicos gerais aqui apresentados não apontaram diferenças estatísticas claramente diferentes entre os grupos controle (RNs que receberam leite de doadora pasteurizado) e intervenção (aqueles que tiveram esse leite de doadora inoculado com o leite da mãe). Porém, esses dados são apenas uma pequena parte de todos os dados colhidos ao longo do período de internação dos RNs, que incluem todas as intercorrências, tratamentos e exames de laboratório de diversas naturezas que foram registradas ao longo do estudo. Tais dados estão sendo estudados como parte da tese de doutorado da neonatologista Thaise Brancher Soncini, aluna do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas. De forma semelhante, não se entrou em detalhes da análise da microbiota dos leites coletados, pois estão sendo estudados pela farmacêutica Izadora Borgmann Frizzo como parte da sua dissertação de mestrado no Programa de Pós-graduação em Farmácia.

Os resultados da presente dissertação de mestrado, correspondem ao que foi obtido a partir do sequenciamento da região V3 a V4 do gene da subunidade ribossomal 16S nas amostras de fezes de RNs dos grupos controle e intervenção, coletadas em torno do décimo dia de vida. Esses dados revelam que os filos Proteobacteria e Firmicutes foram os mais abundantes em ambos os grupos, mas no grupo intervenção também foi encontrada uma abundância relativamente alta do filo Bacteroidetes. A nível de gênero, os quinze táxons encontrados em maior abundância no conjunto de amostras de fezes coletadas em torno do décimo dia de vida dos neonatos incluídos no estudo foram: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Novosphingobium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Veillonella*, *Kluyvera*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Parabacteroides*, *Burkholderia*, *Hungatella* e *Raoultella*, em ordem decrescente de abundância total apresentada.

Um estudo realizado nos Estados Unidos (RAO et al., 2021), observou que, de forma semelhante aos resultados do presente trabalho, a microbiota dos RNs prematuros, menores de 33 semanas de IG, era dominada por um dos quatro gêneros: *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia* ou *Enterococcus*, e mesmo que as comunidades bacterianas fossem tipicamente dominadas por apenas um gênero, muitas vezes os outros gêneros principais permaneceram estáveis em níveis elevados na microbiota dos RNs. Eles coletaram amostras no primeiro dia de vida e depois nos dias 14, 28 e 42 e perceberam que a maioria dos RNs inicialmente possuía uma microbiota dominada por *Staphylococcus*, que depois transitava para um estado de dominância por *Klebsiella*, *Enterococcus* ou *Escherichia* nos seguintes tempos coletados. De forma semelhante, Stewart e colaboradores (2016) também constataram a presença dos

gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, e *Enterococcus* em todas as amostras de RNs prematuros em estudo realizado no Reino Unido.

Assim como o estudo americano, o trabalho realizado por Khan e colaboradores (2023), também procurou avaliar as mudanças da microbiota de RNs prematuros, menores de 32 semanas de IG, entre o primeiro até o 42º dia de vida. Nesta outra análise, realizado na China, os gêneros que estiveram presentes em maior abundância na microbiota dos RNs foram: *Exiguobacterium*, *Prevotella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia–Shigella*, *Klebsiella*, *Gardnerella*, *Streptococcus* e *Chryseobacterium*. Os quais também sofreram mudanças em sua distribuição com o passar do tempo de vida dos RNs, as amostras do primeiro dia apresentaram maior abundância de *Exiguobacterium*, *Prevotella*, e *Acinetobacter*, e foram diminuindo nas demais amostras dos outros tempos de coleta. Enquanto isso, a abundância de *Klebsiella* e *Escherichia–Shigella* estava baixa no primeiro dia e foi aumentando até se tornarem os táxons dominantes no grupo de amostras do 42º dia.

Reforçando esses achados, um estudo mais antigo realizado na Espanha (MOLES et al., 2013), que avaliou a microbiota de RNs prematuros menores de 32 semanas de IG desde o primeiro dia de vida até o dia 21, identificou os gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* em maior abundância. E, novamente, a distribuição dos gêneros sofreu modificações ao longo do tempo, *Staphylococcus* era predominante nas amostras da primeira semana, enquanto que *Enterococcus* predominava nas amostras da segunda e terceira semana. Além disso, esse estudo constatou que espécies de *Streptococcus* foram isoladas principalmente em amostras de mecônio, ao passo que bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*, foram isoladas exclusivamente em amostras de fezes da primeira semana em diante. Por fim, também é importante ressaltar que neste estudo espanhol foi escassa a presença de isolados de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nas amostras de fezes, gêneros que também foram identificados nas amostras do presente estudo em baixa abundância.

Esses estudos trazem sentido à alta predominância do gênero *Klebsiella* encontrada nas amostras deste trabalho, uma vez que o tempo de coleta das amostras foi em torno do décimo dia de vida dos RNs, período em que esse gênero passa a exibir maior dominância na microbiota dos neonatos prematuros. Do mesmo modo, a presença dos gêneros *Enterococcus* e *Staphylococcus* em abundância relativamente alta, mas baixa predominância no geral constatada nas amostras deste trabalho, especialmente no grupo controle, está em concordância com os estudos apresentados.

Em contrapartida, estudos realizados na Alemanha (KLOPP et al., 2022) e em Portugal (MORAIS et al., 2020) encontraram uma abundância muito superior do gênero *Bifidobacterium* nas amostras de mecônio de RNs prematuros. Achado esse que pode estar relacionado com aspectos geográficos e/ou culturais, uma vez que esse gênero é mais comumente encontrado em maior abundância em amostras de neonatos nascidos a termo (LU; CLAUD, 2019; CUNA et al., 2021), ou posteriormente na microbiota fecal de RNs prematuros com sua maturação devido ao consumo de leite materno (KORPELA et al., 2018). Neste trabalho, foi identificada a presença do gênero *Bifidobacterium* em ambos os grupos avaliados, mas em baixa quantidade de sequências.

A nível de filo, há uma discordância maior entre os estudos encontrados na literatura para ordem de maior abundância, mas os que predominam tanto em amostras de mecônio quanto em amostras de fezes dos primeiros dias dos RNs prematuros são os mesmos encontrados neste trabalho. Um estudo realizado no Brasil, em Porto Alegre (NUTRICIONIST et al., 2020) e o estudo português citado anteriormente (MORAIS et al., 2020) relataram maior abundância do filo Proteobacteria, da mesma forma que aqui; já o da Alemanha (KLOPP et al., 2022) e outro realizado na Finlândia (HILTUNEN et al., 2021) identificaram predominância maior de Firmicutes; enquanto que o estudo da China (KHAN et al., 2023) encontrou Firmicutes em maior abundância nas amostras até o dia 14, mudando para um perfil de predominância de Proteobacteria a partir do dia 21.

Em concordância com a literatura, a microbiota encontrada nas fezes de RNs prematuros no presente estudo possui baixa diversidade e alta variabilidade interindividual, como foi verificado nos resultados de abundância relativa de gêneros em amostras individuais (MOLES et al., 2013; HENDERICKX et al., 2019; CUNA et al., 2021; ROMANO-KEELER; SUN, 2022). Diferente da microbiota dos prematuros, RNs a termo costumam ser colonizados com gêneros comensais anaeróbios obrigatórios que possuem a capacidade de regular o desenvolvimento do epitélio intestinal, promovendo proteção e estímulos ao sistema imune (KHAN et al., 2023; ROMANO-KEELER; SUN, 2022; HENDERICKX et al., 2019). Assim, neonatos a termo frequentemente apresentam uma microbiota intestinal dominada por *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, contando também com a presença de *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Enterobacter* e/ou *Escherichia*, dependendo da região e da dieta (KALBERMATTER et al., 2021; MARTINO et al., 2022; MILANI et al., 2017).

A comunidade bacteriana encontrada nas amostras do grupo intervenção foi muito semelhante àquela apresentada nas amostras do grupo controle. Os RNs do estudo

não apresentaram diferença estatística significativa na diversidade ou abundância de táxons, na comparação dos grupos de acordo com o tipo de leite ingerido. Em oposição a esses resultados, vários estudos encontrados na literatura apresentaram diferenças na microbiota de prematuros de acordo com intervenções nas dieta, a maior parte deles comparavam a influência do consumo do leite materno com o consumo de fórmula infantil (GREGORY et al., 2016; GIBSON et al., 2016; KORPELA et al., 2018), mas alguns outros constataram diferenças na composição da microbiota e melhora significativa na saúde geral de RNs prematuros que se alimentavam do leite da própria mãe em comparação aos que se alimentavam do leite de doadora (FORD et al., 2019; KUMBHARE et al., 2022). Entretanto, existem controvérsias na consistência dessa influência. Em uma revisão analisando estudos sobre a microbiota de prematuros extremos, os autores chegaram à conclusão de que a dieta e a exposição a antibióticos possuem impacto muito menor na modulação da microbiota desse grupo de neonatos do que normalmente é constatado para RNs a termo, com microrganismos “consumidores de leite humano” consistentemente ausentes ou presentes em baixa abundância na maioria dos estudos analisados (UNDERWOOD; SOHN, 2017). De forma semelhante, no estudo realizado por Rao e colaboradores (2021), o agrupamento da microbiota de prematuros nos táxons encontrados era independente da dieta ou do tipo de parto. No entanto, deve-se ter em consideração que no presente estudo, todos os RNs receberam o leite de doadora, e sua composição varia consideravelmente de uma mulher para outra, o que influencia negativamente para observar diferenças de comparação direta entre os grupos controle e intervenção. Além disso, mesmo que a intervenção foi uniforme (inoculação de 1:10 do leite materno em leite de doadora), a variação na composição do leite de cada mãe e sua microbiota individual também dificulta a observação de diferenças claras entre os grupos. Uma análise futura, combinando dados clínicos, microbiota do leite, e amostras de fezes dos outros dias de acompanhamento, deverão ajudar a visualizar efeitos benéficos e fatores que possam estar associados da intervenção realizada no estudo geral.

Por sua vez, o consumo de fortificante do leite materno (FM) pelos RNs deste estudo durante o período anterior à coleta das amostras provocou alterações significativas na distribuição dos gêneros *Clostridium*, *Enterobacter* e *Veillonella*, todos aparecendo em maior quantidade nas amostras de RNs que consumiram FM, com efeito aparentemente intensificado nas amostras do grupo intervenção para os últimos dois gêneros. De forma semelhante, estudos anteriores também constataram elevada abundância dos gêneros *Clostridium* e *Enterobacter* na microbiota de RNs prematuros que foram alimentados com FM a base de leite bovino (AGUILAR-LOPEZ et al., 2021; ASBURY et al., 2022). Esse

resultado indica que além de auxiliar no ganho de peso nos RNs, o consumo de FM é capaz de provocar efeitos positivos através da sua modulação na microbiota, uma vez que espécies do gênero *Veillonella* utilizam produtos finais da fermentação de carboidratos por outras bactérias intestinais, como o lactato, para produzir propionato e acetato, ácidos graxos de cadeia curta que são considerados metabólicos benéficos da microbiota intestinal, pois apresentam características anti-inflamatórias e imunomoduladoras, influenciam a homeostase energética e aumentam a sensibilidade à insulina (MILANI et al., 2017; JOST et al., 2014; TANAKA et al., 2017). Assim como em outros estudos, o gênero *Veillonella* apareceu de forma abundante nas amostras de leite, e sua presença na microbiota já foi correlacionada com redução do risco de desenvolvimento de alergias alimentícias (WANG et al., 2022; TANAKA et al., 2017). Essa correlação também já foi constatada para o gênero *Clostridium* aparecendo em maiores quantidades em neonatos saudáveis do que nos que desenvolveram alergia (SHEN et al., 20219).

Diferente do que costuma acontecer com neonatos a termo, o tipo de parto não provocou diferença estatística na diversidade ou abundância de táxons da microbiota dos RNs prematuros deste estudo (RUTAYISIRE et al., 2016). Em congruência com esse resultado, outros estudos avaliando a microbiota de prematuros também relataram que o tipo de parto não exerceu diferenças significativas em sua composição (CONG et al., 2017; RAO et al., 2021; CUNA et al., 2021). Essa ausência de influência do tipo de parto na microbiota do neonato provavelmente decorre da característica disbiose apresentada pela microbiota vaginal de mães que tiveram parto prematuro, normalmente definida pela diminuição de espécies do gênero *Lactobacillus* (FETTWEIS et al., 2019; BAYAR et al., 2020; GUDNADOTTIR et al., 2022). Uma outra possibilidade é que a imaturidade do trato gastrointestinal desses RNs pode terminar influenciando de forma diferente para a colonização do que a mucosa do RN a termo.

Além disso, devido à frequente necessidade de longos períodos de internação e uso de aparelhos como cateteres, sonda gástrica e ventilação mecânica, a microbiota de neonatos prematuros costuma ser colonizada, principalmente, por microrganismos presentes no ambiente hospitalar, particularmente da UTI neonatal. Somado a isso, deve-se considerar o fato de que a maioria dos RNs acaba precisando fazer o uso de antibióticos, normalmente por vários dias. O que resulta na predominância de microrganismos oportunistas e, muitas vezes, resistentes a antimicrobianos, que conseguem se proliferar amplamente na mucosa intestinal dos RNs e facilmente invadir a corrente sanguínea provocando danos ao sistema imaturo desses neonatos (KHAN et al., 2023; CUNA et al., 2021; PAVEGLIO et al., 2020;

CHEN et al., 2020; HENDERICKX et al., 2019; MOLES et al., 2013). O que explica a rotineira dominância de gêneros como *Klebsiella* e *Enterococcus* na microbiota disbiótica de RNs prematuros, como foi o caso do presente estudo.

Espécies do gênero *Klebsiella* já foram amplamente descritas na literatura como principais agentes responsáveis pelo desenvolvimento de quadros de sepse tardia e ECN (MCCARTNEY; HOYLES, 2023; CHEN et al., 2020; PAVEGLIO et al., 2020). Neste trabalho foi constatado a presença de sepse tardia em seis RNs, dos quais três obtiveram resultados positivos na hemocultura com infecção por *Klebsiella pneumoniae*, outro por *Staphylococcus capitis*, um apresentou quadro de sepse fúngica por *Candida parapsilosis* e mais outro apresentou resultado de hemocultura com associação de *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (os quais também apareceram, cada um, em associação com as infecções por *K. pneumoniae*). Metade desses RNs nasceram com MBPN e a outra metade com EBPN. Esse resultado condiz com um estudo chinês que avaliou a incidência de sepse tardia em RNs com MBPN, e verificou que a incidência desse quadro por *K. pneumoniae* era o mais comum, seguido por *Staphylococcus* coagulase-negativa e *E. coli* (MULTICENTER STUDY COLLABORATIVE GROUP, 2023).

Por outro lado, neste estudo, ambas as amostras de RNs que apresentaram ECN (FP26 e FP28) tiveram uma baixa predominância do gênero *Klebsiella*, contando com maior abundância dos gêneros *Novosphingobium* e *Pseudoescherichia*, e contrastando com o estudo de Paveglia e colaboradores (2020) que identificou na microbiota intestinal a espécie *K. oxytoca*, produtora de citotoxina, como principal agente na patogênese da ECN nos RNs prematuros analisados.

Na avaliação da abundância dos dez gêneros mais predominantes nas amostras deste estudo, o grupo de RNs que teve infecção apresentou o gênero *Enterococcus* com maior abundância absoluta e relativa em comparação ao grupo sem infecção, o que se deve à presença da amostra FP02 no grupo de RNs com resultados de cultura positivos antes da coleta das fezes. Essa amostra corresponde a um dos neonatos que desenvolveu sepse tardia. Enquanto isso, o gênero *Klebsiella* foi superior em abundância absoluta no grupo que não teve infecção, mas possui maior valor da média de sequências no grupo de RNs que teve infecção, o que mostra que apesar de ter uma maior quantidade de amostras, no total, que apresentaram esse gênero no grupo sem infecção, ele se distribuiu de forma mais homogênea e com maior predominância sobre os outros gêneros no grupo de amostras de neonatos que tiveram alguma infecção. Inclusive, boa parte dos RNs do grupo que teve infecção apresentou

cultura positiva para *K. pneumoniae*, o que também aconteceu com alguns RNs do outro grupo, mas dias depois da coleta das fezes.

Curiosamente, o gênero *Klebsiella* também esteve presente em abundância relativamente alta nas amostras de leite, esse acontecimento possivelmente é resultado ou da colonização da microbiota do leite por esse microrganismo durante o período de internação das mães ou da contaminação das amostras de leite quando coletadas e manuseadas dentro da maternidade.

Ainda em se tratando das características apresentadas pela microbiota dos RNs de acordo com a presença de infecção, foi observada de forma significativa uma maior abundância do gênero *Turicibacter* em amostras dos RNs que não tiveram infecção, concordando com a literatura, uma vez que já foi constatado que esse gênero possui efeito protetor contra algumas infecções através da produção de ácido lático, proporcionando nutrição às células epiteliais intestinais e regulando a função do sistema imune (HUANG et al., 2021; MACIEL-FIUZA et al., 2023).

A literatura indica que a microbiota de RNs prematuros também é fortemente influenciada pela IG e o peso ao nascer (KLOPP et al., 2022; KORPELA et al., 2018; CUNA et al., 2021; HEIDA et al., 2021). Neste estudo a IG apresentou correlação com a abundância do gênero *Clostridium*, o qual estava aumentado de forma significativa em amostras de RNs MPT e baixo em RNS EPT. É possível que fossem percebidas maiores alterações na microbiota devido à IG caso houvesse um número mais similar de amostras em cada grupo. Já a classificação de peso ao nascer apresentou maior influência, provocando alterações significativas na alfa diversidade, onde as amostras do grupo de MBPN apresentaram maior riqueza e distribuição mais uniforme dos táxons em comparação ao grupo de BPN. Além das diferenças na abundância de alguns gêneros, onde o grupo MBPN apresentou maior quantidade de sequências de *Pantoea* sp. em comparação ao grupo EBPN, o qual por sua vez, continha maior abundância de *Cutibacterium* sp., *Phreatobacter* sp., *Prevotella* sp. e *Alistipes* sp. que os outros dois grupos.

Enquanto isso, a abundância do gênero *Novosphingobium* apresentou uma correlação com o uso de antibióticos, aparecendo aumentado de forma significativa nas amostras de RNs que fizeram o uso no período anterior à coleta das amostras de fezes, independente do grupo do estudo (controle/intervenção). Esse achado se torna coerente com a constatação de que muitos estudos já encontraram relação deste gênero com resistência a antimicrobianos (LU et al., 2022; MIRAULA et al., 2015; SELLECK et al., 2020; VAZ-MOREIRA; NUNES; MANAIA, 2011), inclusive em amostras de água de reservatório hospitalar (NARCISO-DA-

ROCHA; VAZ-MOREIRA; MANAIA, 2014). Por outro lado, também já foi relatado potencial atividade antimicrobiana em espécies de *Novosphingobium* (DU; SINGH; YI, 2016; ELSAEED et al, 2023). Esse gênero também estava presente de forma predominante nas amostras dos leites, o que faz sentido, uma vez que aproximadamente 80% das mães do grupo intervenção fizeram uso de antibiótico durante a gestação e/ou após o parto.

Assim como *Novosphingobium* sp., o gênero *Herbaspirillum* também apresentou diferença significativa em sua distribuição quando avaliada a influência do uso de antibiótico na composição microbiana dos RNs deste estudo, estando presente em maior proporção nas amostras dos neonatos que utilizaram algum antibiótico no período anterior à coleta de amostras de fezes. Achado esse que condiz com estudos realizados anteriormente constatando a capacidade de resistência a antimicrobianos em espécies desse gênero (OLIVEIRA et al., 2021; LI et al., 2022).

Fatores maternos durante a gravidez, como dieta, uso de antibióticos e infecções, podem influenciar na composição da microbiota dos RNs através da exposição fetal a metabólitos produzidos pela microbiota materna passados pela placenta, que vão modular o desenvolvimento do sistema imune, consequentemente afetando a colonização da microbiota do RN (MARTINO et al., 2022).

Na avaliação da influência indireta dos antibióticos na microbiota dos RNs, foi verificado que quando as mães faziam uso de antibiótico durante a gestação e/ou após o parto, o gênero *Enterobacter* aparecia na microbiota intestinal dos RNs em proporções significativamente maiores, tanto quando feita a avaliação considerando todas as amostras do estudo quanto quando eram avaliadas somente amostras do grupo intervenção. Esse gênero já foi amplamente descrito na literatura como pertencente a um grupo de microrganismos frequentemente envolvidos em processos infecciosos no ambiente hospitalar (ESKAPE-E: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., e *Escherichia coli*), os quais possuem uma considerável resistência intrínseca e extensiva capacidade para adquirir multirresistência a antimicrobianos (AYOBAMI et al., 2022; DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈS, 2019). A maior parte das mães que utilizaram antibiótico tinham a intenção de tratar alguma infecção, porém, em quase um terço das vezes foi feito o uso somente de forma pontual, como antibiótico intraparto para profilaxia de infecções durante o parto cesárea. Já foi observado anteriormente efeito significativo do uso de antibiótico intraparto na composição da microbiota intestinal de RNs prematuros (CUNA et al., 2021).

Outro fator materno que apresentou efeito modulador na microbiota dos RNs deste estudo foi a presença de infecções nas mães. Tanto durante a gestação quanto nos primeiros dias após o parto, de forma significativa, o gênero *Veillonella* esteve presente em maiores proporções nas amostras de RNs cuja mãe não apresentou quadro infeccioso. Esse gênero bacteriano também esteve presente na microbiota do leite e, como descrito anteriormente, possui atividade metabólica com produção de ácidos graxos de cadeia curta com ação anti-inflamatória (MILANI et al., 2017; JOST et al., 2013), além de atividade imunomodulatória com promoção de vias de sinalização para citocinas e interleucinas, importantes para o neurodesenvolvimento infantil (GUZZARDI et al., 2022).

Dentre os gêneros de maior abundância encontrados neste estudo, *Kluyvera* sp. aparentou apresentar maior associação com o grupo controle, estando presente em maior abundância nas amostras desse grupo na maioria das categorias analisadas. De acordo com a literatura, esse gênero já foi reportado como agente infeccioso em pacientes desde neonatos até adultos (CARTER; LAURINI; MIZELL, 2008; BOLAT et al., 2013; LEE et al., 2019). Os achados deste estudo divergem da literatura apresentada, visto que *Kluyvera* sp. apresentou-se significativamente aumentado nas amostras de RNs do grupo intervenção cuja mãe não teve infecção após o parto. Em compensação, um estudo que procurou avaliar as diferenças na microbiota de neonatos de acordo com o tipo de parto, constatou a presença do gênero *Kluyvera* em RNs saudáveis nascidos a termo (TONON et al., 2021).

O gênero *Acinetobacter*, já encontrado em amostras de RNs pré-termos em outros estudos (KHAN et al., 2023; TIRONE et al., 2019; BROOKS et al., 2018), esteve presente de forma mais acentuada nas amostras do grupo intervenção, independente das outras características analisadas, o que faria sentido com o desenho experimental do estudo já que esse gênero também estava presente em alta quantidade nas amostras de leite. Porém quando analisada a abundância relativa em amostras individuais, foi verificado que a elevada quantidade de sequências identificadas correspondem principalmente à amostra FP44, e essa amostra pertence a um RN cuja mãe passou por um quadro de corioamnionite, isso poderia explicar essa colonização acentuada pois, alguns estudos anteriores, encontraram uma correlação entre uma espécie do gênero *Acinetobacter* e o desenvolvimento da corioamnionite em mães que tiveram parto prematuro (AIVAZOVA et al., 2009; KOSTADINOV et al., 2013).

Pseudomonas sp. não apresentou associação clara com nenhum grupo do estudo e não esteve aumentado de forma significativa em nenhum parâmetro avaliado. Esteve presente em algumas amostras de leite, mas em baixas quantidades. Vale ressaltar que é

possível que o gênero identificado como *Pseudeshcherichia* no banco de dados do RDP seja, na verdade, *Escherichia-Shigella*, uma vez que foi encontrada essa identificação no banco de dados Silva, mas não foi identificado *Pseudeshcherichia*. Já os bancos GTDB e GreenGenes não foram capazes de fazer a identificação de nenhum dos dois gêneros discutidos. Ambos os gêneros são muito próximos, já tendo sido proposta a reclassificação de uma espécie de *Escherichia* para *Pseudeshcherichia* em um estudo de genômica comparativa (ALNAJAR; GUPTA, 2017).

De forma semelhante, o gênero *Serratia* também não esteve aumentado de forma significativa em nenhum parâmetro avaliado, mas parece estar aumentado de forma mais intensa no grupo controle, independente dos outros parâmetros avaliados. Isso pode ser resultado da presença da amostra FP33, pois sempre que presente, os subgrupos com controle associado a outro parâmetro apresentavam maior quantidade de sequências desse gênero. No estudo de Moles e colaboradores (2013), foi notada a influência da IG e de fatores hospitalares na incidência do gênero *Serratia*, estando significativamente mais frequente nas amostras de RNs com 30 semanas de IG e quando os neonatos tinham estadia prolongada no hospital, uso prolongado de antibióticos ou necessidade de ventilação mecânica. Logo, é possível que análises futuras com a investigação desses parâmetros encontre alguma associação com esses fatores.

É possível notar que o leite restaurado exerceu influência muito sutil na colonização da microbiota intestinal dos RNs estudados, a maioria dos binômios avaliados compartilham táxons muito expressivos, mas a microbiota dos RNs do grupo intervenção não estava completamente dominada pelos gêneros que predominam a microbiota dos leites correspondentes. Dessa forma, o peso do RN ao nascer, o consumo de fortificante do leite materno e os fatores maternos (infecções e uso de antibiótico pelas mães) provocaram mudanças muito maiores na microbiota dos RNs do que a intervenção proposta na dieta ou mesmo o tipo de parto.

A IG, o uso de antibióticos pelos RNs e a presença de infecções também exercem influência na modulação da microbiota dos RNs. Mas é possível que a diferença no número de indivíduos em cada grupo também seja responsável pelas diferenças encontradas na distribuição dos táxons entre os grupos analisados, especialmente para o fator IG. Logo, faz-se necessária uma segunda avaliação dessas influências com o aumento do número de amostras.

Em conclusão, os resultados da análise dos dados clínicos e da microbiota presente nas amostras sequenciadas indicam que os grupos se apresentam muito semelhantes,

sugerindo que para os RNs avaliados até agora, a intervenção do consumo do leite de doadora com reconstituição da microbiota da mãe não surtiu um efeito explícito na modulação da microbiota. Resultado que provavelmente sofreu influência dos outros fatores analisados no estudo, uma vez que a maior parte deles apresentou diferenças significativas na abundância e/ou diversidade de táxons, mesmo que a incidência dessas características clínicas não tenha apresentado diferença estatística entre os grupos do estudo. É evidente que a análise da microbiota de RNs prematuros precisa considerar múltiplos fatores de interação, logo, compreender o papel de qualquer processo individual acaba sendo uma tarefa complicada.

7 CONCLUSÕES

Considerando os principais resultados apresentados:

- Não se observou diferença explícita entre os grupos controle e intervenção de acordo com os parâmetros clínicos avaliados.
- Ao analisar a composição da microbiota intestinal dos RNs, para a maioria das categorias (“idade gestacional”, “peso ao nascer”, “uso de antibióticos pelos RNs”, “infecções nos RNs”, “consumo de FM”, “infecção nas mães durante a gestação”, “Infecção nas mães no período pós parto” - tanto avaliando todas as amostras quanto avaliando apenas o grupo intervenção, “uso de antibióticos pelas mães” - tanto avaliando todas as amostras quanto apenas as do grupo intervenção) foram observadas diferenças na abundância de determinados gêneros bacterianos e apenas as categorias “intervenção na dieta com LD-R” e “tipo de parto” não apresentaram diferenças na abundância de gêneros bacterianos.
- Ao analisar a diversidade da microbiota intestinal dos RNs, foram observadas diferenças significativas na alfa diversidade para os parâmetros “peso ao nascer”, no qual o grupo de amostras de RNs com MBPN apresentou maior diversidade de táxons que o grupo de amostras dos RNs com BPN; e “Infecção nas mães no período pós parto” quando avaliada a influência considerando todas as amostras, no qual o grupo de amostras dos RNs cuja mãe não teve infecção nesse período apresentou maior diversidade de táxons que o grupo de amostras dos RNs cuja mãe teve infecção. Os parâmetros restantes não apresentaram diferença estatística para alfa diversidade e nenhum dos parâmetros avaliados provocou diferença significativa para a beta diversidade entre os grupos avaliados.

- O perfil de abundância do LI, a nível de gênero, assemelha-se com a do LM para a maioria das amostras avaliadas.

Torna-se possível concluir que a hipótese do trabalho foi parcialmente demonstrada, uma vez que a inoculação do LM no LD resulta na restauração parcial da microbiota do leite, porém se essa inoculação de fato é suficiente para modular a colonização da microbiota intestinal dos RNs prematuros, os achados indicam que seria necessário realizar análises mais complexas que considerem tanto as características clínicas, os parâmetros clínicos de acompanhamento dos binômios ao longo da sua intervenção, a composição das microbiotas dos leites, seus metabolomas, assim como as microbiotas das fezes dos RNs, com um número maior de indivíduos por grupo. As perspectivas são de que a continuação do trabalho com o projeto guarda-chuva possa chegar a determinar os alcances reais da intervenção realizada.

REFERÊNCIAS

ADA, M. M. L. et al. Trends in provider-initiated versus spontaneous preterm deliveries, 2004–2013. **Journal of Perinatology**, v. 37, n. 11, p. 1187–1191, 2017.

AGUILAR-LOPEZ, M. et al. Human Milk-Based or Bovine Milk-Based Fortifiers Differentially Impact the Development of the Gut Microbiota of Preterm Infants. **Frontiers In Pediatrics**, v. 9, n. 30, nov. 2021. Frontiers Media SA.

AIVAZOVA, V. et al. Acinetobacter baumannii infection during pregnancy and puerperium. **Archives Of Gynecology And Obstetrics**, v. 281, n. 1, p. 171-174, 22 maio 2009. Springer Science and Business Media LLC.

ALNAJAR, S.; GUPTA, R. S. Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family Enterobacteriaceae and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. **Infection, Genetics And Evolution**, v. 54, p. 108-127, out. 2017. Elsevier BV.

ASBURY, M. R. et al Human milk nutrient fortifiers alter the developing gastrointestinal microbiota of very-low-birth-weight infants. **Cell Host & Microbe**, v. 30, n. 9, p. 1328-1339.e5, set. 2022. Elsevier BV.

AYOBAMI, O. et al. Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, n. 1, p. 443-451, 4 fev. 2022. Informa UK Limited.

BARFIELD, W. D. et al. Public Health Implications of Very Preterm Birth Wanda. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2019.

BASSLER, D. et al. Using a count of neonatal morbidities to predict poor outcome in extremely low birth weight infants: Added role of neonatal infection. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. 313–318, 2009.

BAYAR, E. et al. The pregnancy microbiome and preterm birth. **Seminars In Immunopathology**, v. 42, n. 4, p. 487-499, ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

BERING, S. Human Milk Oligosaccharides to Prevent Gut Dysfunction and Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1461, 8 out. 2018. MDPI AG.

BLESA, M. et al. Early breast milk exposure modifies brain connectivity in preterm infants. **Neuroimage**, v. 184, p. 431-439, jan. 2019. Elsevier BV.

BOKULICH, N. A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 90, p. 1–17, 2018.

BOLAT F. et al. A neonate with kluuvera sepsis: a case report. **Iran J Pediatr.** v. 23, n. 3, p. 371-2, jun. 2013.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

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

BOSCARINO, G. et al. Early enteral feeding improves tolerance of parenteral nutrition in preterm newborns. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 1–10, 2021.

BROOKS, B. et al. The developing premature infant gut microbiome is a major factor shaping the microbiome of neonatal intensive care unit rooms. **Microbiome**, v. 6, n. 1, 20 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

CACHO, N. T. et al. Personalization of the Microbiota of Donor Human Milk with Mother's Own Milk. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, 3 ago. 2017. Frontiers Media SA.

CALLAHAN, B. J. et al. Dada2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CAO, Y. et al. Assessment of Neonatal Intensive Care Unit Practices, Morbidity, and Mortality among Very Preterm Infants in China. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 8, 2021.

CARTER, J. E.; LAURINI, J. A.; MIZELL, K. N. Kluuvera Infections in The Pediatric Population. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, n. 9, p. 839-841, set. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

CHEN, Y. et al. Preterm infants harbour diverse Klebsiella populations, including atypical species that encode and produce an array of antimicrobial resistance- and virulence-associated factors. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 6, 21 mai. 2020. Microbiology Society.

COLLADO, M. C. et al. Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants. **Pediatric Research**, v. 77, n. 6, p. 726–731, 2015.

CONG, X. et al. Gut Microbiome Developmental Patterns in Early Life of Preterm Infants: impacts of feeding and gender. **Plos One**, v. 11, n. 4, p. e0152751, 25 abr. 2016. Public Library of Science (PLoS).

CUNA, A. et al. Dynamics of the preterm gut microbiome in health and disease. **American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology**, v. 320, n. 4, p. G411-G419, 1 abr. 2021. American Physiological Society.

CUTLAND, C. L. et al. Low birth weight: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of maternal immunization safety data. **Vaccine**, v. 35, n. 48, p. 6492–6500, 2017.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J.; PAGÈS, J. Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, 18 set. 2019. American Society for Microbiology.

DE MELO, T. F. M. et al. Custos diretos da prematuridade e fatores associados ao nascimento e condições maternas. **Revista de Saúde Pública**, v. 56, p. 1–14, 2022.

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.

DU, J.; SINGH, H.; YI, T. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Novosphingobium* sp. THG-C3 and their antimicrobial potential. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 211–217, 5 maio 2016. Informa UK

ELSAEED, E. et al. Mining *Chromodoris quadricolor* symbionts for biosynthesis of novel secondary metabolites. **Marine Genomics**, v. 68, p. 101017, abr. 2023. Elsevier BV.

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, 9 nov. 2018. Frontiers Media SA.

FETTWEIS, J. M. et al. The vaginal microbiome and preterm birth. **Nature Medicine**, v. 25, n. June, p. 1012–1021, 2019.

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

GENSOLLEN, T. et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, v. 352, n. 6285, p.539-544, 28 abr. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

GIBSON, M. K. et al. Developmental dynamics of the preterm infant gut microbiota and antibiotic resistome. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 4, 7 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

GINAR, D. O.; NAZÁRIO, N. O. Prevalência e fatores associados à prematuridade, em Santa Catarina, no período de 2016 a 2018. **Repositório Universitário da nima**, 2020.

GOMAA, E. Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 113, n. 12, p. 2019–2040, 2020.

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, p. R11–R45, 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, dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

GRIGGS, K. M. et al. Preterm Labor and Birth: A Clinical Review. **MCN The American Journal of Maternal/Child Nursing**, v. 45, n. 6, p. 328–337, 2020.

GUDNADOTTIR, U. et al. The vaginal microbiome and the risk of preterm birth: a systematic review and network meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 13 maio. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

GUZZARDI, M. A. et al. Maternal pre-pregnancy overweight and neonatal gut bacterial colonization are associated with cognitive development and gut microbiota composition in pre-school-age offspring. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 100, p. 311–320, fev. 2022. Elsevier BV.

HARRISON, M. S.; GOLDENBERG, R. L. Global burden of prematurity. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 21, n. 2, p. 74–79, 2016.

HEIDA, F. H. et al. Weight shapes the intestinal microbiome in preterm infants: results of a prospective observational study. **Bmc Microbiology**, v. 21, n. 1, 21 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

HENDERICKX, J. G. E. et al. The Preterm Gut Microbiota: an inconspicuous challenge in nutritional neonatal care. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 9, 2 abr. 2019. Frontiers Media SA.

HILTUNEN, H. et al. Preterm infant meconium microbiota transplant induces growth failure, inflammatory activation, and metabolic disturbances in germ-free mice. **Cell Reports Medicine**, v. 2, n. 11, p. 100447, nov. 2021. Elsevier BV.

HOSSAIN, Z. et al. Effects of total enteral nutrition on early growth, immunity, and neuronal development of preterm infants. **Nutrients**, v. 13, n. 8, p. 1–13, 2021.

HUANG, C. et al. Effects of Four Antibiotics on the Diversity of the Intestinal Microbiota. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, 27 abr. 2022. American Society for Microbiology.

HUG, L. et al. **Levels & Trends in Child Mortality**. New York, NY, USA: [s.n.].

JOST, T. et al. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2891-2904, 3 set. 2013. Wiley.

KALBERMATTER, C. et al. Maternal Microbiota, Early Life Colonization and Breast Milk Drive Immune Development in the Newborn. **Frontiers In Immunology**, v. 12, 13 maio 2021. Frontiers Media SA.

KATOH, K. et al. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 14, p. 3059–3066, 2002.

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

KHAN, A. et al. Dynamic changes of the gut microbial colonization in preterm infants with different time points after birth. **Frontiers In Microbiology**, v. 14, 17 fev. 2023. Frontiers Media SA.

KINNEY, M.; VAZ, L. New low birthweight and preterm birth estimates: Know what they are and how to use them. **Save the Children**, p. 1–7, 2020.

KLOPP, J. et al. Meconium Microbiome of Very Preterm Infants across Germany. **mSphere**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2022.

KÖCK, K. et al. Diabetes mellitus and the risk of preterm birth with regard to the risk of spontaneous preterm birth. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 23, n. 9, p. 1004–1008, 2010.

KORPELA, K. et al. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 6 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

KOSTADINOV, S. et al. Pregnancy and Perinatal Outcomes Associated with *Acinetobacter baumannii* Infection. **American Journal Of Perinatology Reports**, v. 03, n. 01, p. 051-056, 7 fev. 2013. Georg Thieme Verlag KG.

KUMBHARE, S. V. et al. Source of human milk (mother or donor) is more important than fortifier type (human or bovine) in shaping the preterm infant microbiome. **Cell Reports Medicine**, v. 3, n. 9, p. 100712, set. 2022. Elsevier BV.

LEE, J. et al. *Kluyvera ascorbata* as a Pathogen in Adults and Children: clinical features and antibiotic susceptibilities in a single center study. **Japanese Journal Of Infectious Diseases**, v. 72, n. 3, p. 142-148, 2019. Editorial Committee of Japanese Journal of Infectious Diseases, National Institute of Infectious Dis.

LI, X. et al. First Study of Bacteremia Caused by *Herbaspirillum huttiense* in China: a brief research report and literature review. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 12, n. 17 jun. 2022. Frontiers Media SA.

LU, J.; CLAUD, E. C. Connection between gut microbiome and brain development in preterm infants. **Developmental Psychobiology**, v. 61, n. 5, p. 739-751, 20 nov. 2018. Wiley.

LU, L. Dispersal of antibiotic resistance genes in an agricultural influenced multi-branch river network. **Science Of The Total Environment**, v. 830, p. 154739, jul. 2022. Elsevier BV.

MACIEL-FIUZA, M. F. Role of gut microbiota in infectious and inflammatory diseases. **Frontiers In Microbiology**, v. 14, n. 27 mar. 2023. Frontiers Media SA.

MACPHERSON, A. J.; AGÜERO, M. G.; GANAL-VONARBURG, S. C. How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 8, p.508-517, 12 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

MAIDAK, B. L. et al. The Ribosomal Database Project (RDP). **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 1, p. 82–85, 1996.

MARTINELLI, K. G. et al. Prematuridade no Brasil entre 2012 e 2019: dados do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos. **Revista Brasileira de Estudos de Populacao**, v. 38, p. 1–15, 2021.

MARTINO, C. et al. Microbiota succession throughout life from the cradle to the grave. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 12, p. 707–720, 2022.

MCCARTNEY, A. L.; HOYLES, L. The role of *Klebsiella* populations in preterm infants. **Biochem Soc Trans**, v. 51, n. 2, p. 887–896, 26 abr. 2023.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS ONE**. v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

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, p. 1–67, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção À Saúde, Departamento de Atenção Básica. Saúde da criança: nutrição infantil: aleitamento materno e alimentação complementar. 23. ed. Brasília: Ms: **Editora do Ministério da Saúde**, 2009. 112 p. (Série A). Disponível em:

https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_crianca_nutricao_aleitamento_alimentacao.pdf. Acesso em: 07 jan. 2021.

MIRAULA, M. et al. β -Lactam antibiotic-degrading enzymes from non-pathogenic marine organisms: a potential threat to human health. **Jbic Journal Of Biological Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 639-651, 14 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

MOLES, L. et al. Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

MORAIS, J. Extremely preterm neonates have more Lactobacillus in meconium than very preterm neonates – the in utero microbial colonization hypothesis. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1785804, 13 jul. 2020. Informa UK Limited.

MULTICENTER STUDY COLLABORATIVE GROUP. Evaluation of Outcomes in Very Low Birth Weight Infants. [A multicenter prospective cohort study of late-onset sepsis and its poor prognosis in very low birth weight infants]. **Zhonghua Er Ke Za Zhi**. China, v. 61, n. 3, 2 mar. 2023.

NARCISO-DA-ROCHA, C.; VAZ-MOREIRA, I.; MANAIA, C. M. Genotypic diversity and antibiotic resistance in Sphingomonadaceae isolated from hospital tap water. **Science Of The Total Environment**, v. 466-467, p. 127-135, jan. 2014. Elsevier BV.

NUTRICIONIST, A. C. T. et al. Meconium microbiome and its relation to neonatal growth and head circumference catch-up in preterm infants. **Plos One**, v. 15, n. 9, p. e0238632, 21 set. 2020. Public Library of Science (PLoS).

OLIVEIRA, W. K et al. High Genomic Identity between Clinical and Environmental Strains of *Herbaspirillum frisingense* Suggests Pre-Adaptation to Different Hosts and Intrinsic Resistance to Multiple Drugs. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1409, 18 nov. 2021. MDPI AG.

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

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.

PARKS, D. H. et al. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 2014.

PAVEGLIO, S. et al. Cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca* in the preterm gut and its association with necrotizing enterocolitis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 1321-1329, 1 jan. 2020. Informa UK Limited.

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.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2022, URL: <<https://www.R-project.org/>>.

RAO, C. et al. Multi-kingdom ecological drivers of microbiota assembly in preterm infants. **Nature**, v. 591, n. 7851, p. 633-638, 24 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

REAM, M. A.; LEHWALD, L. Neurologic Consequences of Preterm Birth. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 18, n. 8, 2017.

ROBERTSON, R. C. et al. The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. **Trends In Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 131-147, fev. 2019. Elsevier BV.

ROMANO-KEELER, J.; SUN, J. The First 1000 Days: assembly of the neonatal microbiome and its impact on health outcomes. **Newborn**, v. 1, n. 2, p. 219-226, 5 jul. 2022. Jaypee Brothers Medical Publishing.

ROOKS, M. G.; GARRETT, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nat Rev Immunol.**, v. 16, n. 6, p. 341–352, 2016.

RUTAYISIRE, E. et al. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. **Bmc Gastroenterology**, v. 16, n. 1, 30 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

SELLECK, C. et al. Structure and mechanism of potent bifunctional β -lactam- and homoserine lactone-degrading enzymes from marine microorganisms. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 30 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

SHEN, X. et al. Dynamic construction of gut microbiota may influence allergic diseases of infants in Southwest China. **Bmc Microbiology**, v. 19, n. 1, 10 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

SHI, N. et al. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. **Military Medical Research**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2017.

STEWART, C. J. Temporal bacterial and metabolic development of the preterm gut reveals specific signatures in health and disease. **Microbiome**, v. 4, n. 1, dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

TANAKA, M. et al. Signatures in the gut microbiota of Japanese infants who developed food allergies in early childhood. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 8, ago 2017.

THOENE, M.; ANDERSON-BERRY, A. Early enteral feeding in preterm infants: A narrative review of the nutritional, metabolic, and developmental benefits. **Nutrients**, v. 13, n. 7, 2021.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p.1823-1836, 16 maio 2017. Portland Press Ltd.

TIRONE, C. et al. Gut and Lung Microbiota in Preterm Infants: immunological modulation and implication in neonatal outcomes. **Frontiers In Immunology**, v. 10, 12 dez. 2019. Frontiers Media SA.

TONON K. M. et al. Gut microbiota comparison of vaginally and cesarean born infants exclusively breastfed by mothers secreting α 1-2 fucosylated oligosaccharides in breast milk. **PLoS One**. v. 16, n. 2, p. e0246839, 8 fev. 2021.

TU, Y. F. et al. Epilepsy occurrence after neonatal morbidities in very preterm infants. **Epilepsia**, v. 60, n. 10, p. 2086–2094, 2019.

UNAR-MUNGUÍA, M. et al. Breastfeeding Mode and Risk of Breast Cancer: a dose response meta-analysis. **Journal Of Human Lactation**, v. 33, n. 2, p. 422-434, 14 fev. 2017. SAGE Publications.

UNDERWOOD, M. A.; SOHN, K. The Microbiota of the Extremely Preterm Infant. **Clinics In Perinatology**, v. 44, n. 2, p. 407-427, jun. 2017. Elsevier BV.

VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Diversity and Antibiotic Resistance Patterns of Sphingomonadaceae Isolates from Drinking Water. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5697-5706, 15 ago. 2011. American Society for Microbiology.

VICTORA, C. G. et al. Association between breastfeeding and intelligence, educational attainment, and income at 30 years of age: a prospective birth cohort study from brazil. **The Lancet Global Health**, v. 3, n. 4, p. e199-e205, abr. 2015. Elsevier BV.

VOGEL, J. P. et al. The global epidemiology of preterm birth. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, 2018.

WALANI, S. R. Global burden of preterm birth. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 150, n. March, p. 31–33, 2020.

WALSH, V. et al. Early full enteral feeding for preterm or low birth weight infants. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2020, n. 12, 2020.

WANG, S. et al. Association Between Breastmilk Microbiota and Food Allergy in Infants. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 11, p. 1, 12 jan. 2022. Frontiers Media SA.

WANG, Y. P. et al. Mode of conception and risk of spontaneous vs. provider-initiated preterm birth: population-based cohort study. **Fertility and Sterility**, v. 118, n. 5, p. 926–935, 2022.

WHO; UNICEF. **Born too Soon: Decade of action on preterm birth**. Geneva: 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WICKHAM H. et al. “Welcome to the tidyverse.” **Journal of Open Source Software**, v. 4, n. 43, p. 1686, 2019.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Springer-Verlag**, New York, 2016.

ZMORA, N.; SUEZ, J.; ELINAV, E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 35–56, 2019.

ANEXO 1 – TCLE

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 SOBREVIVÊNCIA 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 SOBREVIVÊNCIA 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 instância poderá ser contactado 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 SOBREVIDA 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: mmspires@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 assinie 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:

ANEXO 2 – Antibióticos (mães)

Tabela de Antibióticos e demais medicamentos utilizados pelas mães

Código do RN	ATB durante a gestação	ATB após o parto	Outros medicamentos prescritos e/ou utilizados pelas Mães durante período perinatal
FP01	Não especificado no PM: "ATB profilático para PC"	Cefalexina	Enalapril, Anlodipino e Sulfato de magnésio.
FP02	Ampicilina	Não Utilizou	Nifedipino, Levotiroxina, Sulfato ferroso, Ocitocina, Ácido tranexâmico, Ergometrina, Misoprostol, Enalapril, Enoxaparina, Clonidina, Heparina profilática, Betametasona e Sulfato de magnésio.
FP03	Não Utilizou	ATB pós cesárea não especificado no PM	Betametasona e Sulfato de magnésio
FP04	Não Utilizou	Não Utilizou	Ocitocina, Ergometrina, Nifedipino, Betametasona e Sulfato de magnésio.
FP05	Cefazolina	Não Utilizou	Paracetamol, Dexametasona, Betametasona, Hidrocortisona e Heparina.
FP06	Cefalexina	Não Utilizou	Heparina, Metildopa, Hidralazina, Enalapril, Anlodipino, Betametasona e Sulfatação.
FP07	Não Utilizou	ATB pós cesárea não especificado no PM	Utrogestan, Sulfato ferroso, Ácido acetilsalicílico, Metildopa, Hidralazina, Heparina, Betametasona, Enalapril, Anlodipino e Carbonato de cálcio.
FP08	Não Utilizou	Não Utilizou	Ocitocina, Clonidina e Sulfato ferroso.
FP09	Não Utilizou	Não Utilizou	Metformina, Ácido acetilsalicílico e Sulfato ferroso.
FP10	Penicilina	Não Utilizou	Sulfato ferroso.
FP11	Não Utilizou	ATB pós cesárea não especificado no PM	Metildopa, Betametasona e Clonidina.
FP13	Não Utilizou	Cefazolina e Cefalexina	Metildopa, Hidralazina, Sulfato ferroso, Ocitocina, Transamin, Misoprostol, Betametasona, Enalapril, Anlodipino, Propranolol e Furosemida.
FP15	Não Utilizou	ATB pós cesárea não especificado no PM	Tramadol, Sulfatação, Metildopa, Hidralazina, Heparina, Betametasona, Neozine, Paracetamol, Enalapril, Anlodipino, Propranolol e HCTZ (hidroclorotiazida).
FP18	Kefazol, Penicilina e "ATBC"	Não Utilizou	Nifedipina, Betametasona e Utrogestan.
FP19*			Utrogestan, Ácido fólico, Sulfato ferroso, Ocitocina, Nifedipino, Terbutalina,
FP20*	Penicilina cristalina	Não Utilizou	Betametasona, Sulfato de magnésio, Dramim e Tramadol.
FP21	Cefalexina	Cefazolina e outro ATB não especificado	Salbutamol, Metoclopramida, Betametasona, Sulfato de magnésio, Hidróxido de alumínio, Enoxaparina, Levomepromazina e Heparina.
FP22	Penicilina e Cefalexina	Não Utilizou	Sulfato ferroso, Ocitocina, Nifedipino, Betametasona, Terbutalina, Buscopan, Sulfato de magnésio e Enoxaparina
FP23*			Betametasona, Loperamida, Slowk, Sulfato ferroso, Enalapril, Metildopa, Hidralazina,
FP24*	Cefalexina	Metronidazol	Neozine, Vitamina B6, Enoxaparina, Albendazol, Polaramine e Budesonida nasal.

FP25	Azitromicina	Clindamicina, Gentamicina, Metronidazol, Azitromicina, Amoxicilina e Clavulanato	Betametasona, Sulfato de magnésio, Ocitocina e Heparina.
FP26	Não Utilizou	ATB pós cesárea não especificado no PM	Metildopa, Ácido acetilsalicílico, Carbonato de Cálcio, Sulfato ferroso, Hidróxido de alumínio, Enalapril, Anlodipino, Hidralazina, Nifedipino, Betametasona, Enoxaparina e Sulfato de magnésio.
FP27	Não Utilizou	Não Utilizou	Neozine, Dipirona, Fleet enema, Diclofenaco, Dorlfex e Betametasona.
FP28	Não Utilizou	ATB pós cesárea não especificado no PM	Metildopa, Sulfato de magnésio, Betametasona, Ácido acetilsalicílico, Enalapril, Anlodipino, Clonidina e Hidralazina.
FP29	Cefazolina, Metronidazol e Cefalexina	Não Utilizou	Levotiroxina, Vitamina D, Ácido fólico, Ácido acetilsalicílico, Nifedipino, Betametasona, Sulfato de magnésio e Sulfato ferroso.
FP31	Cefazolina, Ampiciclina e Gentamicina	Ampiciclina, Gentamicina, Cefazolina e Benzetaçil	Betametasona, Nifedipina, Sulfato magnésio e Tramadol.
FP32	Cefalexina	Não Utilizou	Sulfato ferroso, Betametasona, Colírio oftálmico, Buscopam composto, Sulfato de magnésio e Óleo mineral.
FP33	Penicilina cristalina	Cefalexina	Puran, Ocitocina, Betametasona, Sulfato de Magnésio e Levotiroxina.
FP34	Penicilina cristalina	Não Utilizou	Sulfato ferroso, Nifedipino, Betametasona, Matergan, Utrogestan, Insulina, Sulfato de magnésio e Imunoglobulina anti-rho.
FP35	Não especificado no PM: "ATBC"	Não Utilizou	Betametasona e Sulfato de magnésio.
FP36	Não Utilizou	Não Utilizou	Betametasona, Lamotrigina e Utrogestan.
FP37	Não Utilizou	ATB pós cesárea não especificado no PM	Não consta.
FP38	Não Utilizou	ATB pós cesárea não especificado no PM	Metildopa, Enoxaparina, Betametasona, Heparina, Polaramine, Hidróxido de alumínio, Sulfato ferroso, Enalapril, Óleo mineral e Lactulose.
FP39*	Não Utilizou	Não Utilizou	Não consta.
FP40*			
FP41	Penicilina cristalina	Penicilina	Sulfato de magnésio, Nifedipino e Betametasona.
FP42	Cefalexina e Penicilina cristalina	Cefalexina	Progesterona, Betametasona, Nifedipino, Sulfato de magnésio e Sulfato ferroso.
FP43	Não Utilizou	ATB pós cesárea não especificado no PM	Suplemento Materna, Ômega 3, Insulina NPH e Sulfato ferroso.
FP44	Antibióticoprofilaxia não especificada no PM	Clindamicina, Gentamicina e Metronidazol	Dipirona, Paracetamol, Sulfato de magnésio, Betametasona e Ocitocina.

Legenda: FP: código identificador das amostras de fezes. PM: Prontuário médico. ATB: Antibiótico. RN: Recém-nascido. *Gêmeos, mesma mãe.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO 3 – Infecções (mães)

Tabela de Infecções, Gestoses e demais comorbidades apresentadas pelas mães

Código do RN	Infecção na gestação	Infecção pós parto	Gestoses e demais comorbidades
FP01	Covid+	Urocultura com <i>Enterococcus faecalis</i>	Eclâmpsia com picos hipertensivos
FP02	Covid+ e ITU	Covid+	Hipotireodismo na gestação e Hemorragia pós-parto
FP03	Não consta	Não consta	Não consta
FP04	Não consta	Não consta	Não consta
FP05	Covid+ e ITU	Não consta	Não consta
FP06	ITU	Não consta	Pré-eclâmpsia grave com pico pressórico e tabagismo
FP07	Não consta	Não consta	HAS crônica com pré-eclâmpsia sobreposta fazendo picos hipertensivos
FP08	Não consta	Não consta	Não consta
FP09	Não consta	Não consta	DMG com dieta
FP10	Sífilis e Covid+ tratados no início e meados da gestação	Não consta	Não consta
FP11	Não consta	Não consta	HAS gestacional
FP13	Não consta	ITU	HAS crônica com pré-eclâmpsia sobreposta
FP15	Não consta	Não consta	Pré-eclâmpsia grave com picos hipertensivos
FP18	Não consta	Não consta	Tabagismo
FP19*	Sífilis tratada na gestação	Não consta	DMG
FP20*			
FP21	Não consta	Não consta	Asma, histórico de lama biliar, hiperêmese gravídica e puerpério patológico por fígado gorduroso da gestação
FP22	ITU por <i>S. coagulase</i> negativo tratada durante gestação e ITU pré-parto	Não consta	Não consta
FP23*	Não consta	Não consta	Pré-eclâmpsia grave e diarreia com hipocalemia
FP24*			
FP25	Vaginose bacterina, ureaplasma +, corioaminionite e colônias de <i>Gardnerella</i> sp.	Vaginose bacterina, ureaplasma +, corioaminionite e colônias de <i>Gardnerella</i> sp.	Tabagismo
FP26	Não consta	Não consta	HAS gestacional com picos pressóricos e histórico de pré-eclâmpsia grave
FP27	Não consta	Não consta	Tenesmo evacuatório, necessitou fazer a retirada de fecaloma
FP28	Não consta	Não consta	Pré-eclâmpsia com picos hipertensivos
FP29	Vaginose bacteriana	Não consta	Hipotireoidismo, obesidade e DMG

FP31	ITU persistente e Sífilis gestacional sem tratamento	ITU e Sífilis	Ascite de ambos os fetos devido caso de sífilis
FP32	ITU	Não consta	Não consta
FP33	Não consta	ITU e Leucocitúria	DMG e hipotireoidismo
FP34	Não consta	Não consta	DMG
FP35	Não consta	Não consta	Não consta
FP36	Não consta	Não consta	Insuficiência ístmocervical e Transtorno de Personalidade Borderline
FP37	Não consta	Covid+	DMG, esteatose hepática e hemangioma hepático
FP38	Não consta	Não consta	DMG com dieta, útero bicorno e HAS crônica
FP39*	Não consta	Não consta	Asma
FP40*	Não consta	Não consta	Asma
FP41	Não consta	Não consta	Não consta
FP42	ITU	Não consta	DMG com dieta e Colo de útero curto
FP43	Não consta	Não consta	DMG
FP44	Corioamnionite	Corioamnionite	Anemia

Legenda: FP: código identificador das amostras de fezes. HAS: Hipertensão arterial sistêmica. DMG: Diabetes mellitus gestacional. ITU: Infecção do trato urinário. RN: Recém-nascido. *Gêmeos, mesma mãe.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO 4 – Antibióticos (RNs)

Tabela de Antibióticos e demais medicamentos utilizados pelos RNs

Código do RN	Uso de ATB*	Demais Medicamentos*
FP01	Não utilizou	Cafeína, Adtil e Polivitamínico Growvit
FP02	Ampicilina, Gentamicina, Oxacilina, Amicacina e Cefepime	Surfactante, Óxido nítrico, Cafeína, Dopamina, Noradrenalina, Fentanil e Furosemida
FP03	Não utilizou	Surfactante, Cafeína e Paracetamol
FP04	Ampicilina, Gentamicina, Oxacilina, Amicacina e Fluconazol	Surfactante, Paracetamol e Cafeína
FP05	Não utilizou	Surfactante
FP06	Não utilizou	Cafeína
FP07	Não utilizou	Cafeína, Surfactante, Adrenalina IT, Kanakion, Palivizumabe
FP08	Ampicilina e Gentamicina	Cafeína, Polivitamínico Growvit, Ad-til
FP09	Ampicilina e Gentamicina	Surfactante e Cafeína
FP10	Não utilizou	Polivitamínico Growvit, Surfactante, Paracetamol e Dipirona
FP11	Amicacina e Oxacilina	Cafeína, Vitamina K e Polivitamínico Growvit
FP13	Não utilizou	Cafeína, Surfactante, Vitamina K, Fentanil, Furosemida e Adrenalina
FP15	Não utilizou	Cafeína, Polivitamínico Growvit, Furosemida, Surfactante e Palivizumabe
FP18	Ampicilina e Gentamicina	Surfactante e Polivitamínico Growvit
FP19	Ampicilina e Gentamicina	Polivitamínico Growvit
FP20	Ampicilina e Gentamicina	Polivitamínico Growvit
FP21	Oxacilina e Amicacina	Surfactante, Cafeína e Polivitamínico Growvit
FP22	Não utilizou	Polivitamínico Growvit
FP23	Não utilizou	Surfactante, Cafeína, Nistatina tópica e Polivitamínico Growvit
FP24	Não utilizou	Surfactante, Cafeína, Cetrilan creme, Nistatina tópica e Polivitamínico Growvit
FP25	Ampicilina e Gentamicina	Cafeína e Polivitamínico Growvit
FP26	Oxacilina	Surfactante e Cafeína
FP27	Ampicilina e Gentamicina	Polivitamínico Growvit
FP28	Oxacilina, Amicacina e Metronidazol	Cafeína
FP29	Ampicilina e Gentamicina	Surfactante, Cafeína e Fentanil
FP31	Penicilina cristalina e Gentamicina	Surfactante, Cafeína e Polivitamínico Growvit
FP32	Ampicilina e Gentamicina	Cafeína
FP33	Ampicilina e Gentamicina	Cafeína e Polivitamínico Growvit
FP34	Não utilizou	Cafeína e Polivitamínico Growvit
FP35	Ampicilina e Gentamicina	Cafeína e Polivitamínico Growvit

FP36	Ampicilina e Gentamicina	Surfactante, Cafeína e Polivitamínico Growvit
FP37	Não utilizou	Surfactante e Cafeína
FP38	Ampicilina e Gentamicina	Cafeína e Polivitamínico Growvit
FP39	Ampicilina, Gentamicina, Oxacilina e Amicacina	Surfactante, Cafeína, Nistatina tópica e Polivitamínico Growvit
FP40	Ampicilina, Gentamicina, Oxacilina e Amicacina	Surfactante, Paracetamol, Fentanil e Cafeína
FP41	Ampicilina e Gentamicina	Surfactante, Cafeína e Polivitamínico Growvit
FP42	Ampicilina e Gentamicina	Cafeína e Polivitamínico Growvit
FP43	Ampicilina e Gentamicina	Surfactante, Cafeína, Furosemida e Polivitamínico Growvit
FP44	Ampicilina e Gentamicina	Surfactante, Cafeína e Nistatina tópica

Legenda: FP: código identificador das amostras de fezes. ATB: Antibiótico. RN: Recém-nascido. *Considerado apenas o que foi consumido até o dia de coleta da amostra.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO 5 – Uso do FM

Tabela do tempo que cada RN fez uso do FM durante o período avaliado

Código do RN	Nº de dias que utilizou FM85®*
FP01	4
FP03	3
FP04	1
FP07	2
FP08	4
FP10	6
FP11	2
FP13	5
FP15	7
FP18	5
FP19	6
FP20	4
FP21	7
FP23	6
FP24	3
FP25	3
FP27	6
FP33	4
FP34	13
FP35	4
FP36	5
FP37	9
FP38	3
FP39	6
FP41	4
FP42	5
FP43	10
FP44	3

Legenda: FP: código identificador das amostras de fezes. FM: Fortificante do leite materno. RN: Recém-nascido
*Contabilizado até o dia de coleta da amostra.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO 6 – Culturas positivas (RNs)

Tabela de culturas positivas para cada RN de acordo com o tempo de coleta

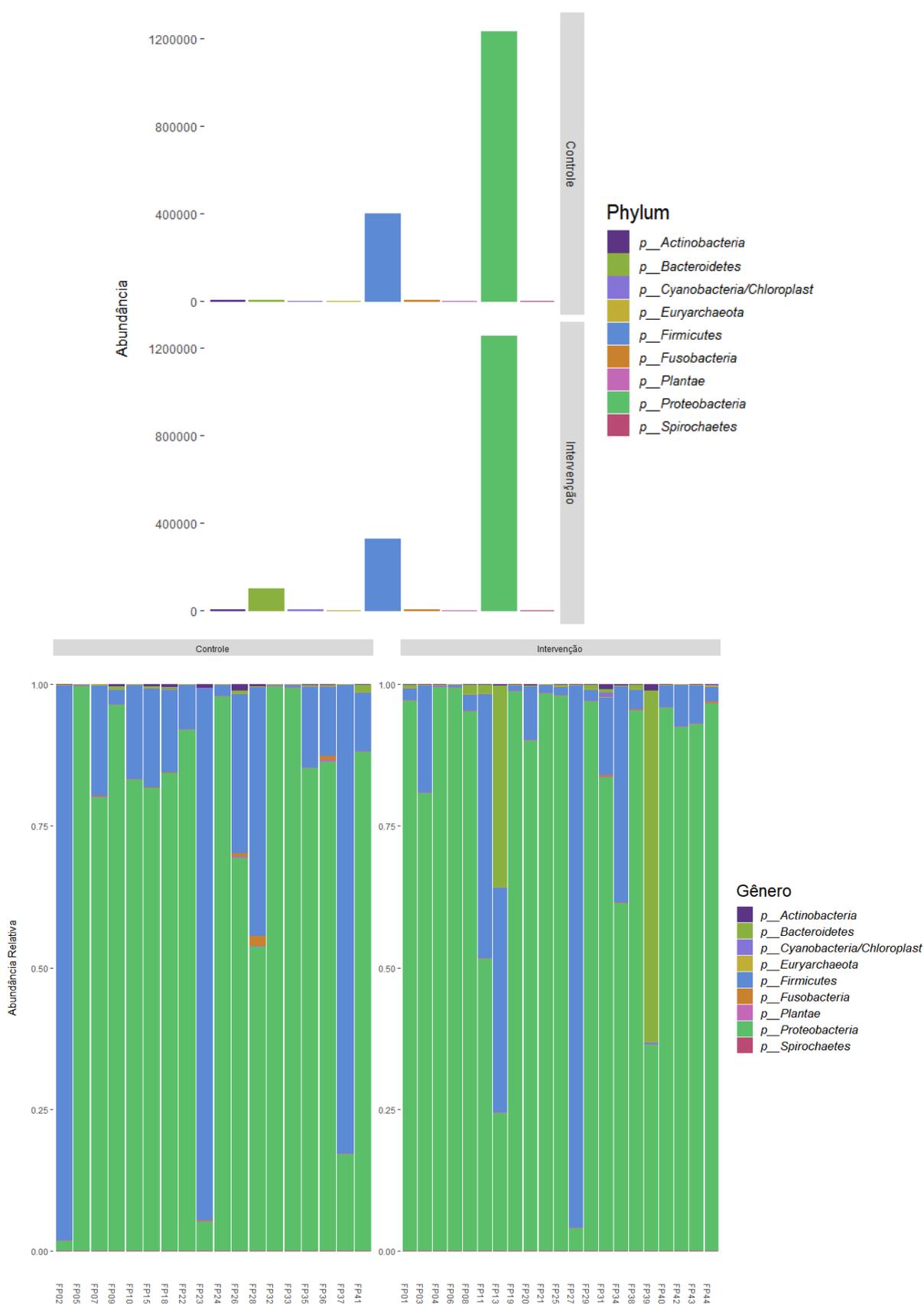
Código do RN	Culturas coletadas antes*	Culturas coletadas depois*	Infecção
FP01	Não coletou	Não coletou	Não
FP02	Hemocultura: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; Urocultura: negativo; LCR: negativo	Não coletou	Sim
FP03	Não coletou	Hemocultura: negativa; Urocultura: negativa; LCR: negativa	Não
FP04	Cultura para germes de secreção cervical: <i>Staphylococcus epidermidis</i> muitas colônias / <i>K. pneumoniae</i> raras colônias apenas resistentes a ampicilina; Cultura para germes de secreção perineal: <i>S. epidermidis</i> muitas colônias	Hemocultura: <i>S. epidermidis</i> ; Swab perianal e anorretal: <i>Candida Albicans</i> ; Swab oral: <i>C. albicans</i> .	Sim
FP05	Hemocultura: negativa	Hemocultura: negativa	Não
FP06	Secreção ocular: <i>K. pneumoniae</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> sensível à Tobramicina	Não coletou	Sim
FP07	Secreção ocular: <i>S. epidermidis</i> - raras colônias	Não coletou	Sim
FP08	Hemoculturas: negativas; Secreção ocular: negativa	Secreção ocular: negativa	Não
FP09	Não coletou	Secreção ocular: <i>Acinetobacter baumannii</i> complex	Não
FP10	Não coletou	Secreção ocular: <i>K. pneumoniae</i>	Não
FP11	Não coletou	Hemocultura: negativa	Não
FP13	Não coletou	Hemocultura: negativa; Cultura de urina: negativa	Não
FP15	Não coletou	Não coletou	Não
FP18	Secreção ocular: <i>K. pneumoniae</i> ; Hemocultura: negativa	Hemocultura: negativa; Urocultura: negativa	Sim
FP19	Não coletou	Não coletou	Não
FP20	Não coletou	Coprocultura: negativa	Não
FP21	Hemocultura: negativa; LCR: normal	Não coletou	Não
FP22	Não coletou	Não coletou	Não
FP23	Swab oral e anal: negativa	Urocultura: negativa	Não
FP24	Não coletou	Não coletou	Não
FP25	Hemocultura: negativa	Urocultura: negativa	Não
FP26	1ª Hemocultura: <i>S. epidermidis</i> ; 2ª Hemocultura: negativa	Não coletou	Sim
FP27	Hemocultura: negativa	Não coletou	Não
FP28	Hemocultura: positiva (não especificado)	Não coletou	Sim
FP29	Hemocultura: <i>Candida parapsilosis</i> ; Secreção	Hemocultura: <i>S. aureus</i> ; Urocultura:	Sim

	ocular: negativa	negativa; LCR: <i>Staphylococcus capitis</i>	
FP31	Hemocultura: negativa	Hemocultura: <i>S. capitis</i> ; LCR: negativa	Não
FP32	Hemocultura: negativa	Não coletou	Não
FP33	Hemocultura: negativa; LCR: negativa	Não coletou	Não
FP34	Não coletou	Não coletou	Não
FP35	Hemocultura: negativa	Não coletou	Não
FP36	Hemocultura: negativa	Secreção ocular: <i>S. aureus</i>	Não
FP37	Não coletou	Não coletou	Não
FP38	Hemocultura: negativa; Urocultura: negativa; LCR: negativa	Secreção ocular: <i>Klebsiella</i> sp.	Não
FP39	Hemocultura: negativa; Urocultura: negativa; LCR: negativa	Depois: Swab perineal: <i>C. albicans</i> e <i>K. pneumoniae</i> multirresistente; Swab oral: pseudohifas + leveduras; Swab perineal: leveduras	Não
FP40	Hemocultura: <i>K. pneumoniae</i> , multiresistente; LCR: Negativa	Hemocultura: <i>K. pneumoniae</i> ; Hemocultura: <i>C. albicans</i> ; Urocultura: <i>Enterobacter cloacae</i> ; Swab perineal: <i>K. pneumoniae</i> - muitas colônias; Swab oral: <i>K. pneumoniae</i> - raras colônias. <i>C. albicans</i> - muitas colônias	Sim
FP41	Hemocultura: negativa	Swab mucosa oral: <i>Klebsiella oxytoca</i> multissensível; swab perineal: <i>K. pneumoniae</i> e <i>K. oxytoca</i>	Não
FP42	Não coletou	Não coletou	Não
FP43	Hemocultura: negativa	Não coletou	Não
FP44	Hemocultura: negativa	Swab oral: <i>S. aureus</i> (MRSA); Swab nasal: <i>S. aureus</i> (MRSA)	Não

Legenda: FP: código identificador das amostras de fezes. LCR: líquido cefalorraquidiano. MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. RN: Recém-nascido. *Antes e depois são referentes ao dia de coleta da amostra de fezes pra este estudo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO 7 – Abundância de Filos



ANEXO 8 – DIVERSIDADE para Peso ao Nascer

Resultados dos testes de alfa e beta diversidade da microbiota dos RNs de acordo com categoria de peso ao nascer.

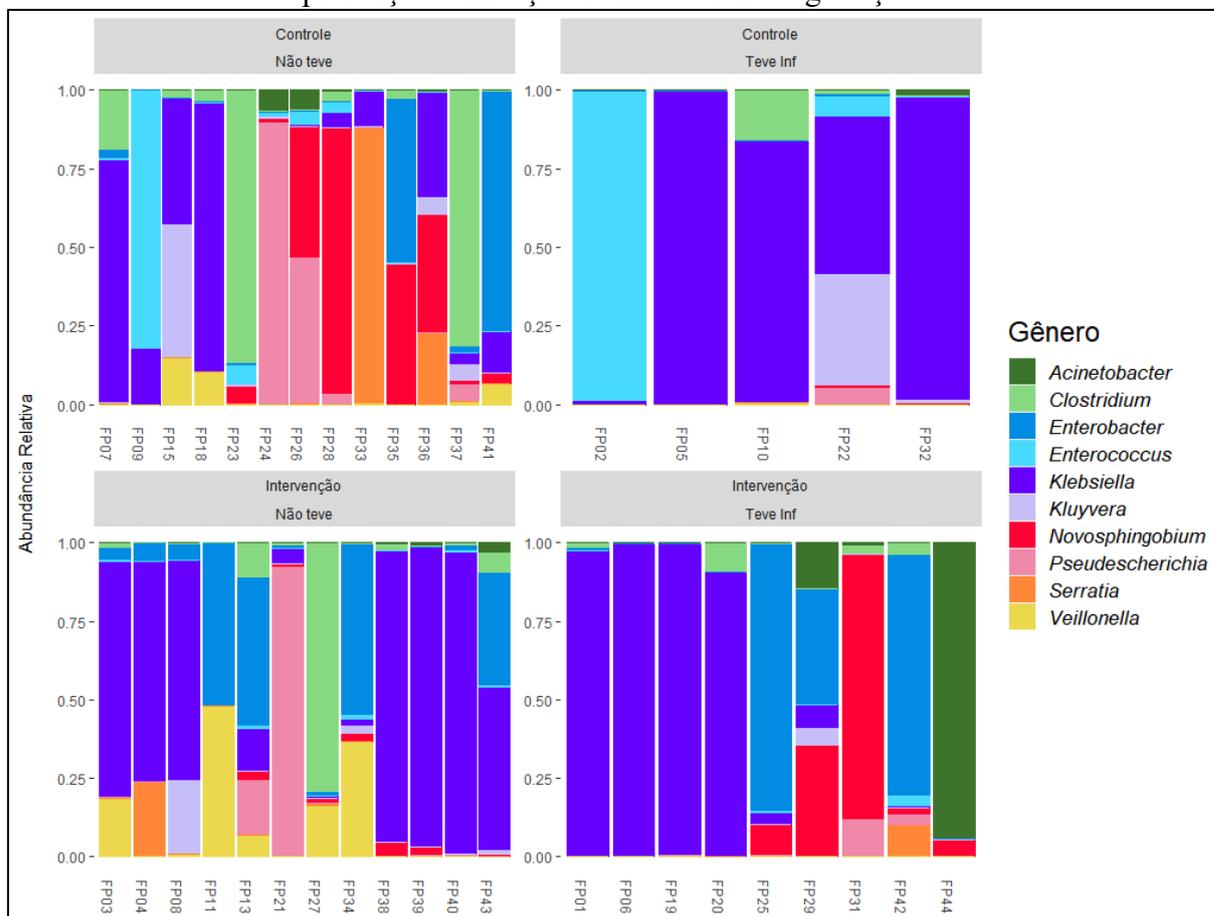
Testes de alfa diversidade	
<i>Observed - Teste de Dunn</i>	
BPN-EBPN	p=0,139
BPN-MBPN	p=0,165
EBPN-MBPN	p=0,765
<i>Shannon - ANOVA / Teste de Tukey</i>	
BPN-EBPN	p=0,690
BPN-MBPN	p=0,131
EBPN-MBPN	p=0,695
<i>Simpson - Teste de Dunn</i>	
BPN-EBPN	p=0,380
BPN-MBPN	*p=0,021
EBPN-MBPN	p=0,302
<i>InvSimpson - ANOVA / Teste de Tukey</i>	
BPN-EBPN	p=0,632
BPN-MBPN	*p=0,027
EBPN-MBPN	p=0,395
Teste de beta diversidade	
<i>Teste de Tukey (post hoc)</i>	
BPN-EBPN	p=0,953
BPN-MBPN	p=0,618
EBPN-MBPN	p=0,550

Legenda: BPN: Baixo peso ao nascer; MBPN: muito baixo peso ao nascer; EBPN: extremo baixo peso ao nascer; *Resultados significativos ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO 9 – Abundância segundo infecção gestacional

Abundância relativa dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a presença de infecção na mãe durante a gestação.

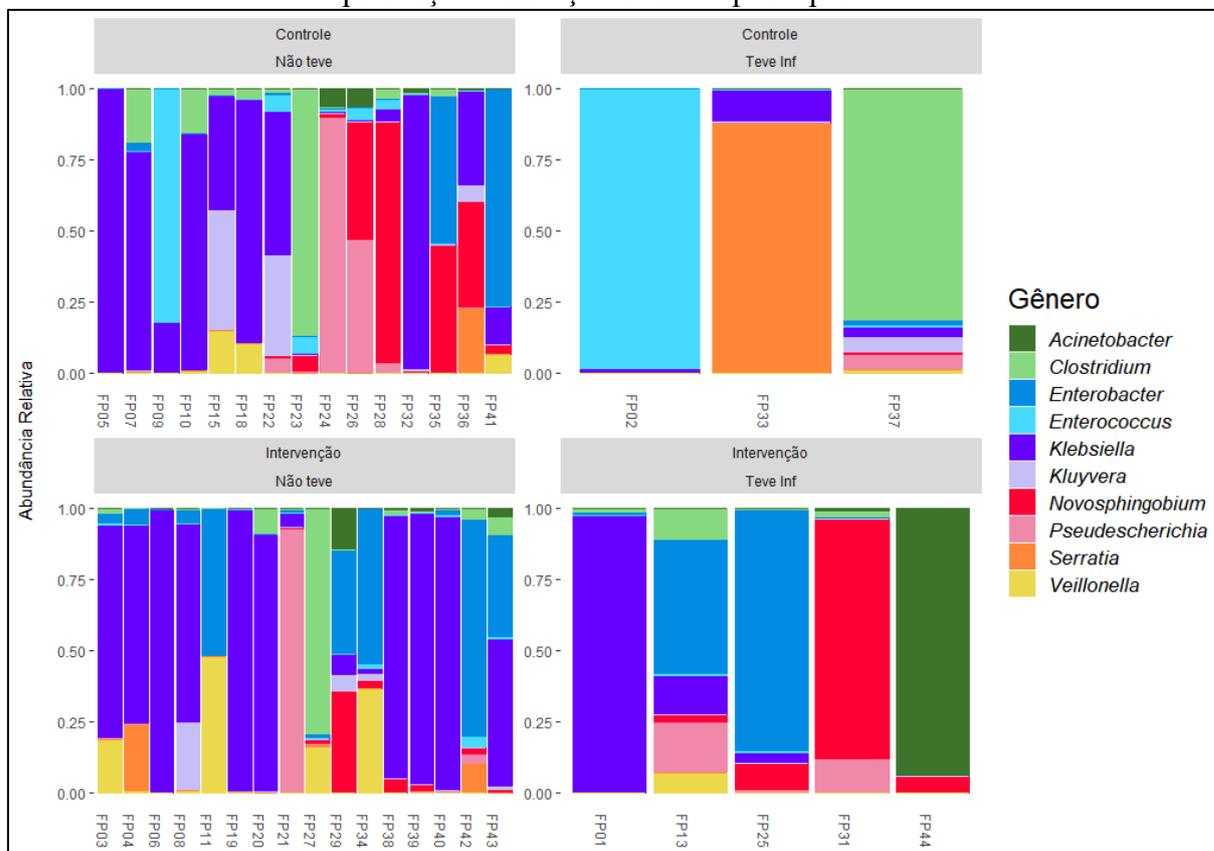


Legenda: FP: código identificador das amostras de fezes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO 10 – Abundância segundo infecção no pós parto

Abundância relativa dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com a presença de infecção na mãe após o parto.

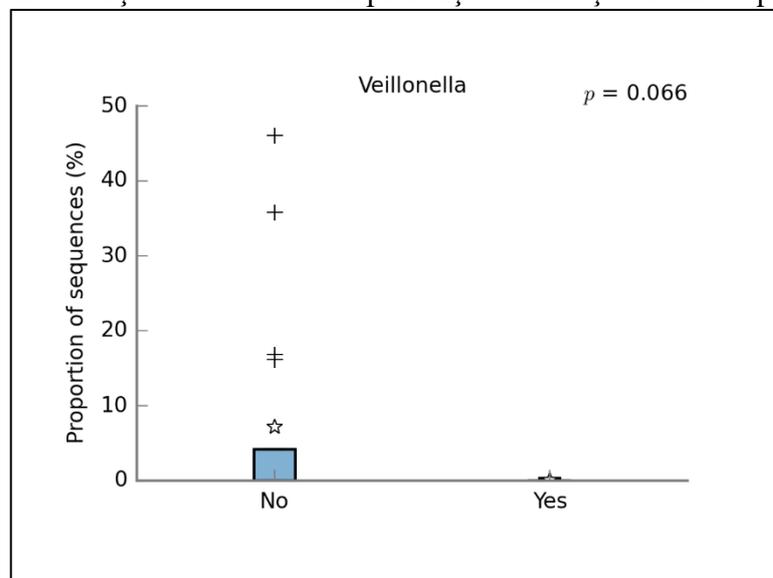


Legenda: FP: código identificador das amostras de fezes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO 11 – Proporção de sequências de *Veillonella* sp.

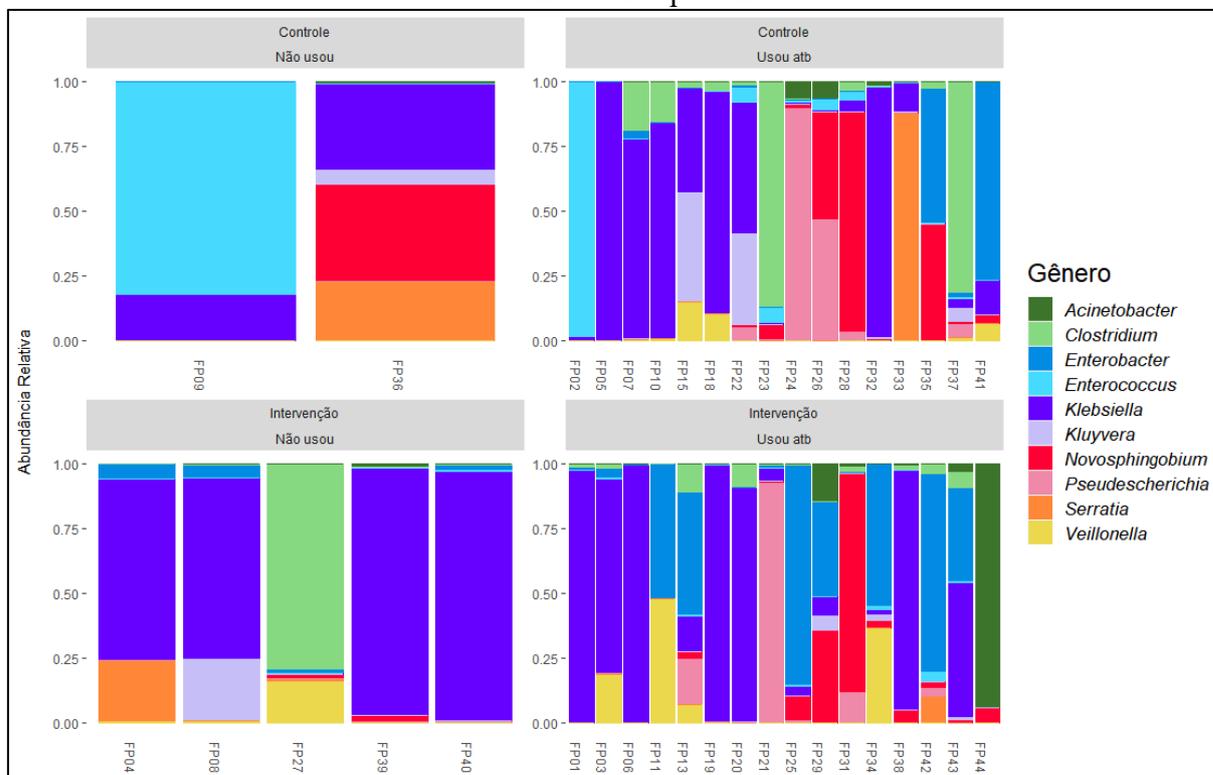
Proporção de sequências identificadas como *Veillonella* sp. na microbiota intestinal de RNs do grupo intervenção de acordo com presença de infecção na mãe após o parto.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO 12 – Abundância segundo uso de ATB pelas mães

Abundância relativa dos dez gêneros predominantes da microbiota dos RNs de acordo com o uso de antibiótico pela mãe.



Legenda: FP: código identificação das amostras de fezes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).