

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

GABRIELE LUIZA CAPRARA

**ANÁLISE DA TRANSFERÊNCIA DA MICROBIOTA MATERNA PARA O RECÉM-
NASCIDO**

Porto Alegre

2023

GABRIELE LUIZA CAPRARA

**ANÁLISE DA TRANSFERÊNCIA DA MICROBIOTA MATERNA PARA O RECÉM-
NASCIDO**

A apresentação desta tese é requisito parcial para título de doutor do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Professor Marcelo Zubaran Goldani

Coorientadora: Professora Juliana R. Bernardi

Porto Alegre

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Caprara, Gabriele Luiza
ANÁLISE DA TRANSFERÊNCIA DA MICROBIOTA MATERNA PARA
O RECÉM-NASCIDO / Gabriele Luiza Caprara. -- 2023.
86 f.
Orientador: Marcelo Zubarán Goldani.

Coorientador: Juliana Rombaldi Bernardi.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Microbiota intestinal. 2. Recém-Nascido. 3. Gravidez. 4. Microbiota. I. Zubarán Goldani, Marcelo, orient. II. Rombaldi Bernardi, Juliana, coorient. III. Título.

GABRIELE LUIZA CAPRARA

ANÁLISE DA TRANSFERÊNCIA DA MICROBIOTA MATERNA PARA O RECÉM-NASCIDO

A apresentação desta tese é requisito parcial para título de doutor do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Professor Marcelo Zubaran Goldani

Coorientadora: Professora Juliana R. Bernardi

Porto Alegre, 15 de março de 2023

BANCA EXAMINADORA:

Professora Dra. Helena Ayako Sueno Goldani
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Professora Dra. Letícia Souza Muza
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Professora Dra. Juliana Paludo Vallandro
Ânima Educação

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Zubaran Goldani e à minha coorientadora Prof^a. Dra. Juliana Rombaldi Bernardi pela oportunidade, confiança, orientação e por todo conhecimento compartilhado.

Ao meu marido Péricles (obrigada por ser meu porto seguro) e aos meus pais, Bernardete e Vanius, pelo amor, incentivo, por sempre estarem ao meu lado e acreditarem em mim.

À minha filha Júlia, que nasceu durante o doutorado, e minha filha canina Madalena, adotada no início desta caminhada, que são minhas fontes de energia e de amor.

À Professora Dra. Andreza Martins pela disponibilidade da análise das amostras.

Ao Otávio Lovison pela análise das amostras e estatística, por toda ajuda e paciência durante o desenvolvimento da tese.

À Ciliana Rechenmacher por toda ajuda durante o doutorado.

A toda equipe do Centro Obstétrico do Hospital Tacchini que vibrava comigo a cada participante que aceitava participar da pesquisa, e a toda equipe da Unidade de Internação da Maternidade e Pediatria (posto 4).

Ao Hospital Tacchini e ao Instituto Tacchini de Pesquisa em Saúde.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro por meio da bolsa de doutorado.

Às famílias que aceitaram participar da pesquisa.

RESUMO

Introdução: Cerca de 50% das espécies microbianas do intestino do recém-nascido se assemelham com a microbiota materna, indicando uma possível transmissão vertical. O tipo de parto, a amamentação, a composição da microbiota materna, o estado nutricional materno e fatores ambientais têm demonstrado relação com o microbioma intestinal do recém-nascido após o nascimento. **Objetivos:** Investigar a transferência da microbiota intestinal materna para o recém-nascido, determinando a composição das microbiotas do intestino materno e do recém-nascido e verificando fatores que possam influenciar essa microbiota. **Métodos:** Estudo transversal que avaliou gestantes a partir de 37 semanas de idade gestacional e seus filhos recém-nascidos. Coletou-se amostra biológica da mucosa anal da gestante antes do parto e do recém-nascido, entre 24 a 48h após o parto, quando ocorreu a impossibilidade de coletar amostra de fezes. Foi aplicado um questionário geral de coleta de dados socioeconômicos, demográficos e estilo de vida durante a gestação. Dados do pré-natal foram coletados na carteira da gestante e dados relacionados ao parto e recém-nascido foram coletados no prontuário médico e caderneta de saúde do bebê. O microbioma das amostras foi realizado através do sequenciamento das regiões hipervariáveis v3-v4 do gene 16S. As análises de alfa diversidade foram realizadas utilizando as métricas de *Observed Richness* e índice de diversidade de Shannon. Para beta diversidade foram realizadas análises de coordenadas principais utilizando Weighted Unifrac. Para abundância diferencial, utilizou-se um Negative Binomial Wald Test. A análise de transferência de microbiota foi correlacionada com a via de parto e para determinar a probabilidade da microbiota ser transferida da mãe para o recém-nascido, utilizou-se um teste exato de Fisher e Odds Ratio. Uma Weighted Transfer Ratio foi utilizada como medida generalizada de transferência. Antes da coleta de dados as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e foram garantidas a privacidade quanto a identificação das participantes e seus filhos e a confidencialidade dos dados obtidos. As variáveis utilizadas nesta pesquisa foram: estado nutricional pré-gestacional (adequado, sobrepeso/obesidade); tipo de parto (vaginal, cesárea) e peso de nascimento do bebê classificado pela idade gestacional (pequeno, adequado ou grande). **Resultados:** Obtivemos uma amostra de 30 duplas mãe-recém-nascidos. A composição da microbiota intestinal nas díades foi caracterizada principalmente por Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes. Na análise da transferência correlacionada pela via de parto, obtivemos Variantes de Sequenciamento de Amplicon significativas ($p < 0,05$) e a relação entre abundância relativa materna e transferência da microbiota se mostrou inversamente proporcional. O índice de massa corporal materno pré-gestacional, o tipo de parto e o peso de nascimento do recém-nascido de acordo com a idade gestacional apresentaram influência no microbioma dos neonatos. **Conclusões:** Em nossa amostra, ocorreu a transferência da microbiota materna para o recém-nascido e as variáveis estudadas (índice de massa corporal materno pré-gestacional, tipo de parto e peso de nascimento pela idade gestacional) apresentaram influência no microbioma dos neonatos.

Palavras-chave: Microbiota intestinal. Recém-Nascido. Gravidez. Microbiota.

ABSTRACT

Introduction: About 50% of the microbial species of the newborn's intestine are similar to the maternal microbiota, indicating a possible vertical transmission. The type of delivery, breastfeeding, composition of the maternal microbiota, maternal nutritional status and environmental factors have been shown to be related to the intestinal microbiome of the newborn after birth. **Objectives:** To investigate the transfer of maternal intestinal microbiota to the newborn, determining the composition of the maternal and newborn intestinal microbiota and verifying factors that may influence this microbiota. **Methods:** Cross-sectional study that evaluated pregnant women from 37 weeks of gestational age and their newborn children. Biological samples were collected from the anal mucosa of the pregnant woman before delivery and from the newborn, between 24 and 48 hours after delivery, when it was impossible to collect a stool sample. A general questionnaire was applied to collect socioeconomic, demographic and lifestyle data during pregnancy. Prenatal data were collected from the pregnant woman's card and data related to childbirth and the newborn were collected from the baby's medical records and health booklet. The microbiome of the samples was performed by sequencing the hypervariable regions v3-v4 of the 16S gene. Alpha diversity analyzes were performed using Observed Richness metrics and Shannon's diversity index. For beta diversity, principal coordinate analyzes were performed using Weighted Unifrac. For differential abundance, a Negative Binomial Wald Test was used. The microbiota transfer analysis was correlated with the mode of delivery and to determine the probability of the microbiota being transferred from the mother to the newborn, we used Fisher's exact test and evaluated the Odds Ratio. A Weighted Transfer Ratio was used as a generalized measure of transfer. Before data collection, the participants signed the Informed Consent Form and were guaranteed privacy regarding the identification of the participants and their children and the confidentiality of the data obtained. The variables used in this research were: pre-pregnancy nutritional status (adequate, overweight/obesity); type of delivery (vaginal, cesarean) and birth weight of the baby classified by gestational age (small, adequate or big). **Results:** We obtained a sample of 30 mother-infant pairs. The composition of the intestinal microbiota in the dyads was mainly characterized by Bacteroidetes, Actinobacteria and Firmicutes. In the analysis of transfer correlated by mode of delivery, we obtained significant Amplicon Sequencing Variants ($p < 0,05$) and the relationship between maternal relative abundance and microbiota transfer was inversely proportional. The pre-gestational maternal body mass index, the type of delivery and the baby's birth weight according to gestational age influenced the babies' microbiome. **Conclusions:** In our sample, occurred the transfer of maternal microbiota to the newborn and the variables studied (pre-gestational maternal body mass index, type of delivery and birth weight by gestational age) had an influence on the microbiome of infants.

Keywords: Gastrointestinal Microbiome. Newborn. Pregnancy. Microbiota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Microbiomas das mães e recém-nascidos.....	37
Figura 2 – Abundância relativa (%) dos microbiomas aglomerados em nível de filo de cada díade.....	38
Figura 3 – As probabilidades de transferência entre mãe e filho para via de parto cesárea.....	43
Figura 4 – As probabilidades de transferência entre mãe e filho para partos vaginais.....	44
Figura 5 – Razão de transferência ponderada em função do tipo de parto.....	45
Figura 6 – Razão de transferência ponderada relacionada com a via de parto.....	46
Figura 7 - Microbioma dos recém-nascidos relacionado ao IMC materno pré-gestacional.....	49
Figura 8 – Abundância diferencial em amostras de recém-nascidos – IMC materno pré-gestacional – Sobrepeso/Obesidade x IMC adequado.....	50
Figura 9 – Microbioma dos recém-nascidos relacionado ao tipo de parto.....	51
Figura 10 - Abundância diferencial em amostras de recém-nascidos – Tipo de parto – Cesárea x Parto vaginal.....	52
Figura 11 – Microbioma dos recém-nascidos relacionado ao peso de nascimento avaliado pela idade gestacional.....	53
Figura 12 - Abundância diferencial em amostras de recém-nascidos – Peso de nascimento pela idade gestacional – PIG x AIG.....	54
Figura 13 - Abundância diferencial em amostras de recém-nascidos – Peso de nascimento pela idade gestacional – GIG x AIG.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação do estado nutricional da gestante segundo Índice de Massa Corporal por semana gestacional.....	26
Tabela 2 – Recomendação de ganho total de peso durante a gestação pelo Índice de Massa Corporal pré-gestacional.....	27
Tabela 3 - Características gerais das díades.....	34
Tabela 4 – Frequência do consumo de alimentos na gestação conforme grupo alimentar.....	35
Tabela 5 - Abundância relativa (%) de acordo com filo em amostras dos recém-nascidos.....	36
Tabela 6 - Abundância relativa (%) de acordo com filo em amostras maternas.....	37
Tabela 7 - Modelos de transferência que foram significativos.....	41
Tabela 8 - Número de Variantes de Sequenciamento de Amplicon para cada divisão taxonômica em nível de Ordem.....	42
Tabela 9 - Inferência para a relação entre chances de transferências e abundância materna da população.....	42
Tabela 10 - Razão de transferência ponderada em função do tipo de parto.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AIG	Recém-nascido adequado para a idade gestacional
ASV	Variante de Sequenciamento de Amplicon
BH	Benjamini-Hochberg
FDR	False Discovery Rate
GIG	Recém-nascido grande para a idade gestacional
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IMC	Índice de Massa Corporal
IOM	Institute of Medicine
IPAQ	Questionário Internacional de Atividade Física
MS	Ministério da Saúde
OR	Odds Ratio
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
PCoA	Análises de coordenadas principais
PIG	Recém-nascido pequeno para a idade gestacional
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
rRNA	RNA ribossômico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
WTR	Weighted Transfer Ratio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 MICROBIOTA.....	13
2.2 COLONIZAÇÃO DA MICROBIOTA.....	14
2.3 MICROBIOTA E GESTAÇÃO.....	15
2.4 MICROBIOTA E NASCIMENTO.....	17
2.5 ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA.....	19
3 JUSTIFICATIVA.....	21
4 OBJETIVOS.....	22
4.1 GERAL.....	22
4.2 ESPECÍFICOS.....	22
5 METODOLOGIA.....	23
5.1 DELINEAMENTO.....	23
5.2 LOCAL OU CENÁRIO.....	23
5.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	23
5.3.1 Desenho amostral.....	23
5.3.2 Cálculo do tamanho da amostra.....	23
5.3.3 Critérios de inclusão.....	23
5.3.4 Critérios de exclusão.....	24
5.4 COLETA DE DADOS.....	24
5.4.1 Idade materna.....	25
5.4.2 Escolaridade materna.....	25
5.4.3 Renda familiar.....	25
5.4.4 Intervalo interpartal.....	26
5.4.5 Estado nutricional.....	26
5.4.6 Ganho de peso materno.....	26
5.4.7 Peso de nascimento.....	27
5.4.8 Tipo de aleitamento.....	27
5.4.9 Atividade física.....	28
5.4.10 Consumo alimentar.....	28
5.4.11 Classificação socioeconômica.....	28
5.5 VARIÁVEIS UTILIZADAS.....	28

5.6 ANÁLISE METAGENÔMICA.....	29
5.6.1 Extração de DNA.....	29
5.6.2 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	29
5.6.3 Pré-processamento do sequenciamento do gene 16S rRNA.....	30
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA E DE BIOINFORMÁTICA.....	30
5.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	32
6 RESULTADOS.....	33
6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS DÍADES.....	33
6.2 ANÁLISE COMPOSICIONAL DA MICROBIOTA MATERNA E DO RECÉM-NASCIDO.....	36
6.3 TRANSFERÊNCIA DA MICROBIOTA MATERNA PARA O RECÉM-NASCIDO.....	40
6.4 DINÂMICA DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DO RECÉM-NASCIDO.....	48
7 DISCUSSÃO.....	55
8 CONCLUSÕES.....	60
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	70
APÊNDICE B - Questionário pós-parto.....	73
ANEXO A - Questionário de atividade física na gestação	80
ANEXO B - Questionário de Frequência Alimentar.....	81

1 INTRODUÇÃO

O conjunto de micro-organismos que habitam o corpo humano é chamado de microbiota (TURNBAUGH *et al.*, 2007; UBEROS, 2020) e o intestino é o principal órgão de colonização destes micro-organismos (EVERARD & CANI, 2013; MUNYAKA *et al.*, 2014). A microbiota intestinal desenvolvida nos primeiros anos de vida é considerada fundamental para a saúde futura do hospedeiro (DIBAISE *et al.*, 2012; SCHEEPERS *et al.*, 2014; KOLEVA *et al.*, 2015). Estudos sugerem que o trato gastrointestinal do recém-nascido começa a ser colonizado antes do nascimento e que ao nascimento o bebê receba micro-organismos oriundos da mãe (FUNKHOUSER & BORDENSTEIN, 2013; NURIEL-OHAYON *et al.*, 2016).

Em torno de 50% das espécies microbianas do intestino do recém-nascido se assemelham com a microbiota materna (intestinal, vaginal, pele, oral), indicando uma possível transmissão vertical (O'NEILL *et al.*, 2020). Há uma relação bem estabelecida entre sobrepeso e obesidade materna com a microbiota do recém-nascido (MUELLER *et al.*, 2016; RASPINI *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2020), bem como o tipo de parto apresenta um papel importante na composição da microbiota intestinal do neonato (TSUKUMO *et al.*, 2015; SHAO *et al.*, 2018; RASPINI *et al.*, 2020). Recém-nascidos de cesárea podem apresentar um atraso de 30 dias na colonização intestinal com bactérias benéficas quando comparados a recém-nascidos de parto vaginal (TSUKUMO *et al.*, 2015).

Sendo assim, sabendo da relação da microbiota do início da vida com desfechos futuros na saúde de crianças e adultos, o presente estudo visa investigar a transferência da microbiota intestinal materna para o recém-nascido, determinando a composição das microbiotas do intestino materno e do recém-nascido e verificando fatores que possam influenciar essa microbiota.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MICROBIOTA

O corpo humano abriga uma vasta população de micro-organismos que constituem a microbiota e o conjunto de genes carregados por estes micro-organismos é denominado microbioma (TURNBAUGH *et al.*, 2007; UBEROS, 2020). Os estudos sobre a diversidade do microbioma humano iniciaram na década de 1680, quando Antonie Van Leewenhoek comparou sua microbiota oral e fecal. Ele observou diferenças marcantes nos micróbios entre estes dois locais e também entre amostras de indivíduos em estados de saúde e doença em ambos os habitats (URSELL *et al.*, 2012). A diversidade de micróbios dentro de um determinado habitat corporal pode ser definida como o número e a distribuição de abundância de diferentes tipos de organismos (HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). A diversidade pode ser classificada em alfa e beta, com alfa representando a diversidade de organismos dentro de cada local e beta descrevendo as diferenças na composição de espécies entre os indivíduos (HAMADY *et al.*, 2010; HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012; MORGAN & HUTTENHOWER, 2012; AMES *et al.*, 2017).

Para compreender a diversidade genética e fisiológica humana, o National Institute of Health, dos Estados Unidos, lançou em 2007 o Projeto Microbioma Humano, com o objetivo de caracterizar o microbioma e os fatores que influenciam a distribuição e a evolução dos microrganismos que o constituem, analisando a maior coorte e conjunto de habitats corporais distintos e clinicamente relevantes até hoje (TURNBAUGH *et al.*, 2007; HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). O intestino é o principal órgão de colonização e as bactérias intestinais desempenham papel importante na saúde humana através da promoção da homeostase intestinal, estimulando o desenvolvimento e maturação do sistema imune (EVERARD & CANI, 2013; MUNYAKA *et al.*, 2014), sendo que 98% dos genes identificados no intestino são bacterianos, tendo entre 1000 e 1150 espécies já descritas na literatura, com uma média de 160 espécies por pessoa (MUSSO *et al.*, 2010; MATAMOROS *et al.*, 2013; UBEROS, 2020). A classificação destes micro-organismos dá-se através de níveis taxonômicos, sendo os mais importantes nos estudos de microbioma intestinal a espécie, o gênero, a família e o filo. Nos

microbiomas intestinais saudáveis os filos bacterianos predominantes são Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria (ECKBURG *et al.*, 2005; TURNBAUGH *et al.*, 2007; CLEMENTE *et al.*, 2012; LANDMAN & QUÉVRAIN, 2016; LLOYD-PRICE *et al.*, 2016).

Em um hospedeiro saudável existe um equilíbrio entre os componentes da microbiota intestinal, de modo que os organismos patogênicos e não patogênicos possam ser encontrados em harmonia aparente (REID *et al.*, 2011), ou seja, a diversidade é considerada uma característica saudável (EVERARD & CANI, 2013; MUNYAKA *et al.*, 2014). O desequilíbrio na composição destes micro-organismos, frequentemente ocasionado por redução na biodiversidade e número de espécies de bactérias, é definido como disbiose (MILANI *et al.*, 2017). A disbiose também pode ser induzida por fatores externos, como consumo de antibióticos, dieta, estresse psicológico e físico, e é capaz de prejudicar o funcionamento normal da microbiota intestinal na manutenção do bem-estar do hospedeiro (KHO & LAL, 2018), causando diversos problemas de saúde, como doença inflamatória intestinal, alergias, obesidade, diabetes, doença autoimune e distúrbios cerebrais (MUNYAKA *et al.*, 2014; CARDING *et al.*, 2015; TANAKA & NAKAYAMA, 2017; KHO & LAL, 2018).

A microbiota intestinal desenvolvida na primeira infância é considerada um eixo principal para a saúde e estudos sugerem que a composição desta microbiota inicial predispõe ao subsequente desenvolvimento de sobrepeso e obesidade em idade tardia (DIBAISE *et al.*, 2012; SCHEEPERS *et al.*, 2014; KOLEVA *et al.*, 2015). O tempo para que o intestino infantil se assemelhe ao padrão de colonização do intestino adulto, quando existe uma assinatura única de bactérias dentro do intestino, representando o microbioma maduro, é de quase três anos (MILANI *et al.*, 2017; WALKER, 2017; PRESCOTT *et al.*, 2021).

2.2 COLONIZAÇÃO DA MICROBIOTA

Estudos sugerem que o trato gastrointestinal do recém-nascido começa a ser colonizado mesmo antes do nascimento e que durante o parto e a amamentação o recém-nascido receba micróbios oriundos da mãe (FUNKHOUSER & BORDENSTEIN, 2013; NURIEL-OHAYON *et al.*, 2016). Em uma revisão realizada em 2018, os autores apresentaram evidências abrangentes da mudança de paradigma do útero estéril para a hipótese da colonização *in útero* (CHONG *et al.*,

2018). Em 2014, Ardissonne e colaboradores forneceram evidências para apoiar essa hipótese, concluindo que o microbioma intestinal fetal derivado do líquido amniótico deglutido pode estar envolvido no mecanismo do nascimento prematuro (ARDISSONE *et al.*, 2014).

Há evidências que, sob condições gestacionais normais, as bactérias do intestino materno passam para a corrente sanguínea da mãe e podem, por fim, residir na placenta ou atravessar a placenta e entrar no líquido amniótico (BOKULICH *et al.*, 2016; TANAKA & NAKAYAMA, 2017). Esses organismos, em número bem menor do que aqueles que habitam o intestino do recém-nascido, podem interagir com o intestino fetal quando o feto engole o líquido amniótico. Outra evidência para esta conclusão é que os organismos intestinais maternos foram identificados na placenta, líquido amniótico, mecônio e no cordão umbilical (WALKER, 2017; WALKER *et al.*, 2017).

Cerca de 50% das espécies microbianas do intestino do recém-nascido se assemelham com aquelas encontradas na microbiota intestinal, oral, vaginal ou da pele materna, indicando uma transmissão vertical de micróbios de mãe para filho (O'NEILL *et al.*, 2020). Um estudo realizado em 2013 encontrou associação entre a microbiota intestinal materna e do recém-nascido, para aqueles nascidos de parto vaginal, caracterizando a transferência bacteriana durante o parto (MAKINO *et al.*, 2013). Variáveis como o tipo de parto, a amamentação, a dieta materna, a composição da microbiota materna, o uso de antibióticos durante o parto, o estado nutricional materno e fatores ambientais tem demonstrado uma relação importante com o microbioma intestinal do recém-nascido após o nascimento (MILANI *et al.*, 2017; WALKER, 2017; O'NEILL *et al.*, 2020).

2.3 MICROBIOTA E GESTAÇÃO

A gestação saudável é caracterizada por alterações na composição da microbiota intestinal (COLLADO *et al.*, 2008; KOREN *et al.*, 2012). No primeiro trimestre, a composição da microbiota intestinal é semelhante à de mulheres saudáveis não grávidas, mas, no decorrer da gestação, ocorrem mudanças na composição e na estrutura filogenética. No terceiro trimestre, a diversidade beta aumenta e a diversidade alfa diminui, observando-se também um aumento de Proteobacteria e de Actinobacteria (KOREN *et al.*, 2012).

Há uma relação bem estabelecida entre sobrepeso e obesidade materna com a microbiota do recém-nascido. Um estudo realizado no Brasil mostrou que o IMC materno antes da gravidez afeta a composição da microbiota do neonato nascido de parto vaginal aos dois dias de vida, onde recém-nascidos de mães com sobrepeso ou obesas apresentaram maior abundância de *Bacteroides* em comparação com neonatos nascidos de mães com peso normal (MUELLER *et al.*, 2016). Da mesma forma, recém-nascidos de mães com sobrepeso ou obesidade antes da gravidez apresentaram maior abundância de *Streptococcus* quando comparados com neonatos de mães com peso normal antes da gravidez, avaliados 2 a 3 dias após o nascimento (RASPINI *et al.*, 2020). No estudo de Singh e colaboradores (2020), os pesquisadores observaram que o sobrepeso e a obesidade maternos, avaliados pelo IMC pré-gestacional, foram associados à composição alterada do microbioma intestinal infantil e maior diversidade entre os recém-nascidos de parto vaginal, mas no grupo de cesariana as associações não foram significativas (SINGH *et al.*, 2020).

O ganho de peso materno durante a gestação também tem efeito na microbiota do recém-nascido, onde filhos de mães com ganho de peso normal na gestação apresentaram concentração mais alta de *Bifidobacterium* quando comparados com filhos de mulheres com ganho de peso excessivo e, com um mês de idade, menores concentrações de *Bacteroides* foram associadas a maior ganho de peso materno durante a gestação (COLLADO *et al.*, 2010).

O microbioma das fezes neonatais ao nascer se agrupa de forma diferente em virtude da dieta gestacional materna. Uma dieta com alto teor de gordura durante o último mês de gestação foi associada a alterações específicas na microbiota intestinal de recém-nascido avaliados 24 a 48 horas após o nascimento, como a depleção de *Bacteroides*, e algumas dessas alterações persistiram até pelo menos seis semanas de vida (CHU *et al.*, 2016). No estudo de Lundgren e colaboradores (2018), os autores avaliaram a dieta materna entre 24 e 28 semanas de gestação, a microbiota infantil às seis semanas de vida e o tipo de parto, e observaram que nos lactentes nascidos de parto vaginal os níveis de *Bifidobacterium* diminuíram com o aumento do consumo materno de frutas, mas aumentaram com o maior consumo materno de carne vermelha nos lactentes nascidos via cesariana (LUNDGREN *et al.*, 2018). Em relação às bebidas adoçadas artificialmente, um estudo de 2021 mostrou que o consumo destas bebidas durante a gestação teve impacto no estabelecimento do microbioma intestinal de lactentes avaliados aos 3 e aos 12 meses de idade,

sugerindo que esses lactentes poderiam apresentar um risco maior de sofrer alterações no microbioma relacionados à predisposição para doenças metabólicas futuras (LAFOREST-LAPOINTE *et al.*, 2021).

Há evidências de que a atividade física é capaz de influenciar a composição da microbiota intestinal, não apenas através da frequência e do tipo de exercício, mas também na interrupção do comportamento sedentário (BRESSA *et al.*, 2017). Da mesma forma, Allen e colaboradores (2018) verificaram em seu estudo que a prática do exercício físico resultou em alterações composicionais e funcionais na microbiota intestinal, independente da dieta seguida (ALLEN *et al.*, 2018), o que também foi visto em uma revisão realizada em 2021, onde os autores identificaram mudanças discretas nos índices de diversidade e abundância relativa de algumas bactérias em pessoas ativas (AYA *et al.*, 2021).

2.4 MICROBIOTA E NASCIMENTO

O tipo de parto apresenta um papel importante na composição da microbiota intestinal na primeira infância, o que pode estar associado aos fatores ambientais que modulam a obesidade e outras doenças no futuro (MESQUITA *et al.*, 2013). Recém-nascidos de cesárea podem apresentar um atraso de 30 dias na colonização intestinal com bactérias benéficas quando comparados a recém-nascidos de parto vaginal (TSUKUMO *et al.*, 2015). A microbiota de recém-nascidos por via vaginal foi enriquecida com espécies de *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Bacteroides* e *Parabacteroides* (SHAO *et al.*, 2018), Lactobacillaceae, *Bacillus*, *Selenomonas* e *Staphylococcus* (RASPINI *et al.*, 2020), enquanto a microbiota intestinal de recém-nascidos via cesariana foi dominada por *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Clostridium perfringens* (SHAO *et al.*, 2018), *Streptococcus*, *Veillonella* e *Clostridium* (RASPINI *et al.*, 2020).

Em uma avaliação da microbiota intestinal de neonatos coreanos aos 3, 7 e 14 dias de vida foi identificado que recém-nascidos de parto vaginal apresentaram maior abundância de *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Lactobacillus* sete dias após o nascimento em comparação com recém-nascidos que nasceram via cesariana, e que os neonatos de cesariana apresentaram ao longo de duas semanas microbiota intestinal enriquecida em famílias Enterobacteriaceae e Enterococcaceae em

comparação com recém-nascidos via vaginal (KIM *et al.*, 2020). Em outro estudo, os pesquisadores observaram que, seis semanas após o parto, em lactentes nascidos de parto vaginal, o microbioma intestinal é caracterizado por uma abundância aumentada de *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Bacteroides*, e em lactentes nascidos via cesariana por uma maior abundância de *Bifidobacterium*, *Clostridium* e Enterobacteriaceae e baixos níveis de *Streptococcus* (LUNDGREN *et al.*, 2018). Semelhante a este estudo, Raspini e colaboradores (2020) avaliaram o mecônio de recém-nascidos 2 a 3 dias após o parto e não encontraram diferenças significativas no nível de filo entre o mecônio de neonatos nascidos por cesariana e por parto vaginal, sendo que as principais diferenças entre estes dois grupos foram em nível de gênero e espécie, como, por exemplo, *Streptococcus*, que foi maior no mecônio de neonatos nascidos por cesárea do que por parto vaginal (RASPINI *et al.*, 2020).

A mudança na composição da microbiota também pode ser ocasionada pelo uso de antibióticos, que perturbam diretamente a microbiota intestinal, tanto em crianças como em adultos (BOKULICH *et al.*, 2016). O antibiótico intraparto recebido pela mãe já foi identificado como um forte fator determinante do microbioma infantil (LAFOREST-LAPOINTE *et al.*, 2021), como mostrou uma revisão realizada em 2021, onde quase todos os estudos revisados pelos autores descreveram mudanças na microbiota intestinal infantil após uso de antibiótico intraparto, tendo Bacteroidetes e Actinobacteria diminuídos e Proteobacteria aumentados, tanto em partos vaginais como cesariana (PRESCOTT *et al.*, 2021). No estudo de Saturio e colaboradores (2021), os autores encontraram que o estabelecimento da microbiota bifidobacteriana durante os primeiros meses do lactente é afetado pela administração de antibiótico intraparto tanto em níveis quantitativos como qualitativos (SATURIO *et al.*, 2021). Recém-nascidos por cesariana ou parto vaginal, onde as mães receberam antibióticos perinatais, apresentaram diminuição nas espécies de *Bacteroides*, bem como a transmissão de *Bifidobacterium* da mãe para o recém-nascido também foi reduzida em neonatos nascidos por cesárea, o que pode ser resultado da exposição perinatal a antibióticos, segundo um estudo de revisão realizado em 2020 (O'NEILL *et al.*, 2020).

Após o nascimento, o determinante mais importante da colonização do intestino infantil é a amamentação (RAUTAVA, 2016). A microbiota do leite materno é composta por mais de 700 espécies de bactérias (RODRIGUEZ *et al.*, 2015). O

leite humano contem oligossacarídeos, que contribuem para moldar a microbiota intestinal do bebê, estimulando ativamente o crescimento de bactérias benéficas, sendo o terceiro componente mais abundante encontrado no leite (MILANI *et al.*, 2017). O tipo e a quantidade de oligossacarídeos do leite materno podem determinar a microbiota intestinal, uma vez que 98% destes oligossacarídeos não são absorvidos, sendo utilizados pelas bactérias do intestino como substrato quando atingem o cólon (MILANI *et al.*, 2017; UBEROS, 2020).

Lactentes amamentados apresentam maior abundância relativa de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Estafilococos* e *Prevotella*, enquanto lactentes que são amamentados exclusivamente com fórmula infantil ou em combinação com leite materno apresentam maior abundância relativa de Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria, de acordo com uma revisão realizada no ano de 2020 (O'NEILL *et al.*, 2020). Em uma avaliação da microbiota intestinal no primeiro mês de vida de lactentes alimentados com fórmula infantil em comparação com amamentados, duas espécies de *Bacteroides* e duas de *Parabacteroides* foram encontradas mais altas em lactentes alimentados por fórmula do que nos amamentados, mas nenhuma diferença estatística foi encontrada em nível de filo entre as amostras fecais dos dois grupos (RASPINI *et al.*, 2020).

Tem-se sugerido que algumas bactérias presentes na microbiota intestinal materna podem migrar para as glândulas mamárias através de uma via endógena, que envolve células dendríticas e macrófagos (FERNANDEZ *et al.*, 2013). Milani e colaboradores, em seu estudo, encontraram uma associação entre microbiota intestinal materna, microbiota do leite materno e microbiota intestinal do recém-nascido, porém, devido ao número de participantes (4 mães/recém-nascidos), o resultado teve pouco poder estatístico (MILANI *et al.*, 2015). Em um estudo realizado em 2019 com 393 díades mães-bebês, os autores sugerem que a composição e a diversidade da microbiota do leite são influenciadas pelo tipo de aleitamento recebido, sexo do bebê, tipo de parto, IMC materno e número de irmãos mais velhos (MOOSSAVI *et al.*, 2019).

2.5 ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA

A metagenômica é o método de sequenciar todos os genomas microbianos dentro de uma amostra (KNIGHT *et al.*, 2018). O principal marcador molecular usado

para estudos da diversidade genética das bactérias é o 16S rRNA (RNA ribossômico). O gene 16S rRNA é encontrado em todos os micro-organismos e possui suficiente conservação de sequências para alinhamento preciso e variação suficiente para análises filogenéticas (TURNBAUGH *et al.*, 2007). Ele codifica uma subunidade ribossomal que é amplamente conservada entre as bactérias e contém regiões hipervariáveis intercaladas entre regiões conservadas de sua sequência (AMES *et al.*, 2017).

Essas regiões hipervariáveis são exclusivas de cada espécie bacteriana, permitindo sua classificação ou taxonomia. Os resultados finais são representados em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), que é uma sequência que identifica um organismo geralmente em nível de gênero ou espécie (AMES *et al.*, 2017). Recentemente, as variantes de sequenciamento de amplicon (ASVs) tem sido propostas como uma alternativa às OTUs para análise de comunidades microbianas, visto que refletem uma condição mais refinada de taxonomia em nível de espécie (SCHLOSS, 2021), demonstrando melhor sensibilidade e especificidade quanto as OTUs (CALLAHAN *et al.*, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

A microbiota intestinal no período neonatal é um dos possíveis fatores relacionados com a predisposição para obesidade futura (DIBAISE *et al.*, 2012; SCHEEPERS *et al.*, 2014; KOLEVA *et al.*, 2015). A obesidade é a doença de maior relevância quando se fala em saúde pública e afeta 6,5% das crianças com idade entre 2 e 4 anos, 13,2% das crianças entre 5 e 9 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019), 13,4% dos adolescentes de 10 a 17 anos e 25,9% da população adulta maior de 18 anos (IBGE, 2020).

No Brasil, estudos investigaram a microbiota intestinal em recém-nascidos (MUELLER *et al.*, 2016; MUELLER *et al.*, 2017) e, até o momento, não foram encontradas publicações investigando a relação entre a microbiota materna e a do recém-nascido. Assim, compreendendo a microbiota inicial como fator de risco para doenças futuras, torna-se importante entender quais são as implicações da composição da microbiota materna durante a gravidez na microbiota do recém-nascido, para, talvez, encontrar meios de poder contribuir com a prevenção destas patologias.

Dessa forma, a relevância do tema e a ausência de dados no Brasil justificam o presente estudo.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Investigar a transferência da microbiota intestinal materna para o recém-nascido.

4.2 ESPECÍFICOS

- a) Determinar a composição das microbiotas do intestino materno e do recém-nascido;
- b) Avaliar a influência da microbiota materna na microbiota do recém-nascido;
- c) Verificar fatores pré-natais e perinatais que possam influenciar a microbiota encontrada nos recém-nascidos.

5 METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO

Trata-se de um estudo transversal analítico.

5.2 LOCAL OU CENÁRIO

Serviço de Maternidade e Pediatria do Hospital Tacchini localizado no município de Bento Gonçalves/RS.

5.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Gestantes a partir de 37 semanas de idade gestacional.

5.3.1 Desenho amostral

Definiu-se estudar uma amostra de conveniência de gestantes atendidas no Serviço de Maternidade e Pediatria do Hospital Tacchini localizado no município de Bento Gonçalves/RS

5.3.2 Cálculo do tamanho da amostra

Estimou-se uma proporção de 50% de transferência de microbiota materna para o recém-nascido, erro de 10% e nível de confiança de 95%, totalizando uma amostra de 97 pares mãe/recém-nascido.

5.3.3 Critérios de inclusão

Gestantes com idade superior ou igual a 18 anos com idade gestacional a partir de 37 semanas confirmada por ultrassonografia realizada até a 20^o semana ou data da última menstruação, recém-nascidos de ambos os sexos, bolsa rota com menos de 12 horas.

5.3.4 Critérios de exclusão

Gestantes com gestação gemelar, que usaram antibiótico durante a gestação, portadoras de pré-eclâmpsia, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, hipertensão, doenças infecciosas, diabetes e fumantes.

5.4 COLETA DE DADOS

A coleta de dados ocorreu nos meses de dezembro de 2016, janeiro, fevereiro e março de 2017, outubro, novembro e dezembro de 2018, março a dezembro de 2019, em dois momentos: antes do parto e entre 24 a 48h após o parto. Apenas uma pesquisadora participou da coleta. No primeiro contato, antes do parto, no Centro Obstétrico, a gestante foi convidada a participar do estudo, sendo explicados os objetivos da pesquisa e entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APÊNDICE A). Com a aceitação da gestante e após assinatura do TCLE, coletou-se a amostra biológica da mucosa anal da participante. Esta amostra foi coletada com o auxílio de *swabs* estéreis, deslizados delicadamente sobre a superfície da mucosa, com a participante deitada em decúbito lateral.

No segundo contato, em 24 a 48 horas após o parto, no Serviço de Pediatria, coletou-se a amostra biológica de fezes do recém-nascido, através do recolhimento das fezes na fralda com ajuda de uma espátula de madeira, ou na impossibilidade desta, a coleta de amostra da mucosa anal do recém-nascido, com o auxílio de *swabs* estéreis, deslizados delicadamente sobre a superfície da mucosa, com o participante deitado em decúbito dorsal, com as pernas flexionadas com a ajuda de um dos responsáveis. Foram coletadas também amostras de leite materno, a partir da ordenha manual, após descarte das primeiras gotas de leite e higienização da mama com toalha descartável e água. As amostras da mucosa oral da mãe foram coletadas por meio de *swabs* estéreis, deslizados delicadamente em ambas bochechas da participante, e as amostras da mucosa oral do recém-nascido foram coletadas por meio de *swabs* estéreis, deslizados delicadamente em ambas bochechas com a ajuda de um dos responsáveis. As amostras biológicas foram armazenadas a -80°C no Instituto de Pesquisa em Saúde do Hospital Tacchini e posteriormente transportadas em caixa térmica com gelo ao Laboratório de Pediatria Translacional no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sendo armazenadas

a - 80°C até o momento do processamento. Para garantir a privacidade pessoal, as amostras continham apenas o número de identificação da dupla mãe-recém-nascido, sem nenhuma informação pessoal.

Neste segundo contato também foi aplicado o questionário geral de coleta de dados (APÊNDICE B), do qual foram obtidas informações sobre dados socioeconômicos e demográficos (como idade e escolaridade materna, situação conjugal, renda familiar), estilo de vida durante a gestação (como uso de medicamentos e suplementos). Alguns dados sobre o pré-natal foram coletados na carteira da gestante (como peso materno pré-gestacional e na gestação). Dados relacionados ao parto e recém-nascido foram coletados via prontuário médico e caderneta de saúde do bebê. Foram aplicados, concomitantemente ao questionário geral, o Questionário Internacional de Atividade Física – IPAQ (CRAIG *et al.*, 2003) (ANEXO A) versão curta, referente às atividades físicas realizadas no período gestacional, e o Questionário de Frequência Alimentar – QFA (ANEXO B), previamente validado para gestantes (GIACOMELLO *et. al*, 2008), para avaliar a alimentação habitual da participante durante o período gestacional.

5.4.1 Idade materna

A idade materna foi considerada a idade em anos completos no momento da entrevista.

5.4.2 Escolaridade materna

A escolaridade materna foi considerada a escolaridade em anos completos de estudo ou grau de instrução (primeiro grau, segundo grau, graduação) no momento da entrevista.

5.4.3 Renda familiar

A renda total da participante foi calculada pela soma da renda de todos os moradores da casa no momento da entrevista e os benefícios recebidos pela família. A renda também foi avaliada pelo número de salários mínimos recebidos pela

família, considerando o valor do salário mínimo em vigor no ano de 2022: R\$1.212,00 (BRASIL, 2022).

5.4.4 Intervalo interpartal

O intervalo interpartal foi calculado considerando o intervalo em anos entre o nascimento do primeiro filho e o filho atual.

5.4.5 Estado nutricional

O estado nutricional pré-gestacional foi determinado pelo índice de massa corporal (IMC), obtido pela relação entre o peso (em kg) antes da gestação e altura (em metros) ao quadrado ($\text{peso}/\text{altura}^2$) e classificado de acordo com o Ministério da Saúde – MS (BRASIL, 2011): baixo peso ($<18,5 \text{ kg}/\text{m}^2$); adequado (entre 18,5 e 24,9 kg/m^2); sobrepeso (entre 25,0 e 29,9 kg/m^2); e obesidade ($\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$). O estado nutricional na gestação foi determinado pelo IMC, obtido pela relação entre o peso (em kg) na última consulta pré-natal e altura (em metros) ao quadrado ($\text{peso}/\text{altura}^2$) e classificado de acordo com as semanas gestacionais (BRASIL, 2011), como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação do estado nutricional da gestante segundo Índice de Massa Corporal por semana gestacional (a partir das 37 semanas de idade gestacional – critério de inclusão para o estudo).

Semana gestacional	Baixo peso IMC \leq	Adequado IMC entre	Sobrepeso IMC entre	Obesidade IMC \geq
37	24,3	24,5 – 28,7	28,8 – 32,8	32,9
38	24,5	24,6 – 28,8	28,9 – 32,9	33,0
39	24,7	24,8 – 28,9	29,0 – 33,0	33,1
40	24,9	25,0 – 29,1	29,2 – 33,1	33,2
41	25	25,1 – 29,2	29,3 – 33,2	33,3

Adaptado de MS, 2011. IMC: Índice de Massa Corporal (em kg/m^2).

5.4.6 Ganho de peso materno

O ganho de peso total na gestação foi calculado pela diferença entre o peso da gestante na última consulta pré-natal e o peso pré-gestacional e classificado em

ganho de peso adequado (gestantes que ganharam peso dentro do recomendado), ganho de peso abaixo do recomendado (gestantes que ganharam menos peso do que o recomendado) ou ganho de peso acima do recomendado (as gestantes que ganharam mais peso do que o recomendado), segundo as recomendações do Institute of Medicine – IOM (RASMUSSEN & YAKTINE, 2009) conforme IMC pré-gestacional, apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Recomendação de ganho total de peso durante a gestação pelo Índice de Massa Corporal pré-gestacional.

IMC pré-gestacional	Total de ganho de peso (em kg)
Baixo peso (<18,5kg/m²)	12,5–18
Adequado (18,5-24,9kg/m²)	11,5–16
Sobrepeso (25,0-29,9kg/m²)	7–11,5
Obesidade (≥ 30kg/m²).	5–9

Adaptado de IOM, 2009. IMC: Índice de Massa Corporal.

5.4.7 Peso de nascimento

O peso de nascimento foi classificado de acordo com a idade gestacional através das curvas de crescimento produzidas pelo projeto multicêntrico internacional Intergrowth-21st (VILLAR *et al.*, 2014): recém-nascido pequeno para a idade gestacional – PIG (menor que o percentil 10 da curva), recém-nascido adequado para a idade gestacional – AIG (entre o percentil 10 e o percentil 90 da curva) e recém-nascido grande para a idade gestacional – GIG (maior que o percentil 90 da curva).

5.4.8 Tipo de aleitamento

A informação sobre o tipo de aleitamento materno recebido pelo recém-nascido foi verificada no questionário aplicado no pós-parto e foi dividida em três categorias: recém-nascidos em aleitamento materno exclusivo (receberam somente leite materno até o momento da entrevista), recém-nascidos em aleitamento materno misto (receberam leite materno concomitante com leite artificial até o momento da entrevista) e recém-nascidos em uso de fórmula infantil (receberam somente leite artificial até o momento da entrevista).

5.4.9 Atividade física

A classificação da atividade física foi realizada utilizando os critérios e o agrupamento em categorias proposto pelo IPAQ (CRAIG *et al.*, 2003), que classifica a amostra em quatro categorias: sedentário, insuficientemente ativo, ativo e muito ativo.

5.4.10 Consumo alimentar

Os alimentos, questionados por meio do QFA, foram separados em grupos alimentares: carboidratos (cereais, raízes e tubérculos), legumes e verduras, frutas, oleaginosas (castanhas e nozes), feijões, leite e queijos, carnes e ovos (para este estudo os pescados foram separados deste grupo), açúcar adicionado e alimentos ultraprocessados (para este estudo consideramos três alimentos: biscoito, iogurte e sorvete), conforme o Guia Alimentar para a População Brasileira (BRASIL, 2014). As frequências de consumo dos alimentos foram: "mais de três vezes/dia"; "duas a três vezes/dia"; "uma vez/dia"; "cinco a seis vezes/semana"; "duas a quatro vezes/semana"; "uma vez/semana"; "uma a três vezes/mês"; "nunca/quase nunca", sendo a frequência do consumo de cada grupo estabelecida através da frequência alimentar do alimento mais consumido pertencente àquele grupo, não entrando nesse critério os grupos verduras e legumes, frutas e açúcar adicionado, onde a frequência de consumo foi estabelecida em uma única pergunta.

5.4.11 Classificação socioeconômica

A classificação socioeconômica seguiu o critério da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (BRASIL, 2016). A classificação divide a população brasileira em seis estratos socioeconômicos denominados A, B1, B2, C1, C2 e D-E.

5.5 VARIÁVEIS UTILIZADAS

As variáveis utilizadas nesta pesquisa, para fins de metacorrrelação, foram:

- a) **Estado nutricional pré-gestacional:** adequado, sobrepeso/obesidade;
- b) **Tipo de parto:** vaginal, cesárea;

c) **Peso de nascimento do bebê classificado pela idade gestacional:** PIG, AIG, GIG.

5.6 ANÁLISE METAGENÔMICA

A extração do DNA das amostras, preparo das bibliotecas e sequenciamento do gene 16S rRNA foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana do HCPA e as análises estatísticas e de bioinformática foram realizadas no Núcleo de Bioinformática do HCPA, sob a responsabilidade do pesquisador Otávio von Ameln Lovison.

5.6.1 Extração de DNA

Para essa pesquisa foram utilizadas somente as amostras de fezes e swab anal. O DNA microbiano foi extraído destas amostras utilizando-se o kit QIAamp DNA Stool® Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, com pequenas adaptações. Após o processamento inicial (eluição em buffer de lise, adsorção dos inibidores de PCR e pré-tratamento com proteinase K), foi realizado um *bead-beating* com *beads* de zirconia/silica em um equipamento *FastPrep 24 5G system* (Qbiogene, CA), por 30 segundos a 6.0 m/seg (repetido 3 vezes). Os ácidos nucléicos totais foram eluídos em 60 µL de tampão TE (Tris-EDTA pH 8,0). O DNA foi congelado a - 80°C até o momento da amplificação do gene 16S e sequenciamento.

5.6.2 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

O microbioma das amostras foi realizado através do sequenciamento das regiões hipervariáveis v3-v4 do gene 16S, conforme o protocolo "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina" (Illumina, San Diego, CA, USA), usando os seguintes *primers*:

Forward:TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWG
CCAG

Reverse:GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTAT
CTAA.

Os produtos de amplificação foram purificados com Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter Genomics, MA) e as bibliotecas foram validadas utilizando o Agilent 4200 TapeStation system (Agilent), quantificadas utilizando Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific), normalizadas, agrupadas em proporções equimolares (4nM), quantificadas novamente, desnaturadas e sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq utilizando MiSeq Reagent Kits v2 (Illumina, San Diego, CA, USA).

5.6.3 Pré-processamento do sequenciamento do gene 16S rRNA

O pré-processamento das sequências seguiu o Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis (CALLAHAN *et al.*, 2016). As *reads* foram filtradas pela qualidade (Phred = 20) e truncadas na posição 240. Junção em pares, determinação de ASVs, remoção de sequências quiméricas e atribuição taxonômica foram realizadas usando o Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2) R package v1.16 e o classificador Naïve Bayes pré-treinado SILVA versão 138.1 de March 10, 2021 (MCLAREN & CALLAHAN, 2021). A tabela de características da amostra por sequência, taxonomia atribuída, árvore filogenética e os metadados foram organizados em um objeto *phyloseq* para análise estatística utilizando o *phyloseq* R package v1.40.0 (MCMURDIE & HOLMES, 2013).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA E DE BIOINFORMÁTICA

Os dados foram digitados no programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 21 com posterior conferência e validação dos dados. As variáveis contínuas foram descritas por média e desvio padrão. As variáveis categóricas foram apresentadas por frequências absolutas e relativas.

O banco de dados foi importado para o programa Open Source Program 'R', version 4.2.1 (2022-06-23) -- "Funny-Looking Kid" (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020) para as análises de bioinformática. As amostras com menos de 2000 sequências foram excluídas da análise. Foram criados *subsets* para cada grupo amostral (mãe, bebê e leite materno), que foram tratados e subsequentemente agrupados em nível de filo, ordem e gênero para as análises posteriores. Para as metacorrelações, as variáveis foram categorizadas conforme a literatura, e,

eventualmente, agrupadas racionalmente, para aumento de poder estatístico. Foi considerado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

As análises de alfa diversidade foram realizadas utilizando as métricas de *Observed Richness* (riqueza observada) e índice de diversidade de Shannon e a significância estatística foi calculada utilizando Kruskal-Wallis e Dunn's Multiple Comparison Test como post hoc test. Para beta diversidade foram realizadas análises de coordenadas principais (PCoA) utilizando Weighted Unifrac e a significância estatística foi calculada utilizando a Análise de Variância Multivariada Não-paramétrica (PERMANOVA) (ANDERSON, 2017). Para abundância diferencial, utilizou-se um Negative Binomial Wald Test usando estimativas padrão de máxima verossimilhança para coeficientes de GLM (modelo linear generalizado) assumindo uma distribuição a priori normal de média zero, implementado no *nbinomWaldTest method* do pacote DESeq2 (MCMURDIE & HOLMES, 2014; LOVE *et al.*, 2014). Todos os testes foram corrigidos para múltiplas inferências utilizando o método Benjamini-Hochberg (BH) para controle da False Discovery Rate (FDR).

A análise de transferência de microbiota foi realizada conforme um modelo proposto por Mortensen e colaboradores (2021), e correlacionada com a via de parto. Para determinar a probabilidade da ASV ser transferida da mãe para o bebê, utilizou-se um teste exato de Fisher comparando a presença/ausência das ASVs entre os pares e avaliamos a Odds Ratio (OR) para transferência utilizando um valor de p unilateral, com um ponto de corte de 5%, em direção da hipótese nula de $OR = 1$. Somente as ASVs que demonstraram presença/ausência em ambos *subsets* (mãe/bebê) foram incluídas na análise. As inferências de transferência das ASVs individualmente foram corrigidas utilizando BH para FDR. Uma Weighted Transfer Ratio (WTR) entre as OR positivas e negativas foi utilizada como medida generalizada de transferência. Para determinar se a abundância das ASVs nas mães afetariam a probabilidade de transferência, nós correlacionamos a OR para transferência para cada ASV com a abundância relativa de toda comunidade microbiana, como proposto por Mortensen e colaboradores (MORTENSEN *et al.*, 2021).

5.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A pesquisa seguiu os preceitos éticos e morais preconizados pela Resolução número 466/12, do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2013), sobre a ética em pesquisa com seres humanos e iniciou após a sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (16-0283) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Tacchini (2.607.853).

As participantes assinaram o TCLE, impresso em duas vias, uma entregue à participante e outra à pesquisadora, e foram informadas sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, procedimentos previstos e o incômodo que estes poderiam lhes causar. Foram garantidas a privacidade quanto a identificação das participantes e seus filhos e a confidencialidade dos dados obtidos. As participantes poderiam retirar-se do estudo em qualquer momento da pesquisa, sem prejuízo as mesmas.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de desenvolvimento deste trabalho, desde a concepção do projeto, a coleta de dados e a escrita da tese, foi enriquecedor, uma grande conquista profissional e pessoal.

Até o presente momento este é o primeiro estudo a avaliar a transferência da microbiota intestinal materna para o recém-nascido no Brasil.

Como a microbiota do início da vida pode ser importante para a saúde futura do hospedeiro, os resultados deste estudo podem ser relevantes no atendimento à gestante e ao recém-nascido. A avaliação da microbiota no início da gravidez ou no momento pré-concepção pode ser uma ferramenta útil para uma abordagem personalizada, contemplando possíveis meios de ajudar a manipular positivamente a microbiota das mães, contribuindo assim com a saúde do recém-nascido.

REFERÊNCIAS

ALLEN, J. M.; MAILING, L. J.; NIEMIRO, G. M.; MOORE, R.; COOK, M. D.; WHITE, B. A.; HOLSCHER, H. D.; & WOODS, J. A. Exercise alters gut microbiota composition and function in lean and obese humans. **Medicine and science in sports and exercise**, 50(4), 747–757, 2018.

AMES, N. J.; RANUCCI, A.; MORIYAMA, B.; WALLEN, G. R. The human microbiome and understanding the 16s rna gene in translational nursing science. **Nursing research**, 66(2), 184–197, 2017.

ANDERSON, M. J. **Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA)**. In Wiley Stats Ref: Statistics Reference Online (eds N. Balakrishnan, T. Colton, B. Everitt, W. Piegorisch, F. Ruggeri and J.L. Teugels), 2017.

ARDISSONE, A. N. *et al.* Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. **PLoS ONE**, 9(3), e90784, 2014.

AYA V.; FLOREZ A.; PEREZ L.; RAMIREZ J. D. Association between physical activity and changes in intestinal microbiota composition: a systematic review. **PLoS ONE** 16(2): e0247039, 2021.

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

BRASIL. **Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa. ABEP. Critério de Classificação Econômica Brasil**. Brasil, 2016. Disponível em: <http://www.abep.org/criterio-brasil>.

BRASIL. **Lei nº 14.358, de 1º de junho de 2022**. Diário Oficial da União. n. 104. Seção I, p. 1. [S. l.: s. n.], 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde : Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN / **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 76 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira / **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica**. – 2. ed., 1. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 156 p.

BRASIL. **Resolução No. 466,12 de dezembro de 2012. Dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**. Diário Oficial da União. n. 12. Seção I, p. 59. [S. l.: s. n.], 2013.

BRESSA, C. *et al.* Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. **PLoS ONE** v.12, n.2: e0171352, fev. 2017.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME journal**, 11(12), 2639–2643, 2017.

CALLAHAN, B. J.; SANKARAN, K.; FUKUYAMA, J. A.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses. **F1000Research**, 5, 1492, 2016.

CARDING, S., VERBEKE, K., VIPOND, D. T., CORFE, B. M., & OWEN, L. J. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microbial ecology in health and disease**, 26, 26191, 2015.

CHI, C. *et al.* Longitudinal gut bacterial colonization and its influencing factors of low birth weight infants during the first 3 months of life. **Frontiers in microbiology**, 10, 1105, 2019.

CHIARELLO, M., MCCAULEY, M., VILLÉGER, S., JACKSON, C. R. Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. **PloS one**, 17(2), e0264443, 2022.

CHONG, C. Y. L.; BLOOMFIELD, F. H.; O'SULLIVAN, J. M. Factors affecting gastrointestinal microbiome development in neonates. **Nutrients**, 10(3), 274, 2018.

CHU, D. M. *et al.* The early infant gut microbiome varies in association with a maternal high-fat diet. **Genome medicine**, 8(1), 77, 2016.

CLEMENTE J. C.; URSELL L. K.; PARFREY L. W.; KNIGHT R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, 148:1258-70, 2012.

COLLADO, M. C., ISOLAURI, E., LAITINEN, K., SALMINEN, S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. **The American journal of clinical nutrition**, 88(4), 894–899, 2008.

COLLADO, M. C., ISOLAURI, E., LAITINEN, K., SALMINEN, S. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. **The American journal of clinical nutrition**, 92(5), 1023–1030, 2010.

CRAIG, C. L. *et al.* International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. **Medicine and science in sports and exercise**, 35(8), 1381–1395, 2003.

CROVESY, L., MASTERSON, D., ROSADO, E. L. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. **European journal of clinical nutrition**, 74(9), 1251–1262, 2020.

DIBASE J. K., FRANK D., MATHUR R. Impact of the gut microbiota on the development of obesity: current concepts. **The American Journal of Gastroenterology Supplements**, 1. 22–27, 2012.

ECKBURG, P. B. *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science (New York, N.Y.)**, 308(5728), 1635–1638, 2005.

EVERARD, A., & CANI, P. D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, 27(1), 73–83, 2013.

FERNÁNDEZ, L. *et al.* The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological research**, 69(1), 1–10, 2013.

FUNKHOUSER, L. J., & BORDENSTEIN, S. R. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. **PLoS biology**, 11(8), e1001631, 2013.

GARCÍA-SOLACHE, M., RICE, L. B. The enterococcus: a model of adaptability to its environment. **Clinical microbiology reviews**, 32(2), e00058–18, 2019.

GIACOMELLO A. *et al.* Validação relativa de Questionário de Frequência Alimentar em gestantes usuárias de serviços do Sistema Único de Saúde em dois municípios no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, 8(4):445–454, 2008.

GOMES, A. C., HOFFMANN, C., MOTA, J. F. The human gut microbiota: metabolism and perspective in obesity. **Gut microbes**, 9(4), 308–325, 2018.

HAMADY, M., LOZUPONE, C., KNIGHT, R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. **The ISME journal**, 4(1), 17–27, 2010.

HANACHI, M. *et al.* Longitudinal and comparative analysis of gut microbiota of tunisian newborns according to delivery mode. **Frontiers in microbiology**, 13, 780568, 2022.

HE, Q. *et al.* The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota than the maternal fecal and vaginal microbiota. **Gut microbes**, 12(1), 1794266, 2020.

HOLMES S. Successful strategies for human microbiome data generation, storage and analyses. **Journal of biosciences**, 44(5), 111, 2019.

HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, 486(7402), 207–214, 2012.

IBGE. Pesquisa nacional de saúde: 2019: atenção primária à saúde e informações antropométricas. **Brasil/IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento**. - Rio de Janeiro, 66p, 2020.

JOOS L. *et al.* Daring to be differential: metabarcoding analysis of soil and plant-related microbial communities using amplicon sequence variants and operational taxonomical units. **BMC genomics**, 21(1), 733, 2020.

KARLSSON, C. L., MOLIN, G., CILIO, C. M., AHRNÉ, S. The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at term-a pilot study. **Pediatric research**, 70(3), 282–286, 2011.

KHO, Z. Y., LAL, S. K. The human gut microbiome - a potential controller of wellness and disease. **Frontiers in microbiology**, 9, 1835, 2018.

KIM, G. *et al.* Delayed establishment of gut microbiota in infants delivered by cesarean section. **Frontiers in microbiology**, 11, 2099, 2020.

KNIGHT, R. *et al.* Best practices for analysing microbiomes. **Nature reviews. Microbiology**, 16(7), 410–422, 2018.

KOLEVA, P. T., BRIDGMAN, S. L., KOZYRSKYJ, A. L. The infant gut microbiome: evidence for obesity risk and dietary intervention. **Nutrients**, 7(4), 2237–2260, 2015.

KOREN, O. *et al.* Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. **Cell**, 150(3), 470–480, 2012.

LAFOREST-LAPOINTE I. *et al.* Maternal consumption of artificially sweetened beverages during pregnancy is associated with infant gut microbiota and metabolic modifications and increased infant body mass index. **Gut Microbes.**;13(1):1-15, 2021.

LANDMAN, C., QUÉVRAIN, E. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique [Gut microbiota: description, role and pathophysiological implications]. **La Revue de médecine interne**, 37(6), 418–423, 2016.

LEGARIA, M. C. *et al.* Peptostreptococcus anaerobius: pathogenicity, identification, and antimicrobial susceptibility. Review of monobacterial infections and addition of a case of urinary tract infection directly identified from a urine sample by MALDI-TOF MS. **Anaerobe**, 72, 102461, 2021.

LLOYD-PRICE, J., ABU-ALI, G.; HUTTENHOWER, C. The healthy human microbiome. **Genome medicine**, 8(1), 51, 2016.

LOPETUSO, L. R., SCALDAFERRI, F., PETITO, V., GASBARRINI, A. Commensal clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. **Gut pathogens**, 5(1), 23, 2013.

LOVE, M. I., HUBER, W., ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, 15(12), 550, 2014.

- LUNDGREN, S. N. *et al.* Maternal diet during pregnancy is related with the infant stool microbiome in a delivery mode-dependent manner. **Microbiome**, 6(1), 109, 2018.
- MAKINO, H. *et al.* Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. **PloS one**, 8(11), e78331, 2013.
- MATAMOROS, S., GRAS-LEGUEN, C., LE VACON, F., POTEL, G., DE LA COCHETIERE, M. F. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. **Trends in microbiology**, 21(4), 167–173, 2013.
- MCLAREN, M. R., CALLAHAN, B. J. SILVA. 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2 [Data set]. **Zenodo**, 2021.
- MCMURDIE, P. J., HOLMES, S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, 8(4), e61217, 2013.
- MCMURDIE, P. J., HOLMES, S. Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. **PLoS computational biology**, 10(4), e1003531, 2014.
- MESQUITA, D. N. *et al.* Cesarean section is associated with increased peripheral and central adiposity in young adulthood: cohort study. **PloS one**, 8(6), e66827, 2013.
- MILANI, C. *et al.* Exploring vertical transmission of bifidobacteria from mother to child. **Applied and environmental microbiology**, 81(20), 7078–7087, 2015.
- 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: MMBR**, 81(4), e00036-17, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atlas da obesidade infantil no Brasil**, 2019.
- MOOSSAVI, S. *et al.* Composition and variation of the human milk microbiota are influenced by maternal and early-life factors. **Cell host & microbe**, 25(2), 324–335.e4, 2019.
- MORGAN, X. C., HUTTENHOWER, C. Chapter 12: Human microbiome analysis. **PLoS computational biology**, 8(12), e1002808, 2012.
- MORTENSEN, M. S. *et al.* Modeling transfer of vaginal microbiota from mother to infant in early life. **eLife**, 10, e57051, 2021.
- MUELLER, N. T. *et al.* Birth mode-dependent association between pre-pregnancy maternal weight status and the neonatal intestinal microbiome. **Scientific reports**, 6, 23133, 2016.
- MUELLER, N. T. *et al.* Delivery mode and the transition of pioneering gut-microbiota structure, composition and predicted metabolic function. **Genes**, 8(12), 364, 2017.

MUNYAKA, P. M., KHAFIPOUR, E., GHIA, J. E. External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. **Frontiers in pediatrics**, 2, 109, 2014.

MUSSO, G., GAMBINO, R., CASSADER, M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded?. **Diabetes care**, 33(10), 2277–2284, 2010.

NURIEL-OHAYON, M., NEUMAN, H., KOREN, O. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. **Frontiers in microbiology**, 7, 1031, 2016.

O'NEILL, I. J. *et al.* Maternal and infant factors that shape neonatal gut colonization by bacteria. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, 14(8), 651–664, 2020.

PRESCOTT, S. *et al.* Impact of intrapartum antibiotic prophylaxis on offspring microbiota. **Frontiers in pediatrics**, 9, 754013, 2021.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, **R Foundation for Statistical Computing**, 2020.

RASMUSSEN, K. M., YAKTINE, A. L., INSTITUTE OF MEDICINE (US) AND NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE TO REEXAMINE IOM PREGNANCY WEIGHT GUIDELINES (EDS.). Weight gain during pregnancy: reexamining the guidelines. **National Academies Press (US)**, 2009.

RASPINI, B. *et al.* Prenatal and postnatal determinants in shaping offspring's microbiome in the first 1000 days: study protocol and preliminary results at one month of life. **Italian journal of pediatrics**, 46(1), 45, 2020.

RAUTAVA S. Early microbial contact, the breast milk microbiome and child health. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**. 7: 5–14, 2016.

REID, G., YOUNES, J. A., VAN DER MEI, H. C., GLOOR, G. B., KNIGHT, R., & BUSSCHER, H. J. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. **Nature reviews. Microbiology**, 9(1), 27–38, 2011.

RODRÍGUEZ, J. M. *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microbial ecology in health and disease**, 26, 26050, 2015.

SATURIO, S. *et al.* Effect of intrapartum antibiotics prophylaxis on the bifidobacterial establishment within the neonatal gut. **Microorganisms**, 9(9), 1867, 2021.

SCHEEPERS, L. E., PENDERS, J., MBAKWA, C. A., THIJS, C., MOMMERS, M., & ARTS, I. C. The intestinal microbiota composition and weight development in children: the KOALA Birth Cohort Study. **International journal of obesity (2005)**, 39(1), 16–25, 2015.

SCHLOSS P. D. Amplicon sequence variants artificially split bacterial genomes into separate clusters. **mSphere**, 6(4), e0019121, 2021.

SHAO, Y. *et al.* Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. **Nature**, 574(7776), 117–121, 2019.

SINGH, S. B. *et al.* Does birth mode modify associations of maternal pre-pregnancy BMI and gestational weight gain with the infant gut microbiome?. **International journal of obesity (2005)**, 44(1), 23–32, 2020.

SUGINO, K. Y., PANETH, N., & COMSTOCK, S. S. Michigan cohorts to determine associations of maternal pre-pregnancy body mass index with pregnancy and infant gastrointestinal microbial communities: Late pregnancy and early infancy. **PloS one**, 14(3), e0213733, 2019.

TANAKA, M., NAKAYAMA, J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. **Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology**, 66(4), 515–522, 2017.

TSUKUMO, D. M., CARVALHO, B. M., CARVALHO FILHO, M. A., SAAD, M. J. Translational research into gut microbiota: new horizons on obesity treatment: updated 2014. **Archives of endocrinology and metabolism**, 59(2), 154–160, 2015.

TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., HAMADY, M., FRASER-LIGGETT, C. M., KNIGHT, R., GORDON, J. I. The human microbiome project. **Nature**, 449(7164), 804–810, 2007.

TURUNEN, J. *et al.* Presence of distinctive microbiome in the first-pass meconium of newborn infants. **Scientific reports**, 11(1), 19449, 2021.

UBEROS J. Perinatal microbiota: review of its importance in newborn health. Microbiota perinatal: Revisión de su importancia en la salud del recién nacido. **Archivos argentinos de pediatría**, 118(3), e265–e270, 2020.

URSELL, L. K., METCALF, J. L., PARFREY, L. W., KNIGHT, R. Defining the human microbiome. **Nutrition reviews**, 70 Suppl 1(Suppl 1), S38–S44, 2012.

VILLAR, J. *et al.* International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. **Lancet (London, England)**, 384(9946), 857–868, 2014.

WALKER W. A. The importance of appropriate initial bacterial colonization of the intestine in newborn, child, and adult health. **Pediatric research**, 82(3), 387–395, 2017.

WALKER, R. W., CLEMENTE, J. C., PETER, I., LOOS, R. J. F. The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? **Pediatric obesity**, 12 Suppl 1(Suppl 1), 3–17, 2017.

YANG, H. et al. Systematic analysis of gut microbiota in pregnant women and its correlations with individual heterogeneity. **NPJ biofilms and microbiomes**, 6(1), 32, 2020.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: **“Análise da transferência da microbiota materna para o recém-nascido e fatores determinantes”**

Você e seu(sua) filho(a) estão sendo convidados a participarem de uma pesquisa cujo objetivo é investigar a associação entre as microbiotas do intestino materno, leite materno e intestino do recém-nascido, assim como outros fatores de saúde maternos e do parto, e o seu impacto na saúde do recém-nascido. A microbiota se refere aos micro-organismos que habitam o corpo humano. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Núcleo de Estudos da Criança e do Adolescente (NESCA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes:

- Realização de um questionário com duração de aproximadamente 30 minutos realizado antes da alta hospitalar no segundo dia de internação;
- Coleta de uma amostra da mucosa anal antes do parto, através de um *swab* (haste flexível de algodão) estéril, deslizado delicadamente sobre a superfície da mucosa, com você deitada de barriga para cima com as pernas inclinadas;
- Coleta de uma amostra de leite materno, em torno de 5ml, realizada por você e com auxílio do pesquisador, a partir da ordenha manual, após descarte dos primeiros jatos de leite e higienização da mama com toalha descartável e água, antes da alta hospitalar;
- Coleta de uma amostra de células da mucosa oral (saliva), através de um *swab* (haste flexível de algodão) estéril, deslizado delicadamente sobre a superfície da boca;
- Consulta a dados do prontuário, como: data da última menstruação, peso da placenta, datas de consulta de pré-natal, peso durante a gestação, altura, e exames laboratoriais.

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos na participação de seu(sua) filho(a) são os seguintes:

- Coleta de uma amostra de fezes (aproximadamente 5g) na fralda de seu(sua) filho(a), antes da alta hospitalar;
- Coleta de uma amostra de células da mucosa oral (saliva), através de um *swab* (haste flexível de algodão) estéril, deslizado delicadamente sobre a superfície da boca;

- Consulta a dados do prontuário, como: peso ao nascer, comprimento ao nascer, número da declaração de nascido vivo, perímetro cefálico, valores de Apgar, tipo de parto, hora de nascimento, tipo de aleitamento no primeiro dia de vida.

() Autorizo a coleta de dados em meu prontuário e no prontuário de meu(minha) filho(a).

() Não autorizo a coleta de dados em meu prontuário e no prontuário de meu(minha) filho(a).

Os pesquisadores são treinados para que ocorra o mínimo possível de desconforto para você e seu(sua) filho(a) durante a coleta das amostras e aplicação do questionário. Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa para você são: leve desconforto durante a coleta das amostras de leite materno, da mucosa anal e da mucosa oral; tempo de resposta ao questionário. Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa para seu(sua) filho(a) são: leve desconforto durante a coleta da amostra da mucosa oral e de fezes.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos para você e seu(sua) filho(a), porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e se aplicável, poderá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

As amostras coletadas serão armazenadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre até a análise. Após a análise, gostaríamos de armazenar estas amostras por mais 5 anos, para estudos futuros, sendo que você terá a possibilidade de reconsentir a sua participação e a de seu(sua) filho(a) nestes estudos. Caso você não aceite que as amostras sejam armazenadas, as mesmas serão descartadas.

() Aceito que armazenem as amostras coletadas após a análise das mesmas.

() Não aceito que armazenem as amostras coletadas após a análise das mesmas.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Marcelo Zubaran Goldani, pelo telefone **(51) 3359.8019**, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 3359.7640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Tacchini de Bento Gonçalves, pelo telefone (54) 3455.4333.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa (bebê)

Nome do participante da pesquisa (mãe)

Assinatura (mãe)

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO PÓS-PARTO

Data da entrevista: ___ / ___ / ___	GDE ___ / ___ / ___
Entrevistador(a): _____	ENTREV _____
A1) Nome _____ da _____ mãe: _____	
Endereço: _____ _____ () casa () apartamento	
Referência / Como chegar: _____	
Têm planos para se mudar? Se sim, informações do novo endereço _____	
Telefone fixo: _____ ()	
Outros telefones para contato: _____ ()	
Unidade de Saúde (Pré-natal): _____	
E-mail: _____	
DADOS GERAIS DA MÃE	
A2) Qual é sua data de nascimento? ___ / ___ / ___	PNASC ___ / ___ / ___
A3) Cor ou raça da mãe? Declarada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena Observada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena	CORMAED _____ CORMAEO _____
A4) Cor ou raça do pai? Declarada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena Observada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena (8) NSA (9) IGN	CORPAID _____ CORPAIO _____
A5) Qual é a idade do pai da criança? _____ anos completos (777) Não sabe	PIDADE _____
A6) Quantas pessoas moram na sua casa, incluindo a mãe e criança? _____	PPESS _____
A7) Dessas, quantas pessoas são adultas? _____	PPESSA _____
A8) Quantos irmãos você tem ou teve? _____	PIRMA _____
A9) Qual a sua situação conjugal atual? (1) Casada ou mora com companheiro (3) Viúva (2) Solteira, sem companheiro ou separada (4) Divorciada	PCONJU _____
A10) Qual a idade de sua menarca (primeira menstruação)? _____ anos	PMENAR _____
A11) Você já engravidou antes? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A38. (0) Não (1) Sim	PFILHOS _____
SE SIM:	
A12) Número de filhos (incluir o atual)? _____ (88) NSA	PANFIL _____
A13) Número de gestações? _____ (88) NSA	PANGES _____
A14) Número de filhos que não nasceram (abortos)? _____ (88) NSA	PAABORT _____
A15) Algum filho é doente? (0) Não (1) Sim (88) NSA	PAND _____
A16) Se a resposta anterior for positiva, qual a doença? _____ (88) NSA	PANDQ _____

DADOS DO FILHO ANTERIOR:		
A17) Sexo? (0) Feminino (1) Masculino		FSEX1 _____
A18) Data de nascimento? ____ / ____ / ____ (88) NSA		FNASC1 ____ / ____ / ____
A19) Peso ao nascimento? _____ gramas (88) NSA		FAPN1 _____ g
A20) Comprimento ao nascimento? _____ cm (88) NSA		FACN1 _____ cm
A21) Com quantas semanas de gravidez a criança nasceu? ____ (88) NSA		FAM1 _____ semanas
A22) Amamentou seu filho? (0) Não (1) Sim (88) NSA		FAM1 _____
A23) SE SIM, por quanto tempo? _____ meses (88) NSA		AMT1 _____
DADOS DO OUTRO FILHO:		
A24) Sexo? (0) Feminino (1) Masculino		FSEX2 _____
A25) Data de nascimento? ____ / ____ / ____ (88) NSA		FNASC2 ____ / ____ / ____
A26) Peso ao nascimento? _____ gramas (88) NSA		FAPN2 _____ g
A27) Comprimento ao nascimento? _____ cm (88) NSA		FACN2 _____ cm
A28) Com quantas semanas de gravidez a criança nasceu? ____ (88) NSA		FAM2 _____ semanas
A29) Amamentou seu filho? (0) Não (1) Sim (88) NSA		FAM2 _____
A30) SE SIM, por quanto tempo? _____ meses (88) NSA		AMT2 _____
DADOS DO OUTRO FILHO:		
A31) Sexo? (0) Feminino (1) Masculino		FSEX3 _____
A32) Data de nascimento? ____ / ____ / ____ (88) NSA		FNASC3 ____ / ____ / ____
A33) Peso ao nascimento? _____ gramas (88) NSA		FAPN3 _____ g
A34) Comprimento ao nascimento? _____ cm (88) NSA		FACN3 _____ cm
A35) Com quantas semanas de gravidez a criança nasceu? ____ (88) NSA		FAM3 _____ semanas
A36) Amamentou seu filho? (0) Não (1) Sim (88) NSA		FAM3 _____
A37) SE SIM, por quanto tempo? _____ meses (88) NSA		AMT3 _____
A38) Até que ano da escola você estudou? Série? ____ Grau? _____		PESCOL1 _____ PESCOL2 _____
A39) Você sabe ler e escrever? (0) Não (1) Sim		PLER _____
A40) Qual é a sua profissão? _____		PPROF _____
A41) Qual é a sua ocupação? _____		POCUP _____
A42) Você trabalha com carteira assinada atualmente? (0) Não (1) Sim		PCART _____
A43) Até que ano da escola o pai do(a) seu(sua) filho(a) estudou? Série? ____ Grau? _____ (77) Não sabe		PASCOL1 _____ PASCOL2 _____
A44) Qual é a profissão do pai do(a) seu(ua) filho(a)? _____ (7) Não sabe		PAPROF _____
A45) Qual é a ocupação do pai do(a) seu(ua) filho(a)? _____ (7) Não sabe		PAOCUP _____
A46) Ele trabalha com carteira assinada atualmente? (0) Não (1) Sim (2) Está afastado (7) Não sabe		PACART _____
A47) No mês passado, quanto ganharam as pessoas que moram na sua casa? (incluir renda de trabalho, benefícios ou aposentadoria)		
Renda: Pessoa 1: R\$ _____ por mês Pessoa 2: R\$ _____ por mês Pessoa 3: R\$ _____ por mês Pessoa 4: R\$ _____ por mês Pessoa 5: R\$ _____ por mês TOTAL: _____ (77) Não sabe	Benefícios: Pessoa 1: R\$ _____ por mês Pessoa 2: R\$ _____ por mês Pessoa 3: R\$ _____ por mês Pessoa 4: R\$ _____ por mês Pessoa 5: R\$ _____ por mês TOTAL: _____ (77) Não sabe	RDRTOTAL _____ RDBTOTAL _____

A48) Você recebeu indicação para tomar algum SUPLEMENTO de vitamina ou mineral durante a gestação? (exemplos: sulfato ferroso, ácido fólico) <i>SE NÃO ou NÃO SABE PULE PARA QUESTÃO A54.</i> (0) Não (1) Sim		SUPL _____	
SE SIM:			
A49) Qual o suplemento?		SUPLF _____	
- Ferro (0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA		SUPLA _____	
- Ácido Fólico (0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA		SUPLO _____	
- Pré/probiótico (0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA		SUPLP _____	
- Outros, qual(is): _____ (0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA		SUPLQ _____	
A50) Quando iniciou o uso?		SUPLFI _____	
- Ferro (0) Prévio, desde quando? _____ (1) Na gravidez (2) No pós-parto (7) Não sabe (8) NSA		SUPLFP _____	
- Ácido Fólico (0) Prévio, desde quando? _____ (1) Na gravidez (2) No pós-parto (7) Não sabe (8) NSA		SUPLAI _____	
- Pré/probiótico (0) Prévio desde quando? _____ (1) Na gravidez (2) No pós-parto (7) Não sabe (8) NSA		SUPLAP _____	
- Outro (0) Prévio, desde quando? _____ (1) Na gravidez (2) No pós-parto (7) Não sabe (8) NSA		SUPLPI _____	
		SUPLPP _____	
		SUPLOI _____	
		SUPLOP _____	
A51) Se iniciou durante a gestação, com quantas semanas gestacionais?		SUPLFIG _____ semanas	
- Ferro _____ semanas (77) Não sabe (88) NSA		SUPLAIG _____ semanas	
- Ácido Fólico _____ semanas (77) Não sabe (88) NSA		SUPLPIG _____ semanas	
- Pré/probiótico _____ semanas (77) Não sabe (88) NSA		SUPLOIG _____ semanas	
- Outro _____ semanas (77) Não sabe (88) NSA			
A52) Quando terminou o uso, com quantas semanas gestacionais?		SUPLFTG _____ semanas	
- Ferro _____ semanas (66) Não parou na gestação (77) Não sabe (88) NSA		SUPLATG _____ semanas	
- Ácido Fólico _____ semanas (66) Não parou na gestação (77) Não sabe (88) NSA		SUPLPTG _____ semanas	
- Pré/probiótico _____ semanas (66) Não parou na gestação (77) Não sabe (88) NSA		SUPLOTG _____ semanas	
- Outro _____ semanas (66) Não parou na gestação (77) Não sabe (88) NSA			
A53) A suplementação teve interrupção de uso? (0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA		SUPLI _____	
SE SIM:			
A54) Quanto tempo de interrupção? _____ semanas (77) Não sabe (88) NSA		SUPLIT _____ semanas	
A55) Está utilizando algum suplemento atualmente? (0) Não (1) Sim Qual? _____ Vezes por dia: _____		SUPLPP _____	
		SUPLPPQ _____	
		SUPLPPV _____	
A56) Você utilizou algum MEDICAMENTO durante a gestação? (0) Não (1) Sim <i>SE NÃO ou NÃO SABE, PULE PARA QUESTÃO A60.</i>		MEDG _____	
SE SIM:			
A57) Nome?	A58) Motivo?	A59) Início do uso?	MEDGQ1 _____
Med 1 _____	Med 1 _____	Med 1 _____	MEDGM1 _____
Med 2 _____	Med 2 _____	Med 2 _____	MEDGT1 _____
Med 3 _____	Med 3 _____	Med 3 _____	MEDGQ2 _____
Med 4 _____	Med 4 _____	Med 4 _____	MEDGM2 _____
Med 5 _____	Med 5 _____	Med 5 _____	MEDGT2 _____
(88) NSA	(88) NSA	(em meses)	MEDGQ3 _____
		(88) NSA	MEDGM3 _____
			MEDGT3 _____
A60) Você utiliza atualmente algum MEDICAMENTO? (0) Não (1) Sim <i>SE NÃO ou NÃO SABE, PULE PARA QUESTÃO A64.</i>		MED _____	
SE SIM:			
A61) Nome?	A62) Motivo?	A63) Tempo uso?	MEDAQ1 _____
Med 1 _____	Med 1 _____	Med 1 _____	MEDAM1 _____
Med 2 _____	Med 2 _____	Med 2 _____	MEDAT1 _____
Med 3 _____	Med 3 _____	Med 3 _____	MEDAQ2 _____
			MEDAM2 _____

Med 4 _____ Med 5 _____ (88) NSA	Med 4 _____ Med 5 _____	Med 4 _____ Med 5 _____ (em dias)	MEDAT2 _____ MEDAQ3 _____ MEDAM3 _____ MEDAT3 _____
A64) Você teve infecção urinária na gestação? (0) Não (1) Sim			GIU _____
A65) Você teve outras doenças na gestação? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A67.</i> (0) Não (1) Sim			GDO _____
SE SIM:			
A66) Qual(is) doença(s)? _____ (88) NSA			GDOQ _____
A67) Você foi hospitalizada na gestação? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A70.</i> (0) Não (1) Sim			GHOSP _____
SE SIM:			
A68) Quantos dias? _____ (88) NSA			GHOSPD _____ dias
A69) Por qual(is) motivo(s)? _____ (88) NSA			GHOSPM _____
A70) Sua gestação foi planejada? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A75.</i> (0) Não (1) Sim			PLAN _____
SE SIM:			
Intenção ou objetivo de engravidar: (0) Não (1) Sim (8) NSA			PLAN1 _____
Cessaçãõ de método anticoncepcional: (0) Não (1) Sim (8) NSA			PLAN2 _____
Concordância do parceiro: (0) Não (1) Sim (8) NSA			PLAN3 _____
Momento adequado com relação a estilo/estágio de vida: (0) Não (1) Sim (8) NSA			PLAN4 _____
A71) Você já fumou ou fuma cigarros de tabaco? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A72.</i> (0) Não, nunca fumou (1) Sim, já fumou (2) Sim, fuma atualmente			TAB _____
DADOS DA ALIMENTAÇÃO DA MÃE			
A72) Você já recebeu alguma orientação de como se alimentar? (0) Não (1) Sim <i>SE NÃO PULE PARA A QUESTÃO A75.</i>			PORI _____
SE SIM:			
A73) Essa orientação ocorreu: (1) Antes de engravidar (2) Durante a gestação (3) opções 1 e 2 (8) NSA			PORIM _____
A74) De quem recebeu a orientação? _____ (8) NSA			PORIQ _____
DADOS GERAIS DA CRIANÇA			
A75) A criança já tem nome? <i>SE NÃO PULE PARA A QUESTÃO A93.</i> (0) Não (1) Sim			CRNOME _____
SE SIM:			
A76) Qual o nome da criança? _____ (88) NSA			NOMECR _____
A77) Sexo? (0) Feminino (1) Masculino			CSEX _____
A78) Data de nascimento? ____/____/____			CRDN ____/____/____
A79) Número da Declaração de Nascido Vivo (DN)? _____			NUDN _____
A80) Peso ao nascer? _____ gramas			PESOCR _____ g
A81) Comprimento ao nascer? _____ cm			COMPCR _____ cm
A82) Perímetro cefálico? _____ cm			PCCR _____ cm
A83) Apgar1? _____			APGAR1 _____
A84) Apgar5? _____			APGAR5 _____
A85) Tipo de parto? (1) Cesárea (2) Vaginal (3) Fórceps			CTPART _____
A86) Teve mecônio (prontuário)? (0) Não (1) Sim (6) Não tem no prontuário			MECO _____
A87) Hora que a criança nasceu? _____			HRNASC _____

A88) A criança mamou no primeiro dia de vida? (0) Não (1) Sim		MAMOD1 _____
SE NÃO MAMOU NO PEITO:		
A89) O que recebeu? (0) Solução glicosada via oral (1) Soro glicosado endovenoso (2) Fórmula 1º Semestre (3) Outro, qual? _____ (7) Não sabe (8) NSA		MAMO _____ MAMOQ _____
A90) Quantos minutos após nascer a criança mamou no peito pela primeira vez? _____ minutos (5555) mamou após 1º dia (8888) NSA		HRMAMO _____
A100) Peso de nascimento da mãe? _____ gramas (7777) Não sabe		PNM _____ g
A101) Qual era seu peso antes de engravidar? _____ kg (7777) Não sabe		PESOAG _____ kg
A102) Qual foi seu peso no final do 1º trimestre? _____ kg (7777) Não		PESO1T _____ kg
A103) Qual foi seu peso no final do 2º trimestre? _____ kg (7777) Não sabe		PESO2T _____
A104) Qual era o peso antes do parto? _____ kg (7777) Não sabe		PESOAP _____ kg
A105) Qual era a altura antes do parto? _____ cm (7777) Não sabe		ASLTAP _____ cm
A106) Data da última menstruação? ____/____/____ (66) Não tem na carteirinha		DUM ____/____/____
A107) Ecografias: peso e comprimento fetal aproximado (prontuário) 1º Peso: _____ gramas 2º Peso: _____ 3º Peso: _____ 1º Comprimento: _____ cm 2º Compr.: _____ cm 3º Compr.: _____ cm Data Eco 1º TRI: ____/____/____ Data Eco 2º TRI: ____/____/____ Data Eco 3º TRI: ____/____/____ 1º IG: _____ 2º IG: _____ 3º IG: _____ (8) NSA (8) NSA (8) NSA		ECOP1 _____ g ECOC1 _____ cm ECOD1 ____/____/____ ECOIG1 _____ ECOP2 _____ g ECOC2 _____ cm ECOD2 ____/____/____ ECOIG2 _____ ECOP3 _____ g ECOC3 _____ cm ECOD3 ____/____/____ ECOIG3 _____
A108) Peso da placenta (prontuário)? _____ gramas (66) Não tem esse dado		PESOPL _____ g
A109) Data da primeira consulta do pré-natal? ____/____/____ IG: _____ (66) Não tem na carteirinha		PCPN ____/____/____ PCPNIG _____
A110) Data da última consulta do pré-natal? ____/____/____ IG: _____ (66) Não tem na carteirinha		UCPN ____/____/____ UCPNIG _____
A111) Número de consultas pré-natais? _____ (66) Não tem na carteirinha		NCPN _____
A112) Primeiro nível de PAS e PAD aferido em consulta pré-natal? _____ mmHg x _____ mmHg (66) Não tem na carteirinha Data: ____/____/____ IG: _____		PPASPN _____ PPADPN _____ DPPA ____/____/____ IGPPA _____
A113) Último nível de PAS e PAD aferido em consulta pré-natal? _____ mmHg x _____ mmHg (66) Não tem na carteirinha Data: ____/____/____ IG: _____		UPASPN _____ UPADPN _____ DUPA ____/____/____ IGUPA _____
EXAMES LABORATORIAIS DA MÃE		
A114) Últimos exames laboratoriais (prontuário e carteira da gestante)? Tipo sanguíneo da mãe _____ Fator Rh _____ Hematócrito _____ % Hemoglobina _____ g/dl Eritrócito _____ milhões/ul Leucócitos Totais _____ Plaquetas _____ ul Tempo de Tromboplastina Parcial _____ s Tempo de Protrombina _____ s RNI _____ VDRL _____ (0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo HBSAg _____ (0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo		SABO _____ FRH _____ HEMT _____ HEMG _____ ERIT _____ LEUT _____ PLAQ _____ TTP _____ TP _____ RNI _____

Toxoplasmose IgM	(0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo	VDR _____
Toxoplasmose IgG	(0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo	VHB _____
Rubéola	(0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo	TOXOM _____
Citomegalovirose	(0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo	TOXOG _____
Glicose em jejum _____	mg/dl do primeiro trimestre	RUB _____
Glicose em jejum _____	mg/dl do segundo trimestre	CMV _____
Glicose em jejum _____	mg/dl do terceiro trimestre	GLI1 _____
TTG 75g (jejum) _____	mg/dl	GLI2 _____
TTG (2h após) _____	mg/dl	GLI3 _____
Colesterol HDL _____	mg/dl	TTG1 _____
Colesterol LDL _____	mg/dl	TTG2 _____
Triglicerídeos _____	mg/dl	HDL _____
Colesterol Total _____	mg/dl	LDL _____
Aspartato-aminotransferase (TGO) _____	U/L	TRIG _____
Transaminase glutâmica pirúvica (TGP) _____	U/L	COLT _____
Bilirrubina Total _____	mg/dl	TGO _____
Ferritina _____	ng/ml	TGP _____
Ácido Fólico _____	ng/dl	BILIT _____
T4 _____	mcg/100ml	FERR _____
TSH _____	microUI/ml	ACFO _____
Creatinina _____	mg/dl	T4 _____
Uréia _____	mg/dl	TSH _____
Exame qualitativo de urina	(0) Não realizou (1) Realizou	CREA _____
Urocultura	(0) Negativa (1) Positivo	UREIA _____
Parasitológico de fezes	(0) Negativo (1) Positivo	EQU _____
Citopatológico - Colo do Útero	(0) Negativo (1) Positivo	URO _____
Hemoglobina glicada _____		ECF _____
		CP _____
		HBGLIC _____

CONDIÇÕES DE HABITAÇÃO

A115) De qual material a maioria das paredes de sua moradia é constituída? (0) Tijolo (1) Tábua (madeira) ou taipa (2) Concreto ou cimento (3) Outro Qual? _____	MATPAR _____
A116) De qual material a maioria do piso de sua moradia é constituído? (0) Cerâmica ou cimento (1) Tábua (madeira) (2) Terra ou barro (3) Carpete (4) Outro Qual? _____	MATPISO _____
A117) Na sua casa tem manchas de umidade na parede ou no teto? (0) Não (1) Sim	MOFO _____
A118) De onde vem a água usada na sua habitação? (0) Canalização interna (1) Ponto de água externo (2) Outro Qual? _____	AGUAHAB _____
A119) Na sua casa tem encanação para esgoto? (0) Não (1) Sim	ESGHAB _____
A120) Onde está situado o banheiro que é utilizado por você e pelas pessoas da sua casa? (0) Dentro de casa (1) Fora de casa	BANHAB _____
COLETA DE MATERIAIS	
A121) Conseguiu realizar a coleta de saliva da mãe? (0) Não, motivo? _____ (1) Sim	SALIVM _____

A122) Conseguiu realizar a coleta de fezes da mãe? (0) Não, motivo? _____ (1) Sim	FEZM _____
A123) Conseguiu realizar a coleta de leite da mãe? (0) Não, motivo? _____ (1) Sim	LEITEM _____
A124) Conseguiu realizar a coleta de saliva da criança? (0) Não, motivo? _____ (1) Sim	SALIVC _____
A125) Conseguiu realizar a coleta de fezes da criança? (0) Não, motivo? _____ (1) Sim	FEZC _____

CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO ECONÔMICA BRASIL ABIPEME (ABEP, 2015)

Data da entrevista: ____ / ____ / ____	GDE __ / __ / __
Entrevistador: _____	ENTREV _____

Abaixo, marcar um X sobre o número de itens de cada eletrodoméstico existente na casa em que a gestante mora:

Posse de itens:

Itens	Não tem	Quantidade de itens			
		1	2	3	4 ou +
Banheiros	0	3	7	10	14
Empregados domésticos	0	3	7	10	13
Automóveis	0	3	5	8	11
Microcomputador	0	3	6	8	11
Lava louça	0	3	6	6	6
Geladeira	0	2	3	5	5
Freezer	0	2	4	6	6
Lava roupa	0	2	4	6	6
DVD	0	1	3	4	6
Micro-ondas	0	2	4	4	4
Motocicleta	0	1	3	3	3
Secadora de roupa	0	2	2	2	2

Grau de instrução do chefe da família e acesso a serviços públicos:

Escolaridade da pessoa de referência	Pontos	
Analfabeto/Fundamental I incompleto	0	
Fundamental I completo / Fundamental II incompleto	1	
Fundamental II completo / Médio incompleto	2	
Médio completo / Superior incompleto	4	
Superior completo	7	
Serviços públicos		
	Sim	Não
Água encanada	4	0
Rua pavimentada	2	0

TOTAL DE PONTOS: _____

ANEXO A - QUESTIONÁRIO DE ATIVIDADE FÍSICA NA GESTAÇÃO

Data da entrevista: ___ / ___ / ___	GDE ___ / ___ / ___
Entrevistador: _____	ENTREV _____
ATIVIDADE FÍSICA	
<p><i>Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física DURANTE A GESTAÇÃO. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são MUITO importantes. Por favor, responda cada questão mesmo que você não se considere ativo. Para responder as questões lembre que:</i></p>	
<p>1) Em quantos dias da última semana você CAMINHOU por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício? Dias _____ por SEMANA (0) Nenhum (PULE PARA A QUESTÃO 3).</p>	CAMSE ____
<p>2) Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando por dia? Horas: _____ Minutos: _____ (88) NSA</p>	TEMPCA ____ min
<p>Atividades físicas MODERADAS são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal</p>	
<p>3) Em quantos dias da gestação, você realizou atividades MODERADAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA)? _____ dias por SEMANA (0) Nenhum (PULE PARA A QUESTÃO 5).</p>	ATMODSE ____
<p>4) Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia? Horas: _____ Minutos: _____ (88) NSA</p>	TMMOD ____ min
<p>Atividades físicas VIGOROSAS são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal.</p>	
<p>5) Em quantos dias da gestação, você realizou atividades VIGOROSAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar MUITO sua respiração ou batimentos do coração. _____ dias por SEMANA (0) Nenhum (PULE PARA A QUESTÃO 7).</p>	ATVIGSE ____
<p>6) Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia? Horas: _____ Minutos: _____ (88) NSA</p>	TEMPVI ____ min
<p>7) Se você tivesse oportunidade de fazer atividade física na maioria dos dias da semana, qual seria a sua atitude? (1) Não faria mesmo assim (2) Faria atividade física na maioria dos dias da semana (3) Já faço atividade física na maioria dos dias da semana</p>	OPOATI ____

ANEXO B - QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Data da entrevista: ___/___/___	GDE ___/___/___
Entrevistador(a): _____	ENTREV _____
Nome da mãe: _____	

QUESTIONÁRIO DE FREQUENCIA ALIMENTAR

Primeiro pergunte: com que frequência você tem comido “nome do alimento”? Caso ela refira consumir o alimento, perguntar: Quantas “ler a medida caseira”? A cada 4 ou 5 alimentos lembrar a puérpera que o questionário se refere a alimentação durante toda a gestação.

Alimento	Quantidade consumida por vez	(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3x/ dia	(3) 1x/ dia	(4) 5 a 6x/ sem.	(5) 2 a 4x/ sem.	(6) 1x/ sem.	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca	
1. Arroz branco	() colher sopa cheia									QFA1Q ___ QFA1F ___
2. Arroz integral	() colher sopa cheia									QFA2Q ___ QFA2F ___
3. Feijão	() concha média									QFA3Q ___ QFA3F ___
4. Macarrão	() escumadeira cheia ou pegador									QFA4Q ___ QFA4F ___
5. Macarrão integral	() escumadeira cheia ou pegador									QFA5Q ___ QFA5F ___
6. Farinha de mandioca	() colher sopa									QFA6Q ___ QFA6F ___
7. Pão cacetinho ou fatiado	() francês/ 2 fatias pão forma									QFA7Q ___ QFA7F ___
8. Pão integral ou centeio	() fatia									QFA8Q ___ QFA8F ___
9. Pão caseiro	() fatia									QFA9Q ___ QFA9F ___
10. Biscoito doce	() unidade									QFA10Q ___ QFA10F ___
11. Bolos ouucas	() fatias									QFA11Q ___ QFA11F ___
12. Biscoito salgado	() pacote									QFA12Q ___ QFA12F ___
13. Polenta	() pedaço									QFA13Q ___ QFA13F ___
14. Batata frita ou chips	() porção pequena									QFA14Q ___ QFA14F ___
15. Batata cozida	() unidade									QFA15Q ___ QFA15F ___
16. Mandioca, aipim	() pedaço									QFA16Q ___ QFA16F ___
17. Milho verde	() 1 espiga = 4 colher sopa									QFA17Q ___ QFA17F ___
18. Pipoca	() saco									QFA18Q ___ QFA18F ___
19. Lentilha ou ervilha ou grão de bico	() colher sopa									QFA19Q ___ QFA19F ___
20. Alface	() folha									QFA20Q ___ QFA20F ___

											QFA52F
53. Iogurte Normal	() unidade										QFA53Q ___ QFA53F ___
Alimento	Quantidade consumida por vez	(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3x/dia	(3) 1x/dia	(4) 5 a 6x/sem.	(5) 2 a 4x/sem.	(6) 1x/sem.	(7) 1 a 3x/mês	(8) Nunca ou quase nunca		
54. Iogurte light	() unidade										QFA54Q ___ QFA54F ___
55. Queijo	() fatia média										QFA55Q ___ QFA55F ___
56. Requeijão	Só frequência.										QFA56F ___
57. Manteiga	Só frequência.										QFA57F ___
58. Margarina	Só frequência.										QFA58F ___
59. Vísceras: fígado, coração, bucho	() pedaço										QFA59Q ___ QFA59F ___
60. Carne de boi sem osso	() 1 bife médio = 4 colheres sopa moída ou 2 pedaços										QFA60Q ___ QFA60F ___
61. Carne de boi com osso	() pedaço										QFA61Q ___ QFA61F ___
62. Carne porco	() pedaço										QFA62Q ___ QFA62F ___
63. Frango	() pedaço										QFA63Q ___ QFA63F ___
64. Salsicha/linguiça	() unidade ou gomo										QFA64Q ___ QFA64F ___
65. Peixe fresco branco (merluza, pescada, corvina) Qual? _____ Preparo? _____	() filé ou posta										QFA65 ___ QFA65P ___ QFA65Q ___ QFA65F ___
66. Peixe fresco oleoso (salmão, atum, sardinha) Qual? _____ Preparo? _____	() filé ou posta										QFA66 ___ QFA66P ___ QFA66Q ___ QFA66F ___
67. Atum enlatado	() latas										QFA67Q ___ QFA67F ___
68. Sardinha enlatada	() latas										QFA68Q ___ QFA68F ___
69. Hambúrguer	() unidades										QFA69Q ___ QFA69F ___
70. Pizza	() pedaço										QFA70Q ___ QFA70F ___
71. Camarão	() unidade										QFA71Q ___ QFA71F ___
72. Bacon/toucinho	() fatia										QFA72Q ___ QFA72F ___
73. Maionese	() colher chá										QFA73Q ___ QFA73F ___
74. Salgados: kibe, pastel	() unidades										QFA74Q ___ QFA74F ___
75. Salgadinhos	() pacote										QFA75Q ___ QFA75F ___
76. Sorvete	() unidades										QFA76Q ___ QFA76F ___
77. Açúcar	() colher sobremesa										QFA77Q ___ QFA77F ___
78. Caramelos, balas	Só frequência.										QFA78F ___
79. Chocolate pó/Nescau	() colher sobremesa										QFA79Q ___ QFA79F ___

80. Chocolate barra/Bombom	() 1 pequeno ou 2 bombons										QFA80Q ____ QFA80F ____
Alimento	Quantidade consumida por vez	(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3x/dia	(3) 1x/dia	(4) 5 a 6x/sem.	(5) 2 a 4x/sem.	(6) 1x/sem.	(7) 1 a 3x/mês	(8) Nunca ou quase nunca		
81. Pudim	() pedaço										QFA81Q ____ QFA81F ____
82. Doce de leite/Geleia	() colher sobremesa										QFA82Q ____ QFA82F ____
83. Refrigerante normal	() copo										QFA83Q ____ QFA83F ____
84. Refrigerante light	() copo										QFA84Q ____ QFA84F ____
85. Café	() xícara										QFA85Q ____ QFA85F ____
86. Suco natural	() copo										QFA86Q ____ QFA86F ____
87. Suco artificial (pó)	() copo										QFA87Q ____ QFA87F ____
88. Vinho	() copo										QFA88Q ____ QFA88F ____
89. Cerveja	() copo										QFA89Q ____ QFA89F ____
90. Outras bebidas alcoólicas	() dose										QFA90Q ____ QFA90F ____
91. Óleo utilizado para temperar saladas Qual?	() colher de sopa										QFA91T ____ QFA91Q ____ QFA91F ____
92. Óleo utilizado para cozinhar Qual?	() colher de sopa										QFA92T ____ QFA92Q ____ QFA92F ____
93. Banha de porco	() colher de sopa										QFA93Q ____ QFA93F ____
94. Adoçante gotas/pó Marca? _____	() gotas () envelope										QFA94M ____ QFA94Q ____ QFA94F ____
95. Linhaça	() colher de sopa rasa										QFA95Q ____ QFA95F ____
96. Oleaginosas (castanhas, nozes, amendoim) Qual? _____	() punhado										QFA96Q ____ QFA96F ____ QFA96T ____

Alimentos não mencionados:

Existe algum alimento que habitualmente era consumido por você durante a gestação e não foi mencionado?

Alimento	Quantidade consumida por vez	(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3 x /dia	(3) 1 x /dia	(4) 5 a 6 x/ semana	(5) 2 a 4 x/ semana	(6) 1 x/ semana	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca	
97. Cápsula de óleo Qual? _____ Dosagem? _____										QFA97Q ____ QFA96D ____ QFA96F ____
98. _____										QFA98A ____ QFA98Q ____ QFA98F ____
99. _____										QFA99A ____ QFA99Q ____ QFA99F ____

Questões adicionais:

100. Quanto tempo dura 1 pacote de sal (1kg)? _____ dias.									QFA100CD ____
101. Qual é seu consumo mensal de óleo? _____ litros. Qual óleo? _____									QFA101CD ____
102. Qual é o seu consumo mensal de banha de porco? _____ Kg.									QFA102CD ____
103. Com que frequência você costumava comer VERDURAS e LEGUMES crus, cozidos ou refogados, sem incluir batatas, mandioca/aipim, inhame e cará?									QFA103 ____
(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3 x /dia	(3) 1 x /dia	(4) 5 a 6 x/ semana	(5) 2 a 4 x/ semana	(6) 1 x/ semana	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca		
104. Com que frequência você costumava comer FRUTAS , sem incluir sucos de frutas?									QFA104 ____
(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3 x /dia	(3) 1 x /dia	(4) 5 a 6 x/ semana	(5) 2 a 4 x/ semana	(6) 1 x/ semana	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca		
105. Com que frequência você costuma comer FAST FOOD (pizza, quibe, coxinha, hambúrguer)?									QFA105 ____
(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3 x /dia	(3) 1 x /dia	(4) 5 a 6 x/ semana	(5) 2 a 4 x/ semana	(6) 1 x/ semana	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca		