

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ANA CAROLINA TERRAZZAN

**CRESCIMENTO DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS BAIXO PESO E A
POSSÍVEL RELAÇÃO COM A MICROBIOTA DO MECÔNIO**

Porto Alegre

2019

ANA CAROLINA TERRAZZAN

**CRESCIMENTO DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS BAIXO PESO E A
POSSÍVEL RELAÇÃO COM A MICROBIOTA DO MECÔNIO**

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

Orientadora: Professora Dra Rita de Cássia Silveira

Coorientador: Professor Dr Renato Procianoy

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Terrazzan, Ana Carolina
CRESCIMENTO DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS BAIXO PESO
E A POSSÍVEL RELAÇÃO COM A MICROBIOTA DO MECÔNIO / Ana
Carolina Terrazzan. -- 2019.
138 f.
Orientador: Rita de Cássia Silveira.

Coorientador: Renato Soibermann Procianoy.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Prematuridade. 2. Microbioma. 3. Mecônio. 4.
Recém-Nascido. 5. Prega Cutânea. I. Silveira, Rita de
Cássia, orient. II. Procianoy, Renato Soibermann,
coorient. III. Título.

ANA CAROLINA TERRAZZAN

**CRESCIMENTO DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS BAIXO PESO E A
POSSÍVEL RELAÇÃO COM A MICROBIOTA DO MECÔNIO**

A apresentação desta tese é requisito parcial para título de doutorado Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade
Orientadora: Professora Dra Rita de Cássia Silveira
Coorientador: Professor Dr Renato Procianoy

Porto Alegre, 21 de Março de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Professora Dra Franceliane Jobim Benedetti

Universidade Franciscana de Santa Maria (RS)

Professora Dra Cristina Helena Targa Ferreira

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Professora Dra Juliana Rombaldi Bernardi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu filho, Luiz Eduardo,
que por tantas vezes não teve minha
presença, meu abraço, meu “boa noite”, e
ainda assim continua demonstrando seu
amor incondicional, sempre com brilho no
olhar e o sorriso no rosto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Dra. Rita de Cássia Silveira e Dr. Renato Procianoy, pelos ensinamentos e confiança a mim depositados. Vocês são parte muito importante na minha trajetória profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de crescimento e qualificação profissional.

Aos membros da Banca Examinadora pela disponibilidade e por compartilharem comigo seus conhecimentos.

Aos pacientes e familiares que aceitaram participar deste trabalho.

À equipe multiprofissional do Centro Obstétrico e Neonatologia responsável pela coleta, processamento e armazenamento do mecônio.

Ao Professor Luiz Fernando Roesch e sua equipe, pelas análises da microbiota.

À equipe do Ambulatório de Follow up HCPA, minha eterna admiração. Obrigada por compartilharem comigo muitas manhãs nos últimos anos

Às secretarias Eliane Rosa e Rosane Blanguer, sempre prestativas e atenciosas, muito obrigada.

Barbara Riboldi e Vânia Naomi Hirakata muito obrigada pelas consultorias estatísticas

Agradeço à todas as minhas amigas, que entenderam minhas ausências, mas também foram essenciais para os momentos de descontração e apoio.

Agradeço à família. Aos meus pais, Eduardo e Derli, por serem a inspiração para que eu continue buscando novos desafios. Felipe, meu irmão, que mesmo longe se faz presente nos momentos mais importantes.

Ao meu marido, Luiz Alberto, pelo carinho e pelo incansável incentivo nos últimos anos. Obrigada por ser meu porto seguro.

Ao meu filho, Luiz Eduardo, por ser a criança mais compreensiva, amorosa e carinhosa. Com certeza você é a força que me move.

RESUMO

Introdução: A microbiota intestinal desempenha um papel benéfico na formação e desenvolvimento do hospedeiro. Prematuros estão propensos à disbiose desde o período intrauterino e esta predispõe o neonato a morbidades relevantes. **Objetivos:** Artigo 1: Verificar se há associação entre a composição da microbiota do mecônio e adequação do peso para idade gestacional e momento de *catch up* do perímetro cefálico. Artigo 2: Comparar crescimento e adiposidade de crianças nascidas prematuras de baixo peso à de crianças nascidas a termo, no primeiro ano de vida. **Materiais e Métodos:** Estudo de acompanhamento e avaliação nutricional de crianças prematuras de baixo peso (grupo caso) e crianças nascidas a termo, saudáveis (grupo controle). Ambos os grupos estavam incluídos no estudo Associação entre microbiota fetal, prematuridade e morbidades do recém-nascido pré-termo (aceito no CEP nº40009), no qual, foram feitas coletas de mecônio para sequenciamento genético do microbioma. Ao término da coleta de dados para o projeto supracitado, os participantes foram convidados a participar do projeto de seguimento intitulado influência da microbiota intestinal no período perinatal no crescimento de crianças prematuras de baixo peso (aceito no CEP nº1.1139.066). O presente estudo trata de uma coorte prospectiva, com prematuros baixo peso e um grupo de recém-nascidos a termo, saudáveis. Avaliados peso, comprimento, perímetro cefálico, perímetro braquial, dobra cutânea tricipital e subescapular, os respectivos escores-z. O banco de dados do microbioma foi utilizado em combinação ao banco de dados antropométricos. Excluídas crianças com malformações e erros inatos do metabolismo, filhos de mãe HIV+. **Resultados:** Acompanhados 63 prematuros, sendo 30 (47,6%) meninos, com idade gestacional média de $30 \pm 2,3$ semanas. Grupo controle composto por 29 nascidos a termo, sendo 15 (51,7%) meninos com idade gestacional média $39,5 \pm 1,2$. Polinucleobacter ($p=0,0163$), Gp1 ($p=0,018$) e Prevotella ($p=0,038$) apareceram em maior abundância no mecônio de prematuros com peso adequado para idade gestacional ao nascer. Salmonellala ($p<0,001$), Flavobacterium ($p = 0,026$) e Burkholderia ($p = 0,026$) eram mais abundantes em mecônio no grupo de recém-nascidos prematuros que alcançaram o *catch up* até o 6º mês de idade corrigida. Não houve diferença significativa para as variáveis antropométricas aos 2 e 4 meses. Aos 10 meses menores para peso ($p=0,004$), comprimento ($p<0,001$) e perímetro cefálico ($p=0,002$), e, aos 12 meses menores em comprimento ($p=0,041$), perímetro cefálico ($p=0,0021$) e dobra cutânea tricipital ($p=0,025$). Dobra cutânea tricipital apresentou correlação positiva com peso, dobra cutânea subescapular e perímetro braquial e seus respectivos escores-z aos 12 meses em ambos os grupos. Conclusão: Crianças nascidas prematuras apresentam padrão de crescimento diferente daqueles nascidos a termo, IMC e dobra cutânea tricipital se mostraram úteis para serem utilizados na avaliação do padrão de crescimento de prematuros. A abundância de unidades operacionais taxonômicas no mecônio difere entre crianças que atingem o perímetro cefálico até o sexto mês de idade corrigida ou após esse período.

Palavras-chave: Prematuridade. Adiposidade. Crescimento. Antropometria. Criança. Prega cutânea. Mecônio. Microbioma. Recém-nascido

ABSTRACT

Introduction: The microbiome is a determining factor for proper growth and development. Early in life, the intestinal microbiota plays a beneficial role. Premature infants are prone to dysbiosis since the intrauterine period, and this predisposes the neonate to relevant morbidities. **AIM:** Paper 1: Investigate if there is an association between the composition of the meconium microbiota and the adequacy of weight for gestational age and the moment of catch up moment for head circumference. Paper 2: Perform anthropometric assessment, compare growth and adiposity of children born prematurely with low weight to children born at term, healthy during the first year of life. **Materials and Methods:** Prospective cohort study with preterm infants low birth weight and a control group of healthy, term infants. Conducted 16S rRNA sequencing using PGM Ion Torrent in fecal samples from the first feces (meconium) of preterm infants for microbiota analysis. Measured weight, length, head circumference, tricipital and subscapular skinfold thickness, the respective z-scores, and calculated BMI at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months of. Excluded children with malformations and inborn errors of metabolism. Statistical analysis included frequency analysis, Student t test, Chi Square and Pearson correlation. Level of significance $p < 0.005$. Approved by the institution's ethics committee. **Results:** A total of 63 premature infants were followed up, being 30 (47.6%) boys with mean gestational age 30 ± 2.3 weeks. The control group consisted of 29 full-term newborns, 15 (51.7%) boys with mean gestational age 39.5 ± 1.2 . Polynucleobacter ($p = 0.0163$), Gp1 ($p = 0.018$) and Prevotella ($p = 0.038$) appeared in greater abundance in meconium of premature infants with adequate birth weight for GA. Salmonellala ($p < 0.001$), Flavobacterium ($p = 0.026$) and Burkholderia ($p = 0.026$) were found to be more abundant in meconium in the group of newborns who achieve catch up until the 6th month of corrected age. There was no significant difference for the anthropometric variables at 2 and 4 months. At 6 and 8 months preterm infants were shorter in length. At 10 months preterm infants were smaller for weight ($p = 0.004$), length ($p < 0.001$) and head circumference ($p = 0.002$). At 12 months preterm infants had a shorter length ($p = 0.041$ head circumference ($p = 0.0021$) and triceps skin fold ($p = 0.025$). Tricipital skinfold presented positive correlation with weight, subscapular skinfold and brachial perimeter and their respective z-scores at 12 months for premature and full term. **Conclusion:** Children born prematurely do not achieve growth equivalent to full-term infants even when assessed with corrected age. BMI and tricipital skinfold are valid for the assessment of preterm infants. Microbial abundance of meconium seems to be related to adequacy of birth weight for GA and weight evolution in the perinatal period in preterm infants. Abundance of taxonomic operational units on meconium differs between children who achieve head circumference catch up until the sixth month of corrected age or after this period.

Keywords: Prematurity. Adiposity. Growth. Anthropometry. Infant. Skinfold. Meconium. Microbiome. Newborn.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tese

Figura 1– Organograma – logística de coleta de dados.....44

Artigo 1

Figura 2 - Figure 1 – Alpha diversity measurements of meconium microbial communities from preterm infants comparing weight adequacy at birth and at discharge.....88

Figura 3- Figure 2 – Relative phyla abundance of the gut microbiota according with weigh adequacy.89

Figura 4 - Figure 3 – Differential abundance analysis according to weight adequacy90

Figura 5 - Figure 4 – Alpha diversity measurements of meconium microbial communities from preterm infants comparing head circumference (HC) catch up until or after 6 months of corrected age.91

Figura 6 - Figure 5 – Differential abundance analysis according to head circumference catch up92

Figura 7 - Figure 6 – Microbial community functional prediction.....93

Figura 8 - S1_Fig. Microbial community functional prediction94

Artigo 2

Figura 9 - Figure1. Age of introduction of complementary feeding for preterm and term infants.....121

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 - Table 1. Clinical characteristics of preterm infants according to adequacy of weight for gestational age at birth and discharge71

Tabela 2 - Table 2. Clinical characteristics, growth and type of milk received according to catch-up before or after 6 months of corrected age74

Tabela 3 - Table 3. Nonparametric Multivariate Analysis of Variance of bacterial community structure used for controlling confounding variables76

Artigo 2

Tabela 4 - Table 1 - Sample characterization (n=92) 116

Tabela 5 -Table 2 - Comparison between anthropometric data from birth to 12 months for preterm infants and full-term infants 117

Tabela 6 - Table 3 - Food consumption markers ate 12 months of age 120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana e Pediatria
AGA	Appropriate-for-Gestational
AIG	Adequado Para Idade Gestacional
BM	Breast Milk
BW	Birth weight
C	Comprimento
CA	Corrected Age
CP	Cephalic perimeter
DCSE	Dobra Cutânea Subescapular
DCT	Dobra Cutânea Tricipital
DMG	Diabetes Gestacional
EBM	Exclusive Breast Milk
GA	Gestational Age
GALT	Tecido Linfático Associado ao Intestino
GDM	Gestational Diabetes Mellitus
GIG	Grande Para Idade Gestacional
HMO	Oligossacarídeos do Leite Humano
IG	Idade Gestacional
IMC	Índice De Massa Corporal
ITU	Infecção Trato Urinário
L	Length
OMS	Organização Mundial Da Saúde
P	Peso
PC	Perímetro Cefálico
PEG	Pré-eclâmpsia
PIG	Pequeno Para Idade Gestacional
RN	Recém-nascido
RNPT	Recém-nascido a termo
SGA	Small-for-gestational-age
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UTI	Urinary Tract Infection

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 PREMATURIDADE	16
2.2 CRESCIMENTO DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS	18
2.2.1 Peso	22
2.2.2 Índice de massa corporal	23
2.2.3 Dobra cutânea	24
2.2.4 Comprimento	25
2.2.5 Perímetro cefálico	26
2.3 MICROBIOTAINTESTINAL	26
2.4 MICROBIOTA INTESTINAL E PREMATURIDADE	31
3 JUSTIFICATIVA	37
4 HIPÓTESE	39
5 OBJETIVOS	40
6 METODOLOGIA	41
6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	41
6.2 PERÍODO DE COLETA DE DADOS	41
6.3 POPULAÇÃO	41
6.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	41
6.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	42
6.6 LOGÍSTICA	42
6.6.1 Grupo casos – recém-nascidos prematuros	42
6.6.2 Grupo controle – recém-nascidos a termo	43
6.7 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES A SEREM REALIZADAS E COLETA DE DADOS	45
6.7.1 Avaliação nutricional	45
6.7.2 Variáveis- alimentação (complementares ao estudo; fazem parte da rotina do Ambulatório de Follow Up)	46
6.7.3 Variáveis em estudo – para caracterização da amostra	46
6.7.4 Coleta mecônio	47
6.7.5 Técnica para extração do DNA	48

6.7.6 Amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento.....	48
6.7.7 Comparação entre as comunidades microbianas.....	50
6.7.8 Identificação dos microrganismos responsáveis pela variação entre as amostras	51
6.7.9 Classificação filogenética das sequências do gene 16S	52
6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
6.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	54
7 REFERÊNCIAS.....	55
8 RESULTADOS.....	64
8.1 ARTIGO 1 - MECONIUM MICROBIOME AND ITS RELATION TO NEONATAL GROWTH AND HEAD CIRCUMFERENCE CATCH-UP IN LOW-BIRTH WEIGHT PRETERM INFANTS	64
8.2 ARTIGO 2 - POSTNATAL GROWTH STATUS AND FEEDING PATTERN FOR PRETERM AND HEALTHY FULL-TERM INFANTS DURING FIRST YEAR OF CORRECTED AGE	95
9 CONCLUSÕES	122
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
APÊNDICE A - PROTOCOLO DE REGISTRO DE DADOS RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS.....	125
APÊNDICE B - PROTOCOLO DE REGISTRO DE DADOS RECÉM-NASCIDOS A TERMO	127
APÊNDICE C – TCLE GRUPO PREMATUROS	129
APÊNDICE D – TCLE GRUPO CONTROLE.....	132
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	135

1 INTRODUÇÃO

A prematuridade é um dos principais determinantes da mortalidade e morbidade neonatal, tendo consequências diversas que podem ser expressas a curto, médio e longo prazo. Crianças nascidas prematuras têm taxas mais altas de paralisia cerebral, déficits sensoriais e de aprendizagem; bem como têm maiores chances de atraso no crescimento, alterações metabólicas e maior propensão ao desenvolvimento de doenças crônicas quando comparadas às crianças nascidas a termo (RUGOLO, 2005; SALT E REDSHAW, 2006; BARKER, 2007; GREER, 2007; BECK, 2010).

O crescimento é um dos melhores índices para saúde infantil. Em especial, monitorar o crescimento do prematuro, que apresenta imaturidade fisiológica associada às necessidades nutricionais aumentadas é fundamental para identificar seu prognóstico, no sentido de alcançar uma vida saudável e semelhante aos demais (SILVEIRA; PROCIANOY, 2010). Os determinantes para crescimento e desenvolvimento adequados são multifatoriais, permeando pelas adversidades da prematuridade, genética e nutrição adequada (SILVEIRA; PROCIANOY, 2018; VOGEL *et al.*, 2018).

Para a monitorização do crescimento, as medidas antropométricas são de grande valia. Dentre todas as medidas antropométricas, o perímetro cefálico após a alta hospitalar tem sido considerado como o melhor preditor independente para desfechos cognitivos em prematuros (LIDZBA, *et al.*, 2016). Além disso, a relevância em observar a evolução do comprimento tem chamado a atenção, uma vez que esta medida também foi associada ao melhor neurodesenvolvimento (SIMON *et al.*, 2018).

Avaliar ganho de peso é sabidamente essencial, visto que o peso é a medida que mais facilmente reflete distúrbios agudos ou crônicos, bem como a eficácia da

terapia nutricional. Contudo, avaliar o peso de forma isolada não reflete necessariamente o crescimento de órgãos, tampouco a composição corporal que vem sendo amplamente estudada, visto sua relação saúde metabólica futura (FRONDAS-CHAUTY, *et al.*, 2017). Recém-nascidos prematuros, principalmente aqueles pequenos para idade gestacional, têm maior risco de aumento da adiposidade, um fator de risco para o desenvolvimento da síndrome metabólica (GIANNI *et al.*, 2009). Por outro lado, aqueles com maior percentual de massa magra têm, além de menores chances de alterações metabólicas, melhores desfechos neurológicos (RAMEL *et al.*, 2016).

O microbioma também é fator determinante para crescimento e desenvolvimento adequados. No início da vida, a microbiota intestinal desempenha um papel benéfico na formação e desenvolvimento do hospedeiro saudável. Para tanto, é necessário que haja equilíbrio no ecossistema e uma proporcionalidade entre as comunidades microbianas patogênicas e não patogênicas (ANGELAKIS; RAOULT, 2018).

O recém-nascido prematuro tem maior chance de desequilíbrio no ecossistema, sendo mais propenso à disbiose. São diversos os fatores que influenciam para a disbiose: uso de antibiótico pela mãe durante o período pré-natal, uso de antibiótico no período perinatal, imaturidade e tempo prolongado de internação são alguns deles (DIGGIKAR, 2019). A disbiose do microbioma intestinal em prematuros predispõe o neonato a morbidades relevantes, que interferem diretamente para o crescimento e desenvolvimento, incluindo: enterocolite necrotizante, sepse, alteração na permeabilidade da mucosa e absorção de nutrientes (GROER *et al.*, 2014), além de estar relacionada à desfechos neurológicos adversos (LU; CLAUD, 2018).

Tendo em vista o exposto, faz-se necessário averiguar as possíveis relações entre microbiota intestinal e crescimento na primeira infância.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PREMATURIDADE

A Organização Mundial da Saúde define parto prematuro como aquele que antecede às 37 semanas de gestação (WHO, 1977), e ressalta ser esta a principal causa de morte em todo o mundo, para crianças menores de 5 anos de idade (CHAWANPAIBOON, 2018). Este mesmo órgão define também a classificação do prematuro de acordo com a idade gestacional ao nascimento: extremamente prematuro (<28 semanas), muitoprematuro (28 - <32 semanas) e prematuro moderado (32 - <37 semanas completas de gestação) (WHO, 2012).

O número de nascidos prematuros, em 2014, foi de 14,84 milhões em todo o mundo. No Brasil, este número está em 339.239 mil, representando 11,2% dos nascimentos prematuros e colocando o país dentro da lista dos 10 países com maiores índices de nascimentos prematuros do mundo (LIU *et al.* 2016; CHAWANPAIBOON *et al.*, 2018).

Nascer prematuro pode acarretar diversas morbidades, de curto, médio e longo prazo. Os riscos para esses desfechos adversos são especialmente altos para crianças muito prematuras ou muito baixo peso ao nascer (idade gestacional <32 semanas ou peso ao nascer <1500g), e ainda mais graves para o prematuro extremo e extremo baixo peso (idade gestacional <28 semanas ou peso ao nascer <1000g) (DOYLE & ANDERSON, 2010; LEMOLA, 2015). Sendo complicações comuns: síndrome do desconforto respiratório, displasia broncopulmonar, enterocolite necrosante, sepse, leucomalácia periintraventricular, convulsões, hemorragia intraventricular, paralisia cerebral, infecções, dificuldades de alimentação e falhas de crescimento (PLATT, 2014). Crianças nascidas prematuras têm risco

aumentado para alterações metabólicas, de crescimento e desenvolvimento que podem se manifestar à curto, médio e longo prazo (TERRAZZAN, SILVEIRA & PROCIANOY, 2014; GIABICANI *et al.*, 2018).

Os distúrbios de crescimento estão entre os problemas mais comuns que os prematuros podem apresentar ao longo da vida. A prematuridade e as complicações associadas são responsáveis por elevada morbidade e comprometimento da nutrição e do crescimento nos primeiros anos de vida (GÄDDLIN, 2011). Nas últimas décadas, os avanços na assistência neonatal levaram a um aumento substancial na sobrevivência entre os prematuros. Contudo, mesmo com a continuação das melhorias nos cuidados com prematuros, mais de 50% terão alta com falha grave de crescimento pós-natal (HORBAR *et al.*, 2015). Assim, especial atenção deve ser dada ao *follow up* de prematuros, tendo em vista o aumento da morbidade do neurodesenvolvimento e falhas do crescimento, relacionados à interação entre as experiências estressantes da prematuridade (AAP, 2002).

Segundo a Academia Americana de Pediatria, todos os recém-nascidos de alto risco devem ser acompanhados em programas de *follow up* especializado (AAP, 2002). Silveira (2012) ressalta que todo programa de seguimento da criança de alto risco, deverá ser iniciado ainda durante a internação hospitalar e mantido de forma interdisciplinar. Os programas de acompanhamento neonatal são as melhores ferramentas disponíveis para uma avaliação adequada do neurodesenvolvimento e acompanhamento de crianças de alto risco (SOBAIH, 2012).

O acompanhamento multidisciplinar do lactente de alto risco pode ser benéfico para os bebês e suas famílias, por meio da identificação e intervenção precoces de problemas de saúde e desenvolvimento. A intervenção precoce não é importante apenas para melhores desfechos para a criança, mas também

desempenha um papel importante para estabelecimento de vínculo entre pais e filhos e no bem-estar dos pais (ORTON *et al.*, 2018).

2.2 CRESCIMENTO DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS

Enquanto para crianças nascidas a termo já está claro que o padrão de crescimento no primeiro ano de vida é preditor de estado nutricional durante a infância (LUDINGTON-HOE *et al.*,2013),para prematuros ainda não há consenso sobre como deve ser o monitoramento do padrão de crescimento e nem qual seria o padrão de crescimento ideal, a partir do momento em que estas crianças atingem a idade termo equivalente, principalmente, para aqueles nascidos antes das 32 semanas de gestação (FENTON *et al.*, 2017; VILLAR *et al.*,2018).

Atualmente, estão disponíveis as curvas *INTERGROWTH*: padrões de crescimento pós-natal para prematuros e podem ser utilizados para avaliar prematuros até 64 semanas de idade pós-menstrual (6 meses de idade corrigida). Este período seria equivalente ao tempo em que se sobrepõem, sem a necessidade de qualquer ajuste, aos padrões de crescimento infantil da Organização Mundial da Saúde, para recém-nascidos a termo (VILLAR *et al.*, 2018). No entanto, ao migrar para as curvas da Organização Mundial da Saúdeé recomendadomanter avaliação a partir da idade corrigida, até os 24 meses, com intuito de garantir avaliação mais precisa e compatível com o prematuro (AAP, 2002; RUGOLO, 2005; D'AGOSTINO, 2009).

Vale salientar que associado ao grau de prematuridade o recém-nascido deve ser classificado quanto a adequação do peso para idade gestacional. Esta classificação pode ser realizada através das curvas de crescimento fetal de Alexander e colaboradores(1996), de acordo com as diferentes idades gestacionais,

usando-se o critério de percentis. E, especificamente, para recém-nascidos prematuros, utiliza-se a curva de Fenton *et al.* (2013), também a partir dos critérios de percentis.

A classificação conforme a adequação do peso para idade gestacional é: Adequado para idade gestacional (AIG) – recém-nascido classificado entre o percentil 10 e 90 da curva; Pequeno para idade gestacional (PIG) – recém-nascido classificado abaixo do percentil 10 da curva; Grande para idade gestacional (GIG) – recém-nascido classificado acima do percentil 90 da curva (FENTON *et al.*, 2013).

Pequeno para idade gestacional e restrição de crescimento intrauterino (RCIU) são frequentemente interpretados erroneamente como sinônimo (ROGGERO *et al.*, 2011; COOKE, 2016). O termo PIG refere-se à adequação do peso para idade gestacional, enquanto o termo RCIU sugere um padrão de velocidade de crescimento diminuído durante a vida uterina. Uma criança que nasceu pequena para idade gestacional não necessariamente sofreu RCIU. Crianças nascidas após um curto período de RCIU não são necessariamente PIG. Ser PIG torna o prematuro mais propensos à retardo de crescimento entre nascimento e alta hospitalar, tendo em vista que não possuem reserva proteico energética. Já, RCIU é uma definição clínica e se aplica a neonatos nascidos com características clínicas de desnutrição e retardo do crescimento intrauterino, independentemente do percentil do peso ao nascer. Além disso, as causas de RCIU são diversas e consequências posteriores à restrição podem diferir entre diferentes grupos de pacientes (BEUKERS, CRANENDONK & De VRIES, 2013; SHARMA, 2016, MALHOTRA *et al.*, 2019).

Independentemente da presença de restrição de crescimento ao nascimento, os prematuros são vulneráveis a infecções extrauterinas, restrição de crescimento

durante a permanência na unidade de terapia intensiva neonatal e após a alta, relacionadas a déficits de energia. O manejo nutricional de recém-nascidos prematuros - incluindo muito baixo peso ao nascer (<1500 g) ou peso extremamente baixo ao nascer (<1000 g) - tem como objetivo resultar em padrões de crescimento aproximar os padrões de crescimento fetal intrauterino (EHRENKRANZ, 2010).

Avaliar os parâmetros de crescimento do prematuro se faz essencial para determinar a conduta nutricional, bem como para que seja possível identificar déficits ou falhas e promover recuperação precoce. É recomendado uso da idade corrigida para peso, comprimento e perímetro cefálico até 24 meses de idade (AAP, 2002; RUGOLO, 2005), uma vez que avaliação a partir da idade ajustada aumenta a capacidade de precisão em reconhecer atrasos fidedignos em oposição a atrasos compatíveis com a idade cronológica (D'AGOSTINO, 2009).

Tendo como base algumas modificações na composição corporal durante o processo de crescimento e desenvolvimento infantil, a avaliação do estado nutricional deve utilizar medidas corporais que possam refletir estas mudanças. Para realizar avaliação nutricional de recém-nascidos, as medidas antropométricas são de grande valia, uma vez que são simples, factíveis e têm concordância com métodos mais elaborados de avaliação. As medidas mais utilizadas são: peso, comprimento e perímetro cefálico, sendo que é indicado também fazer cálculo do índice de massa corporal; ainda, aferir dobras cutâneas tricipital e subescapular pode complementar a avaliação nutricional (CARDOSO; FALCÃO, 2007; FALCÃO, 2008; SILVEIRA, 2012).

O crescimento de recém-nascidos prematuros apresenta uma variação chamada *catchup*, representada por quatro períodos: período de perda de peso (fase inicial, quando o bebê começa a se adaptar ao meio extra uterino), período

mínimo de crescimento (fase em que a oferta proteico energética já deve estar adequada, e as condições clínicas estabilizadas), período de maior crescimento (fase de crescimento acelerado) e período de normalização do crescimento (quando o recém-nascido cresce de acordo com seu potencial genético (MORO *et al.*,2015).

Prematuros e aqueles nascidos com restrição de crescimento intrauterino apresentam crescimento aquém daqueles nascidos a termo, porém é esperado uma recuperação dos parâmetros de crescimento, sendo crescimento de perímetro cefálico até os 12 meses, seguido do comprimento e peso (RUGOLO, 2005; COOKE, 2006; BATISTA *et al.*, 2012).

Para crianças nascidas baixo peso é esperado que um crescimento acelerado aconteça no período neonatal (OMS, 2011). Toftlund e colaboradores(2018), realizaram estudo de *follow up* com prematurosem aleitamento materno na alta hospitalar (leite humano fortificado ou não), e observaram crescimento acelerado principalmente no período pós alta imediato, independente do tipo de alimentação no período.

Entretanto, ainda não está claro se o momento ideal para *catch up* em bebês prematuros é durante a internação, em períodos precoces ou tardios na infância (TOFTLUND *et al.*, 2012). Contudo, sabe-se que *catch up* acelerado também pode estar ligado a desfechos desfavoráveis quando avaliadas secreção hormonais e composição corporal a longo prazo (UTHAYA *et al.*,2005; MATHAI *et al.*, 2013). O crescimento acelerado no período neonatal pode proteger a criança de problemas cognitivo-comportamentais, contudo, pode estar associado à maior adiposidade infantil (BLOOMFIELD *et al.*, 2018).

2.2.1 Peso

Em relação ao crescimento intrauterino, o 3º trimestre de gestação parece ser o mais crítico e importante para o ganho de peso fetal. Conseqüentemente, crianças prematuras perdem parte deste ganho. O peso expressa a dimensão da massa orgânica e inorgânica das células, dos tecidos de sustentação, órgãos, músculos, ossos, gordura e água. O peso é uma medida composta, que reflete de maneira geral o conteúdo de músculos, pele, ossos e desenvolvimento dos órgãos internos. O peso de nascimento é considerado um dos melhores parâmetros para avaliação do crescimento perinatal, sendo que qualquer alteração no mesmo pode refletir distúrbios agudos ou crônicos, bem como pode mostrar a eficácia ou não da terapia nutricional (FALCÃO, 2003)

Peso adequado é determinado para aquelas crianças com peso ao nascer superior à 2.500 gramas, enquanto recém-nascido de baixo peso ao nascer é definido como todo recém-nascido com peso inferior a 2.500 gramas e muito baixo peso são aqueles recém-nascido com peso de nascimento inferior à 1.500gramas, todos independentemente da idade gestacional (WHO, 1961). Sharma (2016) salienta que o baixo peso ao nascer não deve ser confundido com RCIU ou PIG, uma vez que sua definição é baseada no peso ao nascer (menos de 2.500 g), independentemente da idade gestacional, sexo, raça e características clínicas.

Durante o *follow up*, avaliar ganho de peso é sabidamente essencial, visto que o peso é a medida que mais facilmente reflete distúrbios agudos ou crônicos, bem como a eficácia da terapia nutricional. Contudo, avaliar o peso de forma isolada não reflete necessariamente o crescimento de órgãos, tampouco a composição corporal que vem sendo amplamente estudada, visto sua relação saúde metabólica futura (FRONDAS-CHAUTY, *et al.*, 2017). A avaliação da composição corporal é útil

para monitorar a qualidade do crescimento. A composição corporal foi proposta como um indicador melhor para a qualidade do crescimento do que o monitoramento do ganho de peso isolado (SAUER, 2007).

2.2.2 Índice de massa corporal

O índice de massa corporal (IMC) é utilizado para avaliar a proporcionalidade corporal e oferecer informações importantes sobre padrão de crescimento na primeira infância (DE CUNTO, *et al.*, 2014). Tendo em vista que o crescimento infantil não ocorre isoladamente, faz-se necessário observar medidas complementares. Há evidências de que trajetórias distintas de Índice de Massa Corporal durante a infância podem contribuir para futuros riscos e consequências adversas para a saúde futura (BARKER, 1995; LIU *et al.*, 2017). De Cunto *et al.* (2014), avaliaram crianças nascidas a termo e apontam que o IMC está associado à adiposidade em recém-nascidos e crianças e ainda sugerem que é uma medida mais adequada que o índice ponderal.

Grupos de trajetória de IMC altamente estáveis e acelerados apresentaram maiores probabilidades de obesidade mais tarde na vida. Trajetórias de IMC podem capturar o processo fisiológico dinâmico do corpo humano. Sendo assim, é importante entender os determinantes potenciais para as trajetórias do IMC durante a infância (JONES-SMITH, FERNALD e NEUFELD, 2007; LIU *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018).

Ludington-Hoe e colaboradores (2013) avaliaram crianças nascidas a termo e verificaram que a evolução do IMC durante o primeiro ano de vida foi preditora do estado nutricional aos 5 anos. As crianças com sobrepeso, obesidade e obesidade

mórbida aos 5 anos tiveram IMC durante o primeiro ano de vida significativamente maior do que aquelas com peso adequado aos 5 anos.

Liu *et al.*(2017) também realizaram estudo observando padrão do IMC no primeiro ano de vida e encontraram maior chance de obesidade aos 6 anos de idade para aquelas crianças cujo a curva do IMC nos primeiros anos era mais elevada. Mais recentemente, os mesmos autores (LIU *et al.*,2018) constataram que crianças nascidas prematuras também estão dentre os grupos de risco com maiores chances de manter padrão acelerado para aumento do IMC no primeiro ano de vida.

2.2.3 Dobra cutânea

A espessura da gordura subcutânea é específica para o tecido adiposo e pode ser medida de forma não invasiva, sendo uma importante ferramenta e um válido indicador antropométrico de gordura corporal infantil (FUSCH, 2002; BEDOGNI *et al.*; 2013; SCHMELZL). Dobras cutâneas subescapular e supra ilíaca refletem gordura central, enquanto dobra cutânea tricipital e bicipital refletem gordura periférica (RODRIGUEZ *et al.*,2004)

A aferição das dobras cutâneas é uma ferramenta valiosa e fidedigna para estimar adiposidade e, embora exija profissional treinado, é factível para uso ambulatorial, de baixo custo e segura (WENDEL *et al.*,2016). Outra vantagem, é que dados das medidas de dobras cutâneas podem ser utilizados brutos, expressos como escore-z e avaliados a partir de valores de referência da população a ser estudada (Horan *et al.*,2014).

Chen *et al.* (2017), afirmam que as dobras cutâneas têm melhor poder preditivo do que outras medidas antropométricas para composição corporal neonatal. Pecoraro *et al.* (2003), relataram a validade da dobra cutânea tricipital

como indicador de adiposidade na primeira infância, ao avaliarem crianças de 6 anos de idade, verificando a correlação entre medidas de dobras cutâneas, IMC e bioimpedância.

Há boa correlação do peso ao nascer com massa gorda total em recém-nascidos. E a medida das dobras cutâneas também demonstra boa correlação com a massa gorda total em recém-nascidos. A relevância da utilização das dobras cutâneas na prática clínica, é enfatizada pelo fato de que o estado nutricional tem um impacto considerável no desfecho neonatal precoce e tardio (OLUTEKUNBI *et al.*,2018). Ainda, alguns autores relatam associação entre maior percentual de massa magra em crianças prematuras à melhores escores cognitivos aos 12 meses de idade corrigida (RAMEL *et al.*,2016) e 4 anos de idade (PFISTER *et al.*,2018), trazendo à tona a importância em se avaliar a composição corporal desde os períodos mais precoces.

2.2.4 Comprimento

A medida de comprimento reflete as diferenças do potencial genético do crescimento e sofre menor influência da nutrição fetal. Ao contrário do peso, o comprimento não é influenciado pelo estado hídrico e nem sofre variação negativa. O comprimento é o indicador do tamanho corporal e do crescimento linear da criança. Vale lembrar que para recém-nascidos, o ideal é usar o termo comprimento, uma vez que esta medida é aferida com a criança deitada (FIGUEIRA, 2004).

A avaliação do crescimento do recém-nascido prematuro, especialmente daquele pequeno para a sua idade gestacional, é importante para identificar sua condição de saúde e seu prognóstico. Problemas resultantes da prematuridade, como anemia, doença pulmonar crônica, doenças neurológicas e desordens no

desenvolvimento podem interferir no crescimento dos recém-nascidos prematuros, portanto, é essencial dar atenção à medida do comprimento, para poder relacionar qualquer déficit deste com o possível desenvolvimento de patologias que possam interferir no mesmo (RUGOLO, 2005; SILVEIRA, 2012).

2.2.5 Perímetro cefálico

A medida do perímetro cefálico tem relação direta com o tamanho do encéfalo, e conseqüentemente, seu aumento proporcional indica crescimento adequado e melhor prognóstico neurológico. O perímetro cefálico é a medida antropométrica menos afetada por uma nutrição inadequada e é a primeira que cresce ao se atingir uma oferta proteico-calórica ideal. Estes autores ainda sugerem que o crescimento cefálico esperado é de 1 cm por semana (FALCÃO, 2002; FALCÃO, 2008).

Em recém-nascidos prematuros, existe uma estreita relação entre o crescimento de perímetro cefálico e o desfecho do neurodesenvolvimento. Os esforços para melhorar os resultados neurocognitivos devem se concentrar em fatores associados à recuperação do perímetro cefálico (GHODS et al.,2011). Lidzba e colaboradores (2016), Cooke e colaboradores (2018), afirmam, ainda, que dentre todas as medidas antropométricas, o crescimento do perímetro cefálico entre alta e a idade escolar é o melhor preditor independente para o desfecho cognitivo em prematuros de muito baixo peso.

2.3 MICROBIOTA INTESTINAL

O termo microbiota intestinal refere-se a uma variedade de micro-organismos vivos responsáveis pela colonização intestinal, sendo considerado como um dos

ecossistemas mais complexos (PAIXÃO; CASTRO, 2016; TANAKA; NAKAYAMA, 2017). A diversidade do microbioma representa um processo evolucionário de equilíbrio entre imunidade do hospedeiro e crescimento microbiano (DISHAW *et al.*,2014).

O microbioma intestinal é a maior de todas as comunidades microbianas encontradas no organismo humano, sendo o mais amplamente estudado. Consiste em trilhões de diferentes tipos de bactérias e milhões de genes vivendo em comensalismo. A microbiota intestinal normal é estimada em até 100 trilhões de microrganismos, compreendendo entre 500 e 3.000 espécies, e quase 5 milhões de genes únicos, que é 100 vezes mais genes do que o humano genoma (GROER *et al.*,2014). As espécies específicas que colonizam o intestino, interações dentro da comunidade microbiana e com o hospedeiro, bem como outros fatores relacionados ao ambiente, molda a composição taxonômica da microbiota. Isso pode explicar a alta variabilidade composicional observada entre os sujeitos (GOSALBES *et al.*,2012).

O hospedeiro humano requer uma microbiota benigna e benéfica para manutenção de processos nutricionais, de desenvolvimento, defensivos e fisiológicos, resultando, em última instância, em tolerância imunológica a antígenos alimentares e bacterianos, proteção contra patógenos e maturação do epitélio gastrointestinal (GROER *et al.*,2014). Torrazza e Neu (2011) corroboram o exposto, afirmando que a microbiota benéfica é fundamental para o organismo humano, auxiliando para a manutenção das principais funções imunológicas, crescimento e desenvolvimento, bem como processos psíquicos. Há evidências que sugerem que consequências dos eventos relacionados à modulação precoce do microbioma

estendem-se ao longo da vida, sendo protetores ou predisponentes a doenças (BLANTON *et al.*,2016; ROBERTSON *et al.*,2018).

O microbioma neonatal compreende todos os organismos que vivem dentro ou na superfície dos recém-nascidos. A colonização do trato gastrintestinal do recém-nascido sofre influência das mudanças alimentares, estilo de vida e saúde materna desde o período pré gestacional e durante a gestação. Situações adversas, principalmente na gestação, podem gerar alterações importantes e determinantes para o microbioma fetal e conseqüentemente refletir em alterações para o microbioma durante a primeira infância (MACPHERSON *et al.*,2017). A colonização microbiana do trato digestivo configura um extenso desafio para a maturação do sistema imunológico do recém-nascido. Esta colonização desempenha um papel-chave no estabelecimento da homeostase e manutenção da função de barreira da mucosa intestinal (HOOPER; MACPHERSON, 2010)

De acordo com o conceito “útero estéril” os micróbios são adquiridos tanto verticalmente (da mãe), quanto horizontalmente (de outras pessoas ou do ambiente) durante e após o nascimento (FUNKHOUSE; BORDENSTEI, 2013). Entretanto, estudos nas últimas décadas têm questionado o conceito de esterilidade do líquido amniótico e suportam a hipótese de que o microbioma intestinal fetal é derivado da deglutição do líquido amniótico contendo bactérias (JIMÉNEZ *et al.*,2008; MSHVILDADZE *et al.*,2014). Aagard *et al.* (2014), detectaram microorganismos comensais pertencentes aos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Proteobacteria, e Tenericutes na placenta, líquido amniótico, cordão umbilical, e mecônio fetal que se assemelha à microbiota oral de neonatos. Mshvildadze *et al.* (2010), identificaram DNA microbiano no mecônio de recém-nascidos prematuros, sugerindo origem intrauterina, e supondo que o micróbios estariam presente no

líquido amniótico engolidos pelos fetos. Contudo, ainda há falta de entendimento acerca dos mecanismos pelos quais acontece a formação da microbiota via placenta e líquido amniótico (JIMENEZ *et al.*,2005).

Mais recentemente, Shi *et al.*(2018), ressaltaram que embora haja evidências de colonização ainda no período intrauterino, as pesquisas atuais sugerem que a maior colonização se dê após o nascimento, quando a criança entra em contato com micróbios do meio extrauterino.

A via de nascimento também tem se mostrado determinante para o início da modulação microbiana. Diversos estudos elucidam que recém-nascidos por via vaginal são rapidamente colonizados pelos organismos da flora entérica, da vagina e da pele materna, apresentando maior abundância de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* e *Sneathia*. O parto vaginal expõe o neonato aos micróbios que estão colonizando canal vaginal materno, sendo uma forma direta de transmissão da herança microbiana, resultando em recém-nascidos com microbiota semelhante à de sua própria mãe (DOMINGUEZ-BELLO, 2010; PRINCE *et al.*,2014; CHONG,BLOOMFIELD; O'SULLIVAN , 2018) Os recém-nascidos por cesariana demoram mais para ter contato com bactérias do organismo materno e apresentam maior número de *Staphylococcus*, *Clostridium difficile*, *Propionibacterium* e *Corynebacterium*. (DOMINGUEZ-BELLO, 2010; ARRIETA *et al.*,2014; PRINCE *et al.*,2014; ROSENBERG e TREVATHAN, 2018).

Chu e colaboradores (2017) realizaram estudo observando as mudanças na microbiota de recém-nascidos e ressaltam, no entanto, que o microbioma infantil passa por uma reorganização importante nas primeiras 6 semanas de vida e esta é norteada primariamente pelo local do corpo e não pelo tipo de parto.

O estabelecimento da microbiota saudável passa por duas grandes etapas na infância. A primeira etapa é considerada a transição logo após o nascimento, onde o recém-nascido passa a receber leite materno e passa a ter uma maior dominância da microbiota intestinal por *Bifidobacterium*. A segunda etapa é associada ao período da alimentação complementar, onde além do leite materno a criança passa a receber outros alimentos, que vão influenciar de maneira distinta a formação microbiana (TANAKA; NAKAYAMA, 2017). São diversos os fatores influenciadores do estabelecimento microbiota, sendo que a composição microbiana do intestino da criança aumenta em número e diversidade à medida que o tempo passa, chegando ao ápice ainda na primeira infância. Entre 12 e 36 meses de vida a diversidade e complexidade de composição microbiana já se assemelha à microbiota intestinal anaeróbica de adultos (PAIXÃO; CASTRO, 2016; TANAKA; NAKAYAMA, 2017).

A microbiota neonatal é um ecossistema diversificado e especializado, que ajuda no desenvolvimento de enterócitos gastrointestinais, angiogênese, função imune, desenvolvimento de células T intestinais e GALT. Espera-se que haja interação entre sistema imunológico do hospedeiro e microbiota, conhecido como simbiose, que determina equilíbrio entre micróbios residentes, produção de compostos imunomoduladores e subsequente regulação da resposta imune (WLAKER *et al.*, 2017)

O intestino e o sistema imunológico regulam a comunidade microbiana. No entanto, este equilíbrio pode ser rapidamente interrompido após perturbações ambientais; tais como: parto prematuro, estresse e infecção (JASAREVIC *et al.*, 2015).

Lu *et al.* (2018), realizaram estudo transfundindo microbiota de recém-nascido prematuro associada à um fenótipo de déficit de crescimento para camundongos

germ-free estado de prenhez. Como resultado encontraram na prole inflamação sistêmica e neuroinflamação, evidenciados por mediadores pró inflamatórios elevados na circulação e no cérebro, corroborando as hipóteses de que há relação direta entre colonização microbiana, sistema imunológico e atividade cerebral.

Hoban *et al.*(2016), em estudo experimental com camundongos *germ-free* identificaram comprometimento da formação da barreira hematoencefálica e mielinização, sugerindo um papel essencial da microbiota no desenvolvimento neural estrutural e funcional. Estes dados evidenciam a capacidade da comunidade microbiana intestinal em regular não somente a permeabilidade da mucosa intestinal, mas, também atividade de moléculas de ativação do sistema neurológico.

Quando a interação entre hospedeiro e microbioma entra em desequilíbrio, temos um estado de Disbiose, caracterizado por uma maior quantidade de organismos patogênicos e menor diversidade microbiana, levando o organismo do hospedeiro a ser menos resistente a doenças, mais predisposto à processos inflamatórios (ROBERTSON *et al.*,2019).

2.4 MICROBIOTA INTESTINAL E PREMATURIDADE

O processo de estabelecimento da microbiota em prematuros é desafiador. São diversos os fatores interferentes, sendo os principais: idade gestacional, imaturidade dos órgãos e sistemas, uso frequente de antibióticos, longo tempo de internação e nutrição (GRIER *et al.*,2017; DIGGIKAR, 2019). A fisiologia gastrintestinal imatura, propicia maior translocação bacteriana e consequente inflamação sistêmica, podendo evoluir para sepse e sendo relacionada também com enterocolite necrosante (CHERNIKOVA *et al.*,2018).

Recém-nascidos prematuros são vulneráveis a disbiose inutero. Infecções maternas determinam contato precoce com antibióticos, que muitas vezes continuam a ser administrados no período perinatal. A administração de antibióticos durante a gravidez altera a microbiologia vaginal antes do nascimento, com potenciais efeitos a longo prazo sobre a colonização microbiana do neonato (WALKER *et al.*, 2017). Ademais, os antibióticos de amplo espectro, comumente utilizados, perturbam a microbiota através de seus efeitos na trajetória da colonização microbiana, levando à redução do padrão de diversidade microbiana e à colonização comensal tardia, especialmente em bebês prematuros (GREENWOOD *et al.*, 2014). Estudos mostram que aumento da duração do tratamento com antibióticos se correlacionam com enterocolite necrosante e sepse no período perinatal (COTTEN *et al.*, 2009; ALEXANDER *et al.*, 2011), além de maior risco de sobrepeso e asma na infância (MBAKWA *et al.*, 2016).

O estresse durante a gravidez pode exacerbar a imunossupressão fisiológica normal, aumentando assim a vulnerabilidade materna à infecção genit urinária e seus riscos obstétricos. Sabidamente existe uma estreita relação entre infecções uterinas e partos prematuros, mais recentemente estudos adicionaram composição microbiana na lista de fatores associados à nascimentos prematuros e corioamnionite (AAGAARD, *et al.*, 2014). Infecções vaginais de repetição, sejam bacterianas ou fúngicas tendem a desencadear uma variedade de respostas locais e globais, que pode resultar na eventual perda do ecossistema vaginal dominante de *Lactobacillus* (EHRSTROM *et al.*, 2005). O efeito da depleção de lactobacilos, advinda do estresse, pode influenciar na transmissão microbiana materno infantil (JASAREVIC *et al.*, 2015), influenciando a formação da microbiota do recém-nascido.

Idealmente, o leite materno deve ser o primeiro alimento recebido pelo trato gastrointestinal e a composição do leite (além de suprir as necessidades nutricionais do recém-nascido, é rico em moléculas imunomoduladoras e oligossacarídeos) tem impacto direto na formação da microbiota do neonato (GROER *et al.*, 2014). O leite materno contém imunoglobulina A, lactoferrina, lisozima, fatores de crescimento e oligossacarídeos do leite humano, que conferem características de proteção para o recém-nascido (ROGIER *et al.*, 2014; UNDERWOOD *et al.*, 2015). Ainda, o leite materno tem poliaminas, que são conhecidas por proteger a microbiota benéfica (PLAZA-ZAMORA *et al.*, 2013).

Oligossacarídeos do leite humano (HMOs) são conhecidos por influenciar a composição do microbioma, encorajando colonização com uma comunidade saudável de membros do filo Bacteroides (UNDERWOOD *et al.*, 2015). Os oligossacarídeos do leite humano parecem ter múltiplas funções: primeiramente são responsáveis por modular a composição da microbiota intestinal infantil através do consumo seletivo de bactérias. Assim Bifidobactérias e Bacteroidetes se tornam bactérias intestinais dominantes em bebês que recebem leite humano. Outro fator importante é que oligossacarídeos do leite humano têm homologia estrutural para muitos glicanos de superfície celular, ligando-se a bactérias luminais que são então incapazes de se ligar à superfície dos enterócitos. Por fim, oligossacarídeos do leite humano são absorvidos e excretados na urina, podendo auxiliar para diminuir a capacidade das bactérias invasoras de causar infecções no trato urinário. Ainda, o ácido siálico contendo HMOs pode ser importante neurodesenvolvimento.

Os oligossacarídeos do leite humano são prebióticos, sendo o terceiro maior componente do leite materno. Considerados como um dos principais substratos para proliferação bacteriana, incluindo espécies de Bifidobactéria e Bacteroidetes, mas

não bactérias patogênicas tais como Enterobacteriaceae (CHONG ,BLOOMFIELD; O'SULLIVAN, 2018).

Por outro lado, recém-nascidos alimentados com fórmulas lácteas tendem a apresentar maior diversidade microbiana com bacteroides, enterobactérias, *enterococcus* e *Clostridium sp.* (HARMSEN *et al.*,2000).

A microbiota intestinal de recém-nascidos amamentados é diferente da microbiota daqueles que recebem fórmula láctea (TANNOCK *et al.*,2013). Prematuros têm comunidades microbianas de diversidade e estabilidade limitadas, além da barreira da mucosa menos eficiente, sendo amplamente colonizados por micróbios residentes da unidade de terapia intensiva neonatal (OLM *et al.*,2017). Somado a isto, recém-nascidos prematuros muitas vezes são privados da oferta de leite materno e este pode ser mais um fator contribuinte para a disbiose nesta população. Ainda há a especulação de que prematuros diferem na responsividade do intestino a prebióticos, tais como HMOs. Em um estudo, a administração de HMOs suplementares às mamadas para 12 bebês prematuros não resultou no aumento esperado em Bifidobacteria (UNDERWOOD *et al.*,2014), sugerindo uma dificuldade de interação entre mucosa intestinal e bactérias comensais.

Os componentes do eixo cérebro-intestino-microbiota incluem o sistema nervoso central, endócrino-imune, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, sistema nervoso autônomo simpático-parassimpático, o sistema nervoso entérico e a microbiota intestinal. A comunicação bidirecional permite que o cérebro influencie as modalidades motoras, sensoriais e secretoras do trato gastrointestinal e, inversamente, a sinalização de baixo para cima a partir do intestino estimula função cerebral, principalmente o hipotálamo e amígdala que têm muitas funções dedicadas ao estresse (CONG *et al.*,2017).

Dada a íntima relação cérebro-intestino, o processo inflamatório decorrente da disbiose no período perinatal também tem sido associado à patogênese de doenças neurológicas em prematuros (KEUNEN *et al.*,2015). Disbiose intestinal precoce em recém-nascidos prematuros também tem sido associada com inúmeras consequências a longo prazo para a saúde, incluindo diabetes do tipo 1, doença de Crohn, doenças alérgicas, asma, dermatite atópica, obesidade e transtornos do espectro do autismo (ITANI *et al.*,2017)

A idade gestacional ao nascimento também é um dos principais determinantes da colonização do microbioma. Recém-nascidos a termo saudáveis, nascidos por parto vaginal são colonizados por *Bifidobacterium* até o dia 7 de vida, (BUTEL *et al.*,2007). Recém-nascidos prematuros geralmente apresentam membros do filo *Proteobacteria* aumentados e membros do filo *Bifidobacterium* e *Bacteroides* diminuídos, em comparação aos nascidos a termo (ARBOLEYA *et al.*,2012). Ardissonne *et al.*(2014), verificaram que idade gestacional teve maior influência sobre a estrutura da comunidade microbiana em recém-nascidos prematuros do que o tipo de parto, se vaginal ou cesárea, especialmente no ponto de corte de 33 semanas. Os autores apontam diversas famílias taxonômicas dentro do filo *Firmicutes* correlacionadas com a idade gestacional, incluindo gênero *Staphylococcus*, cujo a abundância foi maior dentre aquelas crianças nascidas menores de 33 semanas de gestação.

A colonização por *Staphylococcus* é uma característica normal da flora intestinal saudável. Jacquot e colaboradores (2011), realizaram estudo com prematuros extremos e encontraram gênero *Staphylococcus* spp foi em 67% dos pacientes na primeira semana de vida. Itani e colaboradores (2017), relatam maior

abundância de *Staphylococcus* nas fezes de recém-nascidos prematuros nascidos < 33 semanas de gestação.

White e colaboradores. (2013), encontraram uma associação entre a colonização por *Staphylococcus*, detectada nas fezes de recém-nascidos a termo aos 4 dias de vida, com crescimento adequado aos 6 meses de vida. Entretanto, Nataro e Guerrant (2017), sugerem que o gênero *Prevotella* se associa com melhor crescimento em todas as faixas etárias, enquanto *Streptococcus lutetiensis* e *Escherichia coli* estão associados à déficit no crescimento.

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a atual preocupação com o estado nutricional na primeira infância, uma vez que já estabelecida a relação com prevenção ou predisposição à doenças futuras, e a maior vulnerabilidade das crianças nascidas prematuras à alterações nutricionais e metabólicas (BARKER, 2007; YOSHIDA *et al.*, 2009; VICKERS, 2011; TERRAZZAN, PROCIANOY; SILVEIR, 2014), este estudo faz-se necessário.

Prematuros e aqueles nascidos com restrição de crescimento intrauterino apresentam crescimento aquém daqueles nascidos a termo, porém é esperado uma recuperação dos parâmetros de crescimento, sendo crescimento de perímetro cefálico até os 12 meses, seguido do comprimento e peso (RUGOLO, 2005; COOKE, 2006; BATISTA *et al.*, 2012).

São muitos os fatores que influenciam o crescimento pós-natal de crianças nascidas prematuras, como estado nutricional ao nascimento, evolução clínica durante internação, e práticas nutricionais pós-natais (SILVEIRA; PROCIANOY, 2018). Além destes, há evidências de que a microbiota intestinal saudável, ou seja, com equilíbrio entre bactérias benéficas e bactérias patogênicas, pode ser fator determinante para melhores prognósticos (TORRAZZA, NEU, 2011; GROER *et al.*, 2014).

Ainda são poucos os estudos realizados com crianças nascidas prematuras, bem como, com delineamentos longitudinais. Arboleya *et al.* (2011), identificaram diferentes tipos e quantidade de cepas colonizadoras da microbiota, ao comparar crianças nascidas prematuras com crianças nascidas a termo, com dados coletados até 90 dias de vida. Scheepers *et al.* (2015), realizaram um dos primeiros estudos relacionando microbiota intestinal em período precoce (30 dias de vida) e

desenvolvimento de peso subsequente (10 anos de vida) com crianças nascidas a termo, indicando que a presença de *B fragilis* pode ter influência no Índice de Massa Corporal futuro.

Nosso estudo é um dos poucos em âmbito nacional averificar se há relação entre colonização da microbiota em período perinatal e estado nutricional na infância precoce, de crianças nascidas prematuras baixo peso.

4 HIPÓTESE

A microbiota o mecônio de recém-nascidos pramaturros pode estar associada ao padrão de crescimento e catch up no primeiro ano de vida

5 OBJETIVOS

Tendo em vista que este projeto resultou em dois artigos originais, apresentamos dois objetivos distintos.

Artigo 1: Verificar se há associação entre a composição da microbiota do mecônio e adequação do peso para idade gestacional e momento de *catch up* do perímetro cefálico no seguimento após a alta

Artigo 2: Realizar avaliação antropométrica, incluindo dobras cutâneas bicipital e subescapulare comparar crescimento e adiposidade de crianças nascidas prematuras de baixo peso à crianças nascidas a termo, saudáveis durante o primeiro ano de vida

6 METODOLOGIA

6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Coorte perspectiva com prematuros baixo peso, comparados à nascidos a termo, saudáveis.

6.2 PERÍODO DE COLETA DE DADOS

Fevereiro de 2016 a julho de 2017.

6.3 POPULAÇÃO

Foram acompanhados 63 recém-nascidos prematuros de baixo peso (idade gestacional < 33 semanas) e um grupo controle de 29 recém-nascidos a termo saudáveis, todos nascidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre recrutados para o projeto Associação entre microbiota fetal, prematuridade e morbidades do recém-nascido pré-termo (aceito no CEP da instituição e registrado sob número 140009).

6.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Crianças prematuras (IG <32semanas), participantes do grupo investigado do projeto Associação entre microbiota fetal, prematuridade e morbidades do recém-nascido pré-termo com alta da UTI Neonatal e que seguiram acompanhamento, com pelo menos 3 consultas no Ambulatório de Seguimento de Prematuros do Hospital de Clínicas, durante o primeiro ano de vida;

- Crianças nascidas a termo, saudáveis participantes do grupo controle do projeto Associação entre microbiota fetal, prematuridade e morbidades do recém-

nascido pré-termo que foram contatadas durante o primeiro ano de vida, evisitadas pela pesquisadora Ana Carolina Terrazzan (ACT) para avaliação aos 12 meses.

6.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Crianças com mal formação congênita e erros inatos do metabolismo;
- Pacientes cujos pais e/ou responsáveis não aceitaram participar do projeto de *follow up*.

6.6 LOGÍSTICA

Para este estudo foi realizado acompanhamento e avaliação nutricional de crianças prematuras de baixo peso (grupo caso) e crianças nascidas a termo, saudáveis (grupo controle). Ambos os grupos estavam incluídas no estudo Associação entre microbiota fetal, prematuridade e morbidades do recém-nascido pré-termo (aceito no CEP da instituição e registrado sob número 140009), no qual, foram feitas coletas de mecônio para sequenciamento genético do microbioma e gerado o banco de dados do microbioma (descrição a seguir). O banco de dados do microbioma foi utilizado em combinação ao banco de dados antropométricos, posteriormente ao período de acompanhamento e avaliação nutricional.

As crianças foram direcionadas ao seguimento, conforme descrito abaixo:

6.6.1 Grupo casos – recém-nascidos prematuros

No momento de alta da UTI Neonatal os recém-nascidos foram encaminhados ao Ambulatório de Seguimento de Prematuros do Hospital de Clínicas, conforme protocolo da instituição. Na primeira consulta ambulatorial do

recém-nascido os pais e/ou responsáveis foram convidados a participar do estudo, por meio de leitura e explicação do Termo de Consentimento Livre e esclarecido.

A coleta de dados do grupo de prematuros foi realizada durante as consultas no Ambulatório de Seguimento, não sendo necessário portanto agendar consulta especificamente para a pesquisa. Conforme o protocolo de atendimentos do serviço, todas as crianças são atendidas mensalmente até os 6 meses de idade corrigida e a partir desta idade a cada 2 meses até os 12 meses de idade corrigida, momento no qual foi realizada avaliação nutricional.

A rotina de assistência prevê aferição antropométrica (peso, comprimento, perímetro cefálico e braquial) e de dados do tipo de leite consumido pela criança (leite materno, fórmula láctea infantil materno ou outros tipos de leite), bem como momento de início da alimentação complementar (papa de fruta, papa principal ou alimentação da família). Os pais/ responsáveis foram entrevistados, e as crianças avaliadas pela pesquisadora ACT. Aos 12 meses de idade corrigida, além das aferições básicas, foram aferidas as dobras cutâneas tricípital e subescapular .

6.6.2 Grupo controle – recém-nascidos a termo

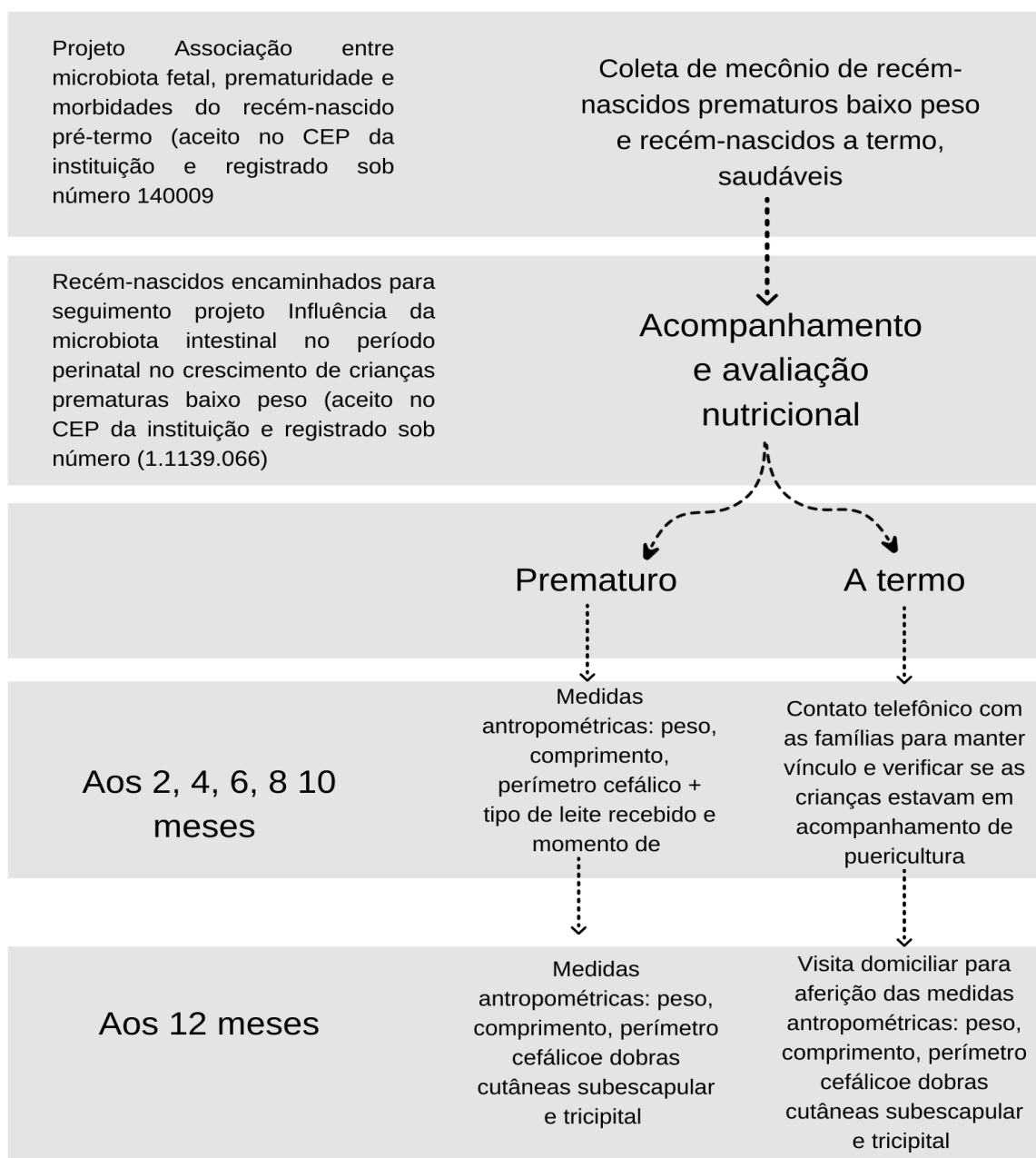
No momento de alta hospitalar os pais e/ou responsáveis foram convidados a participar do estudo de seguimento, por meio de leitura e explicação do Termo de Consentimento Livre e esclarecido.

A pesquisadora Ana Carolina Terrazzan manteve contato telefônico com as famílias com periodicidade de 2 meses, com objetivo de manutenção do vínculo com os participantes da pesquisa. Bem como, para garantir a atualização de informações de contato como telefones e endereços. Ainda, durante o contato telefônico os pais e/ou responsáveis foram questionados sobre tipo de leite consumido pela criança

(leite materno, fórmula substituta do leite materno ou outros tipos de leite) e, também, sobre o momento de início da alimentação complementar (papa de fruta, papa principal ou alimentação da família).

Aos 12 meses de idade, foi realizada visita domiciliar para a realização da avaliação antropométrica (peso, comprimento, perímetro cefálico, perímetro braquial, dobras cutâneas tricipital e subescapular).

Figura 1– Organograma – logística de coleta de dados



6.7 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES A SEREM REALIZADAS E COLETA DE DADOS

6.7.1 Avaliação nutricional

Antropometria

Para a avaliação antropométrica foram feitas as seguintes aferições:

- Peso (kg) e comprimento (cm) para cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC/ Kg/m²)
- Perímetro cefálico (cm)
- Dobra cutânea tricipital (mm)
- Dobra cutânea subescapular (mm)
- Circunferência do braço (cm)

A aferição das dobras cutâneas foi realizada em triplicata e a médias das medidas utilizada para o banco de dados.

Para aferição de todas as medidas as crianças estavam despidas e sem fraldas. Quando em dias muito frios, as balanças eram taradas com peça de roupa para garantir o máximo de fidedignidade dos dados. As técnicas para aferição seguiram manual do SISVAN (2011)

Utilizados os seguintes instrumentos:

- Balança pediátrica eletrônica para aferição do peso (Marca: Filizolla®) para as crianças prematuras que comparecem ao ambulatório
- Balança eletrônica, com função tara “mãe/bebê” para aferição do peso (Marca Wiso®) para as crianças que receberam visita domiciliar (grupo controle)
- Régua para medição de estatura (estadiômetro infantil - Avanutri®);

- Fita métrica inelástica para aferição do perímetro cefálico e perímetro braquial (Cescorf ®);
- Adipômetro digital (PrimeMed®).

Utilizado *Fenton Growth Calculator for Preterm Infants* (2013), para gerar escores-z dos dados de nascimento dos recém-nascidos prematuros, separados por gênero. E programa WHO Anthro, versão 3.2.2 (2011), para gerar escores-z do período de *follow up*, levando em consideração gênero e idade, sendo a mesma corrigida para os prematuros.

6.7.2 Variáveis- alimentação (complementares ao estudo; fazem parte da rotina do Ambulatório de Follow Up)

Foram coletados os seguintes dados:

- Tipo de leite recebido (leite materno e/ ou fórmula substituta do leite materno, leite de vaca) na alta, e bimensalmente até 12 meses;
- Momento de início da alimentação complementar (papa de fruta, papa principal)

Todos os dados coletados foram computados em base de dados do Excel®, e posteriormente submetidos a análise estatística com o auxílio do programa PASW (SPSS), versão 20.0 (*Statistical Package for Social Sciences*).

6.7.3 Variáveis em estudo – para caracterização da amostra

Para caracterização demográfica da amostra, dados gestacionais e de nascimento foram prospectivamente obtidos. Quando necessário, foi realizada consulta através do prontuário online HCPA.

- Dados da gestação/ dados maternos: presença de Pré eclampsia, presença de DMG, idade materna, número de consultas pré-natal, número de filhos;
- Dados do nascimento: sexo, peso, comprimento, perímetro cefálico, idade gestacional, adequação de peso para idade gestacional, índice de Apgar;
- Co-variáveis: Tipo de leite recebido (leite materno, leite de vaca, fórmula infantil) em momentos específicos do primeiro ano de vida (aos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses);
- Variáveis independentes: Dados antropométricos: peso, comprimento, perímetro cefálico, perímetro braquial e dobras cutâneas tricipital e bicipital(aos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses).

Para acompanhamento dos indivíduos foi utilizada um formulário de pesquisa individual (APÊNDICES1 e 2). Os dados obtidos foram inseridos em uma base de dados, e posteriormente submetidos à análise estatística.

6.7.4 Coleta mecônio

A primeira eliminação de mecônio do recém-nascido foi obtida com coleta estéril e armazenada em tubo plástico com capacidade para 15ml. As amostras foram imediatamente congeladas e armazenadas em botijão criogênico até o momento do transporte para o laboratório onde foi realizada a extração do DNA microbiano e posterior análise da composição da comunidade microbiana. Para os recém-nascidos prematuros, essa coleta obrigatoriamente ocorreu antes do recém-nascido receber qualquer alimentação por via enteral, uma vez que há estudos que sugerem diferenças na colonização microbiana de crianças alimentadas com leite

materno em relação às aquelas alimentadas com fórmula (FANARO, 2003). Há diversas etapas nesse processo: técnica de extração do DNA, Amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento, comparação entre as comunidades microbianas, identificação dos microrganismos responsáveis pela variação entre as amostras e, por fim, a classificação filogenética, para posterior lançamento dos dados em banco de dados apropriado pelos demais pesquisadores envolvidos.

6.7.5 Técnica para extração do DNA

O DNA microbiano total foi extraído a partir de amostras de 200-300mg de fezes usando o kit QIAamp DNA Stool[®] Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante modificado pela inclusão de uma etapa adicional de lise mecânica. A pureza DNA genômico total foi analisada com auxílio de espectrofotômetro tipo NanoVueTM[®] através da medição da razão entre absorvância a 260 e 280nm. A concentração do DNA total foi quantificada com o uso de fluorômetro tipo Qubit[®] 2.0. Em posse da concentração de DNA total, todas as amostras foram diluídas de acordo com aquela de menor concentração para que cada amostra contenha a mesma concentração de DNA. O DNA foi congelado a -80°C até o momento da amplificação do gene 16S e sequenciamento.

6.7.6 Amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento

A diversidade, abundância e estrutura das comunidades microbianas foram estimadas com base na metodologia proposta por Roesch e colaboradores (2007), Fulthorpe e colaboradores (2008), para o sequenciamento do gene 16S por meio da plataforma PGMTM ION TORRENT. Para cada amostra de DNA microbiano foi amplificado o gene 16S a partir dos oligonucleotídeos iniciadores universais,

recomendados pelo Human Microbiome Project, 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), para amplificação de microrganismos do domínio *Bacteria* e *Archaea*. Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados juntamente com os adaptadores A-Key (5'CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG'3) e P1-Key (5'CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT'3) para a obtenção de uma sequência de oligonucleotídeos iniciadores única (*primer fusion*). Múltiplas amostras foram analisadas em uma única utilização do instrumento PGM™ e para tanto foram adicionados, a região 5' dos oligonucleotídeos iniciadores, 10 bases conhecidas (código de barras) que servirão para posterior identificação da origem de cada sequência segundo metodologia proposta por Hamady *et al.*, O código de 10 bases foi adicionado ao oligonucleotídeo iniciador 806R e o sequenciamento unidirecional foi feito a partir do adaptador A-key. Uma reação de PCR foi feita para cada DNA isolado das amostras com um diferente código de barras por reação. As condições utilizadas na reação foram: 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 45s para desnaturação, 50°C por 1min. para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, e 72°C por 1,5 min. para extensão; seguidos por 72°C por 10 minutos de extensão final. O produto final das reações de PCR foi purificado com kit para purificação de PCR Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). A concentração final do DNA produto da PCR foi quantificada por meio do uso o Bioanalyzer e o kit Agilent High Sensitivity (GE) seguindo as recomendações do fabricante. Finalmente as reações foram combinadas em concentração equimolar para criar uma mistura composta por fragmentos do gene 16S amplificado de cada amostra de DNA. Esta amostra composta foi então sequenciada utilizando o chip Ion 316™. Para que não haja uma

diminuição drástica do número de sequências por amostras, causada pelo uso de múltiplas amostras por corrida, foram utilizados no máximo 30 amostras por chip.

As sequências de nucleotídeos obtidas pelo método descrito acima foram analisadas por meio da utilização de um conjunto de ferramentas de bioinformática sumarizadas no programa computacional PANGEA desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa e disponível para download no site <http://pangea-16s.sourceforge.net/> (GIONGO, 2010). Também foi utilizado, para a complementação das análises, os scripts disponibilizados no pacote QIIME (CAPORASO, 2010) ou Mothur (Schloss *et al.*, 2009) de acordo com a necessidade da aplicação.

Os passos adotados para a análise foram baseados nas recomendações propostas por Lemos e colaboradores (2011). As sequências obtidas foram inicialmente avaliadas quanto a qualidade das bases sequenciadas. As bases localizadas na parte terminal da sequência que apresentaram score Phred menor ou igual a 25 foram removidas. Também foram removidas do banco de dados aquelas sequências que apresentaram tamanho inferior a 200 bases e aquelas cujo valor médio do Phred score for menor que 27 (em uma janela de 50 bases). As sequências de boa qualidade foram posteriormente separadas em diferentes grupos de acordo com o código de 10 bases sendo criado um arquivo para as sequências provenientes de cada amostra.

6.7.7 Comparação entre as comunidades microbianas

Para a comparação global e análise de diferenças significativas entre as comunidades bacterianas avaliadas, as sequências do gene 16S foram inicialmente agrupadas em unidades taxonômicas definidas por 97% ou maior similaridade entre si usando o programa PANGEA. Sequências representativas de cada grupo (mais

longas de cada unidade taxonômica) foram selecionadas e agrupadas em um arquivo único o qual foi utilizado nas análises subsequentes. A partir do arquivo contendo as sequências representativas de cada grupo e de todas as amostras analisadas, uma árvore filogenética foi construída utilizando o programa MUSCLE pelo método de agrupamento aglomerativo UPGMA. A análise da diversidade microbiana em termos quantitativos (número de unidades taxonômicas encontradas) e qualitativos (presença ou ausência de grupos bacterianos específicos) foi feita por meio da ferramenta QIIME[®] (2010). Esta ferramenta utiliza a árvore filogenética gerada pelo programa MUSCLE e um arquivo de texto contendo o número de sequências encontradas em cada unidade amostral contida na árvore filogenética. Usando a métrica UniFrac[®], foi feita a análise de Coordenadas Principais (PCoA) a agrupa as amostras de acordo com sua similaridade. Para testar a robustez dos agrupamentos em relação a suficiência amostral, foi utilizada a técnica de Jackknifing na qual os agrupamentos do PCoA são gerados usando sub-sets de sequências aleatoriamente selecionadas em cada amostra com 100 repetições.

6.7.8 Identificação dos microrganismos responsáveis pela variação entre as amostras

Os testes propostos anteriormente irão identificar grupos microbianos similares ou dissimilares entre si. Tendo encontrado diferenças entre as comunidades microbianas avaliadas em cada amostra, o próximo passo seria perguntar qual microrganismo contribui para o estabelecimento desta diferença. Para a identificação dos microrganismos responsáveis pela variação detectada entre comunidades microbianas (se houver diferença detectada pela Análise de Coordenadas Principais, e teste de significância), foi adotada a seguinte metodologia

descrita por Roesch e colaboradores (2007) e implementada no programa PANGEA®.

As bibliotecas (arquivos contendo as sequências de nucleotídeos) do gene 16S foram inicialmente agrupadas em um único arquivo e cada sequência foi classificada em unidades taxonômicas a 97% de similaridade. O número de sequências encontrado em cada UT e em cada amostra foram utilizados para a construção de uma matriz de dados sendo as linhas representadas pelas UT's e as colunas representadas pelas amostras. A matriz resultante foi utilizada na determinação do grau de sobreposição entre membros de comunidades microbianas distintas baseado na abundância de cada UT. Para determinar se o número de unidades taxonômicas encontradas em cada amostra é significativamente diferente, foi utilizado o teste de chi-quadrado (baseado em 50.000 interações de Monte Carlo) do qual foi obtido um valor P para cada unidade taxonômica. As unidades taxonômicas que apresentaram diferença significativas foram filogeneticamente classificadas para a determinação do organismo mais provável do qual a sequência foi originada.

6.7.9 Classificação filogenética das sequências do gene 16S

As sequências foram classificadas por meio da ferramenta de classificação disponível no Greengenes *web site* (<http://greengenes.lbl.gov/>) instalada localmente. As sequências foram submetidas a uma ferramenta que irá alinhar as sequências originais contra um banco de dados de mais de 188.073 sequências do 16S. Uma vez alinhadas, as sequências foram filogeneticamente classificadas de acordo com o organismo mais próximo presente no banco de dados. Alternativamente, poderá se

utilizar a pesquisa Blast contra um banco de dados contendo apenas sequenciais conhecidas do gene 16S.

Toda a técnica para extração do DNA, amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento, assim como a classificação filogenética dos genes do 16SrRNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAMPA, sob a responsabilidade do Dr Luiz Roesh.

6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos em média \pm desvio-padrão (DP), valores mínimo e máximo, ou medianas e interquartis (p25-p75). Diferenças entre as medianas calculadas através de teste de Mann-Whitney. As diferenças entre grupos calculadas por teste T ou Qui Quadrado, ou ANOVA quando avaliados mais de dois grupos

O banco de dados do microbioma foi importado para o ambiente R (R Development Core Team, 2008) e para avaliar as diferenças estruturais na comunidade microbiana, uma matriz de dissimilaridade composicional foi gerada com base nas distâncias euclidianas entre amostras usando o pacote “Phyloseq”® (McMurdie e Holmes, 2013). A matriz foi utilizada em uma Análise de Variância Multivariada não-paramétrica (perMANOVA) com a função Adonis disponível no pacote vegano (Oksanen *et al.*, 2015) para a detecção de variáveis de confusão. Para estimar a alfa diversidade, cálculo de dominância microbiana e o índice de diversidade de Shannon foram obtidos e plotados usando o pacote “phyloseq” (McMurdie e Holmes, 2013). O nível de significância estatística para qualquer uma das análises foi considerado para um valor de alfa = 0,05.

6.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo atendeu às exigências da resolução cns 466/2012, que regulamenta a pesquisa com seres humanos. O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética do hospital de clínicas de porto alegre (1.1139.066), e os dados somente foram coletados daqueles pacientes cujos pais ou responsáveis aceitaram o convite para participação no estudo, e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (apêndices 3 e 4).cada paciente foi identificado por código de número, preservando assim a identidade dos mesmos.

7 REFERÊNCIAS

- AAGAARD, K. *et al.* The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**. 2014; 6:237ra65.
- ALEXANDER GR *et al.* A United States national reference for fetal growth. **Obstetrics and Gynecology**. 1996;87:163-8.
- ALEXANDER VN *et al.* Antibiotic exposure in the newborn intensive care unit and the risk of necrotizing enterocolitis. **The Journal of Pediatrics**. 2011;159:392-7.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. The medical home. **Pediatrics**. 2002; 110:184–186.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on fetus and newborn. Hospital discharge of the high-risk neonate. **Pediatrics**. 2008;122:1119-1126.
- ANDERSON, DM. Nutrição para o bebê de baixo peso ao nascer. *In*: MAHAN, Kathlenn; ESCOT-STUMP, Sylvia. **Krause alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Rocca, 2002.p.205-228.
- ANGELAKIS, E; RAOULT, D. Gut microbiota modifications and weight gain in early life. **Human Microbiome Journal**. 2018;8:10-14.
- ARBOLEYA, S. *et al.* Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. **The Journal of Pediatrics**. 2014; 166:538-44.
- ARRIETA, MC *et al.* The intestinal microbiome in early life: health and disease. **Frontiers in Immunology**. 2014;427:1-18.
- BARKER DJP. Fetal origins of coronary heart disease. **The BMJ**. 1995;311:171-174.
- BARKER DJP. Adult consequences of fetal growth restriction. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. 2006;49:270–283.
- BARKER, DJP. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**. 2007; 261:412–417.
- BECK S., *et al.* The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. **Bull World Health Organ**. 2009;88:31-8.
- BEDOGNI G. *et al.* Sensitivity and specificity of body mass index and skinfold thicknesses in detecting excess adiposity in children aged 8-12 years. **Annals of Human Biology**. 2013;30:132-139.
- BLANTON LV, CHARBONNEAU MR, SALIH T. Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. **Science**.

2016;351:830-839.

BUTEL MJ *et al.* Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. **The Journal of Pediatrics**. 2017;44:577-582.

CAPORASO JG, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**. 2010; 7:335-336.

CARDOSO, LEB; FALCÃO, MC. Importância da avaliação nutricional de recém-nascidos pré-termo por meio de relações antropométricas **Revista Paulista de Pediatria**. 2007;25:135-141.

CHAWANPAIBOON *et al.* Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. **Lancet Glob Health**. 2019; e37-e46.

CHERNIKOVA, DA *et al.* The premature infant gut microbiome during the first 6 weeks of life differs based on gestational maturity at birth. **Pediatric Research**.2018;84:71–79.

CHONG CYL., BLOOMFIELD, FH. O’SULLIVAN, JM. Factors affecting gastrointestinal microbiome development in neonates. **Nutrients**. 2018;10: E274-291.

CHU DM *et al.* Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. **Nature Medicine**. 2017; .314–326.

CHU *et al.* Bacterial community structure and functional contributions to emergence of health or necrotizing enterocolitis in preterm infants. **Microbiome**. 2013; 1:20.

CONG X., *et al.* Gut microbiome developmental patterns in early life of preterm infants: impacts of feeding and gender.**Plos One**. 2016; 11: e0152751.

COOKE, RJ. Improving growth in preterm infants during initial hospital stay: principles into practice. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**. 2016;101:F366–F370.

COTTEN CM *et al.* Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants.**Pediatrics**.2009;123:58–66.

D’AGOSTINO, JA. An evidentiary review regarding the use of chronological and adjusted age in the assessment of preterm infants. **Journal for Specialists in Pediatric Nursing**. 2010; 15: 26-32.

De CUNTO, A., *et al.* Can body mass index accurately predict adiposity in newborns? **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**. 2014; 99: F238–F239.

- DIGGIKAR S. Neonatal microbiome: A complex, invisible organ and its evolving role in neonatal illness and beyond. **Journal of Clinical Neonatology**. 2019;8:5-9.
- DISHAW LJ, Cannon JP, Litman GW, Parker W: Immune-directed support of rich microbial communities in the gut has ancient roots. **Developmental and Comparative Immunology**. 2014; 47:36–51.
- DOMINGUEZ-BELLO MG. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. **Gastroenterology**. 2011; 140:1713–1719.
- DOYLE LW, Anderson PJ. Adult outcome of extremely preterm infants. **Pediatrics**, 2010. 126; 342–51.
- EHRENKRANZ RA. Early nutritional support and outcomes in ELBW infants. **Early Human Development**, 2010. 10:21-25.
- EHRSTROM SM., *et al.* Signs of chronic stress in women with recurrent candida vulvovaginitis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 2005; 193:1376-1381.
- FALCÃO, MC.; CARDOSO, LEMB. Avaliação e monitorização nutricional. *In*: FALCÃO, Mário Cícero; FEFERBAUM, Rubens. **Nutrição do recém-nascido**. São Paulo: Atheneu, 2003.p.55-66.
- FANARO S, CHIERICI R, GUERRINI P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. **Acta Paediatrica Supplement**. 2003; 91:48-55.
- FENTON, TR; KIM, JH. A systematic review and meta-analysis to revise the fenton growth chart for preterm infants. **BMC Pediatrics**. 2013; 20:13-59.
- FIGUEIRA, BBD. Avaliação nutricional. *In*: COSTA, Helenice de Paula Fiod; MARBA, Sérgio Tadeu. **O recém-nascido de muito baixo peso**. São Paulo: Atheneu, 2004.p203-214. Série Atualizações Pediátricas.
- FRONDAS-CHAUTY A, *et al.* Deficit of fat free mass in very preterm infants at discharge is associated with neurological impairment at age 2 years. **The Journal of Pediatrics**. 2018;196:301-304.
- FULTHORPE RR, *et al.* Distantly sampled soils carry few species in common. **The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**. 2008; 2: 901–10.
- FUNKHOUSER LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. **PLoS Biol**. 2013;11:e1001631.
- GÄDDLIN PO. Follow-up studies of very low birthweight children in Sweden. **Acta Paediatrica**. 2011; 100: 940-949.
- GHODS E, *et al.* Head circumference catchup growth among preterm very low birth weight infants: effect on neurodevelopmental outcome. **Journal of Perinatal Medicine**. 2011; 39: 579–586.

GIABICANI *et al.* Diagnosis and management of postnatal fetal growth restriction. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2018; 32:523-534.

GIANNÌ M L, *et al.* Adiposity in small for gestational age preterm infants assessed at term equivalent age. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**. 2009; 94: F368-F372.

GIONGO A, *et al.* PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. **The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**. 2010; 5:1-10.

GOSALBES MJ. Metagenomics of human microbiome: beyond 16s rDNA. **Clinical Microbiology and Infection**. 2012; 18:S47–S49.

GOSWAMI I, *et al.* Length normalized indices for fat mass and fat-free mass in preterm and term infants during the first six months of life. **Nutrients**. 2016; 8:E417.

GREENWOOD C., *et al.* Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of enterobacter. **The Journal of Pediatrics**. 2014; 165:23–29.

GREER FR. Long-term adverse outcomes of low birth weight increased somatic growth rates, and alterations of body composition in the premature infant: review of the evidence. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 2007;45:S147–51.

GREGORY KE, *et al.* Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants. **Microbiome**. 2016; 30;4(1):68.

GRIER A, *et al.* Impact of prematurity and nutrition on the developing gut microbiome and preterm infant growth.. **Microbiome**. 2017; 11;5(1):158.

GROER MW, Luiano AA Dishaw LJ, *et al.* Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. **Microbiome**2. 2014; 2:38.

HAMADY M *et al.* Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. **Nature Methods**. 2008; 5:235-237.

HARMSSEN, B. *et al.* Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 2000; 30: 61-67.

HOOPER LV, MACHPHERSON A. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**. 2010; 10:159–169.

HORBAR JD *et al.* Weight growth velocity and postnatal growth failure in infants 501 to 1500 grams: 2000–2013. **Pediatrics**. 2015;136:e84–92.

HOWSON CP, KINNEY MV, LAWN JE. Born too soon: the global action report on preterm birth. Save the Children.**World Health Organization**. 2012. Disponível em: http://www.who.int/pmnch/media/news/2012/preterm_birth_report/en/index1.html.

Acesso em: 10/05/2018.

JASAREVIC E *et al*. Alterations in the vaginal microbiome by maternal stress are associated with metabolic reprogramming of the offspring gut and brain. **Endocrinology**. 2015;156:3265–3276.

JIMENEZ E *et al*. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Current Microbiology**.2005; 51: 270–274

JIMÉNEZ E *et al*. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Research in Microbiology**. 2008 ;159:187-193.

JONES-SMITH JC *et al*. Early life growth trajectories and future risk for overweight. **Nutrition and Diabetes**. 2013; 3(2): e60.

KEUNEN K *et al*. Impact of nutrition on brain development and its neuroprotective implications following preterm birth.**The Journal of Pediatric Research**. 2014;77:148-55.

LEMOLA S. Long-term outcomes of very preterm birth:mechanisms and interventions.**European Psychologist**. 2015;20: 128–37.3.

LEMOS LN, *et al*. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of Microbiological Methods**. 2011; 86: 42-51.

LIDZBA K *et al*. Growth in very preterm children: head growth after discharge is the best independent predictor for cognitive outcome.**Early Human Development**. 2016; 103:183-188.

LIU L, OZA S, HOGAN D, CHU Y, PERIN J, ZHU J, *et al*. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals.**TheLancet**. 2016;388:3027-3035.

LIU J. *et al*.Body mass index trajectories during infancy and pediatric obesity at 6 years. **Annals of Epidemiology**. 2017; 27: 708.e1–715.e1.

LU, L; CLAUD, EC. Intrauterine inflammation, epigenetics, and microbiome influences on preterm infant health. **Current Pathobiology Reports**. 2018; 6:15-21.

LUDINGTON-HOE M, GITTNER LS, HALLER HS. A pilot study: does obesity begin in the first year of life? **Clinical and Experimental Pediatrics**.2013; 52:507.

MACPHERSON AJ, AGÜERO MC, GANAL-VONABURG SC. How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. **Nature Reviews Immunology**. 2017;17:508-517.

MALHOTRA A, *et al.* Neonatal morbidities of fetal growth restriction: pathophysiology and impact. **Frontiers in Endocrinology**. 2019; (7) 10:55.

MATHAI S, *et al.* Increased adiposity in adults born preterm and their children. **Plos One**. 2013; 20;8: e81840

MBAKWA, CA *et al.* Early life antibiotic exposure and weight development in children. **The Journal of Pediatric Research**. 2016; 176: 105–113.e2.

MORO GE, *et al.* Human milk in feeding premature infants: consensus statement. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 2015; 61:S16–S19.

MSHVILDADZE M, *et al.* Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. **The Journal of Pediatric Research**. 2010;156:20–25.

OLM MR, *et al.* Identical bacterial populations colonize premature infant gut, skin, and oral microbiomes and exhibit different in situ growth rates. **Genome Research**. 2017; 27: 601–612.

OLUTEKUNBI OA, *et al.* Skinfold thickness measurement in term nigerian neonates: establishing reference values. **International Journal of Pediatrics**. 2018; (2)1:10.

ORTON J, *et al.* NICU graduates: the role of the allied health team in follow-up. **Pediatric Annals**. 2018; 47: e165-e171.

PAIXÃO LA., CASTRO FFS. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**. 2016; 14: 85-96.

PLATT MJ. Outcomes in preterm infants. **Public Health**. 2014; 128: 399–403.

PLAZA-ZAMORA J, *et al.* Polyamines in human breast milk for preterm and term infants. **British Journal of Nutrition**. 2013; 10:524–528.

PRINCE AL, *et al.* The placental microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 2016; 214(5):627.e1-627e16.

QIN J *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**. 2010;464: 59–65.

RAMEL, SE. *et al.* Greater early gains in fat-free mass, but not fat mass, are associated with improved neurodevelopment at 1 year corrected age for prematurity in very low birth weight preterm infants. **The Journal of Pediatrics**. 2016; 173:108–115.

ROBERTSON RC *et al.* The human microbiome and child growth: first 1000 days and beyond. **Trends in Microbiology**. 2019; 27:131-147.

ROESCH LF, *et al.* Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**. 2009; 3(5):536-548.

ROESCH LF, *et al.* Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**. 2007;1(4):283-290.

ROGGERO P *et al.* Small for gestational age preterm infants: nutritional strategies and quality of growth after discharge. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**. 2011;24:sup1, 144-146.

ROGIER EW *et al.* Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2014, 111:3074–3079.

ROSENBERGK, TREVATHAN WR. Evolutionary perspectives on cesarean section. **Evolution, Medicine and Public Health**. 2018;1:67–81

RUGOLO LM. Crescimento e desenvolvimento a longo prazo do prematuro extremo. **The Journal of Pediatrics**. 2005;81:S101-10.

SALT A, REDSHAW, M. Neurodevelopmental follow-up after preterm birth: follow up after two years. **Early Human Development**. 2006. 82:185-97.

SAUER, P. J. Can extrauterine growth approximate intrauterine growth? Should it? **The American Journal of Clinical Nutrition**. 2007; 85(2): 608S-613S.

SCHIBLER KR. Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of enterobacter. **The Journal of Pediatrics**. 2014;165:23–29.

SCHLOSS PD *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**. 2009; 75: 7537-7541.

SCHMELZLE, H. R, FUSCH C. Body fat in neonates and young infants: validation of skinfold thickness versus dual-energy x-ray absorptiometry. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 2002;76: 1096-1100.

SHARMA *et al.* Intrauterine growth restriction: antenatal and postnatal aspects. **Clinical Medicine Insights: Pediatrics**. 2016;10 67–83.

SHI YC, *et al.* Initial meconium microbiome in chinese neonates delivered naturally or by cesarean section. **Scientific Reports**. 2018; 8(1):3255.

SILVEIRA, RC. Como organizar o seguimento do prematuro. *In: Seguimento Ambulatorial do Prematuro de Risco*. Sociedade Brasileira de Pediatria. 2012. p.3-4

SILVEIRA RC, PROIANOY RS. Crescimento nos primeiros anos de vida de recém-nascido de muito baixo peso. *In: Programa de Atualização em Neonatologia – PRORN*. Artmed/Panamericana Editora Ltda.2010;vC7M4, p. 49-86.

SILVEIRA, RC; PROCIANOY, RS. Preterm newborn's postnatal growth patterns: how to evaluate them. **Jornal de Pediatria**. 2019; 95S1:42-48.

SOBAIH BH. Neonatal follow-up program: Where do we stand? **Sudanese Journal of Paediatrics**. 2012;12(1):21-26.

TANAKA M *et al*. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. **Allergology International**. 2017; 6: 515-522.

TANNOCK, GW *et al*. Comparison of the compositions of the stool microbiotas of infants fed goat milk formula, cow milk-based formula, or breast milk. **Applied and Environmental Microbiology**..2013;79: 3040-3048.

TERRAZZAN AC, PROCIANOY RS, SILVEIRA RC. Neonatal cord blood adiponectin and insulin levels in very low birth weight preterm and healthy full-term infants. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2014; 27:616-20.

THUREEN PJ. The neonatologist's dilemma: catchup growth or beneficial undernutrition in very low birth weight infants-what are optimal growth rates? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 2007;45(Suppl. 3):S152–4.

TOFTLUND LH, *et al*. Catchup growth, rapid weight growth, and continuous growth from birth to 6 years of age in very-preterm-born children. **Neonatology**. 2018; 114: 285–293.

TORRAZZA R; NEU J. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. **Journal of Perinatology**. 2011; 31: S29–S34.

TURNBAUGH PJ *et al*. The human microbiome project. **Nature**. 2007; 449: 804-10.

UNDERWOOD MA *et al*. Human milk oligosaccharides in premature infants: absorption, excretion, and influence on the intestinal microbiota. **Pediatric Research**. 2015; 78:670–677.

UNDERWOOD MA, *et al*. Prebiotic oligosaccharides in premature infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**.2014; 58:352–360.

UTHAYA S, *et al*. Altered adiposity after extremely preterm birth. **Pediatric Research**. 2005;57:211-215.

VILLAR J, *et al*. Monitoring the postnatal growth of preterm infants: a paradigm change. **Pediatrics**.2018; 141: e20172467.

VOGEL, JP *et al.* The global epidemiology of preterm birth. **Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**. 2018;52:3e12.

WALKER WR. *et al.* The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? **Pediatric Obesity**. 2017; 12 :3–17.

WENDEL D *et al.* Body composition estimation using skinfolds in children with and without health conditions affecting growth and body composition. **Annals of Human Biology**. 2017; 44(2):108-120.

WHO Expert Committee on Maternal and Child Health and World Health Organization. Public health aspects of low birth weight : third report of the Expert Committee on Maternal and Child Health [meeting held in Geneva from 21 to 26 November 1960]. Geneva : **World Health Organization**. 1961. Disponível em <http://www.who.int/iris/handle/10665/40487>. Acesso em 10/10/2018.

WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1977;56(3):247-253.

8 RESULTADOS

8.1 ARTIGO 1 - MECONIUM MICROBIOME AND ITS RELATION TO NEONATAL GROWTH AND HEAD CIRCUMFERENCE CATCH-UP IN LOW-BIRTH WEIGHT PRETERM INFANTS

Ana Carolina Terrazzan Nutricionist Ms¹, Renato S Procianoy MD PhD², Luiz Roesch PhD³, Andrea Lúcia Corso MD PhD⁴, Rita C Silveira MD PhD⁵

¹ PhD Student, Postgraduate Program in Child and Adolescent Health - PPGSCA, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS

² Neonatal Intensive Care Unit Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS; Full Professor of Pediatrics - Postgraduate Program in Child and Adolescent Health - PPGSCA, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS

³ Interdisciplinary Center for Biotechnology Research ± CIP-Biotec Federal University of Pampa, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴ Neonatal Intensive Care Unit - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS; Professor of Pediatrics- Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS

⁵ Neonatal Intensive Care Unit Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS; Head of Follow-up Program- Hospital de Clínicas of Porto Alegre, RS; Associated Professor of Pediatrics- Postgraduate Program in Child and Adolescent Health - PPGSCA, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from Bill and Melinda Gates Foundation, CNPQ and DECIT / Health Ministry, Brazil, Grant number 401596/2013-3. This study was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES), Finance Code 001. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

Abstract

The purpose of this study was identify an association between meconium microbiome, extra-uterine growth restriction, and head circumference catch-up. Materials and methods: Prospective study with preterm infants born <33 weeks gestational age (GA), admitted at Neonatal Unit and attending the Follow-Up Preterm Program of a tertiary hospital. Excluded outborn infants; presence of congenital malformations or genetic syndromes; congenital infections; HIV-positive mothers; and newborns whose parents or legal guardians did not authorize participation. Approved by the institution's ethics committee. Conducted 16S rRNA sequencing using PGM Ion Torrent meconium samples for microbiota analysis. Results: Included 63 newborns, GA 30 ± 2.3 weeks, mean weight 1375.80 ± 462.6 grams, 68.3% adequate weight for GA at birth. *Polynucleobacter* ($p=0.0163$), Gp1 ($p=0.018$), and *Prevotella* ($p=0.038$) appeared in greater abundance in meconium of preterm infants with adequate birth weight for GA. Thirty (47.6%) children reached head circumference catch-up before 6 months CA and 33 (52.4%) after 6 months CA. *Salmonella* ($p<0.001$), *Flavobacterium* ($p=0.026$), and *Burkholderia* ($p=0.026$) were found to be more abundant in meconium in the group of newborns who achieved catch-up prior to 6th month CA. Conclusion: Meconium microbiome abundance was related to adequacy of weight for GA. Meconium microbiome differs between children who achieve head circumference catch-up by the 6th month of corrected age or after this period.

Key Words: microbiome, prematurity, growth, meconium, followup, catch up, head circumference growth.

Introduction

The balance between the host and intestinal microbes is protective to health [1,2,3]. Gut microbiota is essential for suitable nutrient absorption, energy storage, and immune response, and it's also responsible for multiple metabolic tasks, including production of essential vitamins, fermentation and breakdown of oligosaccharides and production of short-chain fatty acids and gases [4,5]. However, for the microbiota to perform such tasks, the host must maintain a favorable gut environment.

The mechanisms by which microbiota formation occurs via placenta and amniotic fluid are still not fully elucidated. Some studies support the hypothesis that fetal intestinal microbiome is derived from the swallowing of amniotic fluid containing bacteria [6,7]. The mechanism related to this hypothesis is that maternal bacteria might translocate through maternal bloodstream, achieving other organs and systems, reaching amniotic fluid also [8]. Yet, more studies are needed in order to better elucidate mechanisms involved in microbiota formation via placenta and amniotic fluid [9,10].

There is evidence of a gut-brain axis, linking gut microbiota and the development of nervous system function. The maintenance of this bidirectional communication between central and enteric nervous system involves endocrine, immune and neuronal pathways and it's essential for neurological development and brain growth [11,12].

For many reasons preterm infants are also high-risk infants for impaired growth, nutrition and neurodevelopment; and the possible early dysbiosis might interfere on microbiota metabolic capacity, and consequently alter nutrient absorption, influencing growth and neurodevelopment [1,13].

A better understanding of microbiome variation may allow the early detection of a subpopulation of preterm infants at higher risk for growth and developmental impairment during follow-up. Thus, we aimed to identify and describe the composition of the microbiota of the first meconium of preterm infants. We also aimed to verify if there was an association between microbiota composition with restricted extra-uterine growth and with head circumference catch-up after discharge, both important growth variables that may influence the neurodevelopmental outcomes.

Material and methods

This was a prospective cohort study including preterm infants gestational age <33 weeks, born and admitted at the Neonatal Unit and attending the Follow-Up Preterm Program of a tertiary hospital in Porto Alegre, RS. Infants born in another hospital, presence of congenital malformations or genetic syndromes, congenital infections, and HIV+ mother were exclusion criteria. Data collection started following Institution Ethics Committee approval (140009 – nº1.388.950). Clinical data and sample characterization were prospectively recorded and associated to meconium microbiome sequencing data bank. Maternal variables studied were: maternal age, mode of delivery, maternal antibiotics, presence of urinary tract infections (urine

culture test positive and clinical signs), or clinical chorioamnionitis (maternal fever, uterine hypertonia, malodorous or purulent amniotic fluid, maternal leukocytosis or fetal tachycardia), preeclampsia, and gestational diabetes. Preeclampsia was defined as presence of hypertension (blood pressure $> 140/90$ mmHg after 20 weeks of gestation with significant proteinuria). For gestational diabetes, fasting was ≥ 92 g/dL or glycemia of ≥ 153 g/dL following oral glucose tolerance test, with onset during pregnancy. Neonatal variables: gender, birth weight, gestational age (determined by the best obstetrical estimate, including first trimester ultrasound and/or last menstrual period date, confirmed by pediatric physical examination immediately after birth), being appropriate-for-gestational-age (AGA), small-for-gestational-age (SGA: below the 10th percentile according to reference curve), intrauterine growth restriction (below 3rd percentile). We also looked at hospitalization data to verify periintrauterine leukomalacia, necrotizing enterocolitis, early and late sepsis, hospitalization after discharge, and use of anticonvulsant.

Following NICU discharge, patients were referred to the Follow-Up Program. According to the routine of the institution, all children have monthly appointments up to 6 months of corrected age. Routine also includes anthropometric measurement (weight, length, head circumference). For this study, we evaluated head circumference at 2, 4, and 6 months corrected age in order to identify those patients for whom catch-up head circumference was achieved before or after 6 months corrected age. Catch-up was defined as a ≥ 0.67 z-score variation between two consecutive z-scores [14]. Fenton Growth Calculator for Preterm Infants (2013) [15] was used to generate birth data z-scores, as well as to determine adequacy of weight for gestational age; and WHO Anthro, 3.2.2 version (2011) was used for z-scores from follow-up period. Both software take into account gender and age, with age being corrected for preterm infants. Standardized equipment for measuring the infants was used by a trained researcher (ACT). Weight was measured using a digital scale, accurate to within 5g (ELP, 25BBA, Balmak®), with the infant wearing no clothes. Length was measured to the nearest centimeter in horizontal position using a length board accurate to 0.1 cm, with the infant lying down. Head circumference was measured using a non-stretch tape, accurate to 0.1 cm, placed on the broadest part of the forehead above eyebrows, above the ears, and around the most prominent part of the back of the head.

Feeding practices, regarding type of milk the infants were receiving (mother's milk, infant formula, or cow's milk) were evaluated, from hospital discharge up to six months corrected age.

Meconium Collection Samples

After the mother or legal guardian had provided written informed consent, the first meconium passed by the infant was collected from diaper in sterile conditions, immediately stored at -80°C in a cryogenic storage Dewar, and transported to a laboratory where microbial DNA extraction and microbial community composition analysis was performed. This collection occurs mandatorily before the newborn receives any enteral feeding, as some studies suggest differences in microbial colonization between breastfed infants and formula-fed infants [16].

Microbial DNA Extraction, Amplification, and Sequencing

Microbial DNA was isolated from 180 mg of each meconium sample using the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), in accordance with manufacturer instructions. DNA quality was verified by spectrophotometry in a NanoVue™ system (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). All DNA samples were stored at -80°C until use. V4 region of 16S rRNA gene was amplified and sequenced using ION PGM™ Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), with primers 515F and 806R. Multiple samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using barcoded primers linked to adapter "A" sequence (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3') and "P1" sequence (5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-3') to obtain a primer sequence composed for the A-barcode-806R and P1-515F adapter and primers. PCR reaction final volume was 25 µL. Each mix consisted of 2U Platinum® Taq DNA High Fidelity Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 4 µL 10X High Fidelity PCR Buffer, 2 mM MgSO₄, 0.2 mM dNTPs, 0.1 µM of both primers described above, 25 µg UltraPure BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and approximately 50 ng of template DNA.

PCR conditions used were: 95 °C for 5 min, 35 cycles at 94 °C for 45 s, 56 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min, followed by 72 °C for 10 min. Resulting PCR products were purified with Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, La Brea, CA, USA) and quantified using the Qubit Fluorometer kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following manufacturer recommendations.

Finally, reactions were combined in equimolar concentrations to create a mixture composed of amplified fragments of 16S gene from each sample. This

composite sample was used for library preparation with OneTouch™ 2 Ion system using the ION™ PGM Template 400 OT2 kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sequencing was performed using commercially available ION PGM™ Sequencing 400 kit on an ION PGM™ System, using an Ion 318™ Chip v2, with a maximum of 40 samples per microchip.

Sequence Processing for Analysis

Fastq files exported from ION PGM™ system were analyzed following recommendations from Brazilian Microbiome Project (BMP) [17], using the BMP Operating System [18]. Briefly, an Operational Taxonomic Unit (OTU) table was compiled using UPARSE pipeline [19] wherein sequences were truncated at 200 base pairs and qualityfiltered using a maximum expected error cutoff of 0.5. Sequences were clustered into OTUs using a 97% similarity cutoff, and chimeric sequences were removed. Taxonomic classification was performed in QIIME software environment [20], based on UCLUST method, against Greengenes 13.5 database [21], with a confidence limit of 80%. Sampling effort was estimated using Good's coverage formula [22]. For downstream analysis, the data set was filtered by removing Chloroplast/Cyanobacteria sequences and only OTUs with more than 5 sequence reads were kept before rarefying all samples to 5379 sequences each [23].

Functional prediction for the gut microbiome was performed using PICRUST [24]. For that, the raw 16S rRNA dataset was prepared following the instructions of Langille et al. (2013) [24]. After quality filtering and trimming, OTUs were picked against the Greengenes [21] database.

Statistical Analyses

Data obtained were stored in a database constructed for this specific purpose, using Excel software. Afterwards, data were processed and analyzed using PASW (SPSS) software, 18.0 version (Statistical Package for Social Sciences). Results are expressed as mean \pm Standard Deviation (SD), minimum and maximum values, or median and interquartile (p25-p75). Differences between medians were analyzed with Mann-Whitney test. Between-groups differences were analyzed by T test, Qui Square, and ANOVA when more than two groups were analyzed.

Microbiome database was imported into R (R Development Core Team, 2008) to assess structural differences in the microbial community and detect possible confounders; a compositional dissimilarity matrix was generated based on the Bray-

curtis distances between samples using the phyloseq package [25]. The matrix was used in a nonparametric Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) with the Adonis function available in the vegan package [26]. To estimate alpha diversity, microbial dominance and Shannon diversity index were calculated and plotted using the "phyloseq" package [25]. Alpha diversity measurements were tested for normality with Shapiro-Wilk test and variables were compared by Kruskal-Wallis rank sum test. Differential abundance analysis was performed with DESeq2 [27]. The p-values were adjusted for multiple comparisons using the FDR method.

For the functional prediction of the gut microbiota, functions were categorized by the third KEGG Pathway Hierarchy Level and hypothesis testing was performed with two-sided White's non-parametric t-test. Hypothesis testing and plotting were done using STAMP [28] Only features with a difference in proportion of 0.1 (Effect size > 0.1) were considered as active.

Results

Eighty-seven samples were collected. Eleven were excluded for not being sterile, six did not have enough material for analysis, and in seven it was not possible to determine microbial DNA. In total, for this study we analyzed 63 meconium samples of preterm infants, of whom 30 (47.6%) were boys, with mean gestational age of 30 ± 2.3 weeks. Mean weight, length, and head circumference at birth were 1375.80 ± 462.6 grams, 38.0 ± 4.0 centimeters, and 27 ± 2.7 centimeters, respectively. Mean maternal age was 25.95 ± 6.5 years, and 45 (71.4%) infants were delivered by C-section. Prevalence of preeclampsia, gestational diabetes, and urinary tract infection was 16 (25.4%), 7 (11.1%), and 7 (11.1%), respectively. At discharge, mean gestational age was 38 ± 3 weeks and mean weight was 2573.05 ± 292.18 grams.

Forty-nine (68.3%) were AGA, and of these 57.14% (n=36) were also discharged AGA. Thirteen (20.63%) were born AGA and were SGA at discharge. Twelve (19.4%) were born SGA and were discharged also SGA. Only two (3.17%) of those born SGA were LGA at discharge (this group was excluded from data analysis, because of its limited size). The growth pattern was significantly higher among the AGA neonates. Regarding use of breast milk or formula during the hospital stay, no difference was found according to adequacy of weight for gestational age at birth and discharge. (Table 1)

Table 1. Clinical characteristics of preterm infants according to adequacy of weight for gestational age at birth and discharge

Variables	AGAbirth-AGAdischarge (n=36)	AGAbirth-SGAdischarge (n=13)	SGAbirth-AGAdischarge (n=12)	SGAbirth-LGAdischarge (n=2)	p value
Male**	16 (44.4%)	7 (53.85%)	6 (50.%)	1 (50%)	0.944
Maternal Age*(years)	25.92±6.69	25.62±6.13	26.58±6.62	27.5±10	0.973
C-section**	15 (41.7%)	2 (15.4%)	1 (8.3%)	0	0.062
Preeclampsia**	4 (11.1%) ^a	4 (30.8%) ^{a,b}	6 (50%) ^b	2 (100%) ^b	0.003
GDM**	5 (13.9%)	1 (7.7%)	1 (8.3%)	0	0.855
UTI**	5 (13.9%)	1 (7.75)	1 (8.3%)	0	0.855
GA at birth* (weeks)	30.11±2.35	29.85±2.44	29.58±2.74	31.5±0.7	0.744
BW* (kg)	1.500±0.507 ^a	1.3800±0.506 ^{a,b}	1.000±0 ^b	1.000±0 ^{a,b}	0.010
BW score ^z ***	0.16 (-1.42– 2.46) ^a	-0.28 (-1.11 – 1.51) ^{a,c}	-1.65 (-2.08 - -1.35) ^b	-1.44 (-1.55 - 1.34) ^{b,c}	<0.001
L at birth* (cm)	40.18±3.28 ^a	38±3.69	34.5±5.1 ^b	38±1.41	0.001
BL z-score ^z ***	0.20 (-2.0– 1.69) ^a	-0.53 (-1.60 - -0.67) ^b	-1.83 (-3.42 - -0.12) ^c	-1.40 (-1.45 - 1.35) ^{a,b,c}	<0.001
CP at birth* (cm)	27.94±2.54 ^a	27.38±2.3 ^{a,b}	24.92±2.9 ^b	25.3±0.49 ^{a,b}	0.008
CP at birth z-score ^z ***	0.13 (-1.66– 2.05) ^a	-0.14 (-1.48– 1.35) ^a	-1.67 (-2.40 - -0.53) ^b	-1.24 (-1.57 - 0.92) ^{a,b}	<0.001
Length of hospitalization*** (days)	47.4(14 -114)	63.3 (29 -122)	72.8 (25 -137)	48 (25 -71)	0.104
GA discharge* (weeks)	36.8±2.24 ^a	38.9±2.95 ^{a,b}	39.9±3.86 ^b	38.3±3.9 ^{a,b}	0.008
Weight at discharge* (kg)	2.63±0.572	2.49±0.335	2.440±0.489	2.777±0.682	0.625
Type of milk at discharge**					
EBM	5 (13.9%)	2 (15.4%)	1 (8.3%)	1 (50%)	0.176
BM+formula	19 (52.8%)	6 (46.2%)	10 (83.3%)	1(50%)	
Formula	12 (33.3%)	5 (38.5%)	1(8,3%)	0	

*Mean ± SD; **Absolut frequency (%); ***Mean (Min-Max); AGA: Appropriate-for-Gestational-Age; SGA: Small-for-gestational-age BW: Birth weight; L: Length; CP: Head circumference; GA: Gestational Age; GDM: gestational diabetes mellitus; UTI: Urinary Tract Infection; EBM: Exclusive Breast Milk; BM; Breast Milk

In total, we identified 5,309 different OTUs across all samples, of these, 16 OTUs had mean abundance higher than 1%. Microbial composition was similar when compared according to weight at birth and at discharge. Alpha diversity measurements between groups AGA-AGA vs. AGA-SGA vs. SGA-SGA were similar (Observed OTUs, p-value = 0.745) and Shannon Diversity Index, p-value = 0.127 (Fig 1).

Fig 1. Alpha diversity measurements of meconium microbial communities from preterm infants comparing weight adequacy at birth and at discharge. The left panel presents the number of observed Operational Taxonomic Units (OTUs) (p-value = 0.745). The right panel presents the Shannon microbial index of diversity (p-value = 0.127). Boxes span the first to third quartiles; the horizontal line inside the boxes represents the median. Whiskers extending vertically from the boxes indicate variability outside the upper and lower quartiles, and single circles indicate outliers. AGA: adequate for gestational age; SGA: small for gestational age. (The group SGA-LGA was excluded from data analysis, because of its limited size).

The overall microbial composition at phylum level according to weight adequacy at birth is presented in Fig. 2A, and at discharge in Fig. 2B. Four phyla were found to be dominant across the samples irrespective of weight adequacy at birth or delivery. They were *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*. On average, infants in the SGA group at birth or discharge had higher *Firmicutes* while those in the AGA group had higher *Proteobacteria* than their counterparts.

Fig 2. Relative phyla abundance of the gut microbiota according with weigh adequacy. Each stacked bar represents the mean relative abundance of weight adequacy group at birth (A) and at moment of discharge (B).

When compared to the SGA at birth group, those born AGA had an increased abundance of OTUs belonging to genus *Polynucleobacter* (p=0.0163), phylum *Proteobacteria*, *Gp1* (p=0.018) phylum *Acidobacteria*, and *Prevotella* (p=0.038) phylum *Bacteroidetes* (Fig. 3 -A).

Between most abundant OTUs observed, when comparing preterm AGA or SGA at discharge, those OTUs belonging to *Escherichia fergusonii* (p=0.014) and *Streptococcus dentisani* (p=0.043) genus were more abundant in the AGA at discharge group, and this difference was statistically significant. By contrast, the SGA at discharge group presented increased abundance of *Prevotellacopri* (p=0.002),

Roseburia inulinivorans ($p=0.003$), *Staphylococcus* sp. ($p=0.003$), *Staphylococcus capitis* subsp. *Capitis* ($p=0.004$), *Sutterellastercoricanis* ($p=0.027$), *Corynebacterium tuberculostearicum* ($p=0.033$), and *Ruminococcaceae* ($p=0.043$) (Fig.3 -B)

Fig 3. Differential abundance analysis according to weight adequacy. Each dot represents an individual OTU, organized by their Genus. **(A)** Differential abundance analysis according to weight adequacy at birth: *Polynucleobacter* ($p=0.0163$), *Gp1* ($p=0.018$) and *Prevotella* ($p=0.038$) were more abundant in meconium of preterm born AGA. **(B)** Differential abundance analysis according to weight adequacy for gestational age at discharge: *Escherichia fergusonii* ($p=0.014$) and *Streptococcus dentisani* ($p=0.43$) were more abundant in meconium of preterm AGA at discharge; *Prevotellacopri* ($p=0.002$), *Roseburia inulinivorans* ($p=0.003$), *Staphylococcus* sp. ($p=0,003$), *Staphylococcus capitis* subsp. *Capitis* ($p=0.004$), *Sutterellastercoricanis* ($p=0.014$), *Corynebacterium tuberculostearicum* ($p=0.033$) and *Ruminococcaceae* (0.043) were more abundant in meconium of preterm SGA at discharge.

Regarding head circumference (HC) catch-up growth, 30 (47.6%) infants completed HC catch-up growth by the age of 6 months corrected age and 33 (52.4%) after 6 months of corrected age. Also, catch-up occurred independently of weight adequacy for gestational age at birth or at discharge. There were no statistically significant differences regarding clinic variables at birth, sepsis during NICU stay, use of anticonvulsant, and rehospitalizations after discharge. As expected, the group that completed HC catch-up growth by the age of 6 months corrected age had higher z-score and measures of weight and head circumference between 2 and 6 months of corrected age. There was a difference between groups only at 6 months of corrected age, with a higher number of infants receiving infant formula in those whose HC catch-up growth was completed by the 6th month of corrected age (Table 2).

Table 2. Clinical characteristics, growth and type of milk received according to catch-up before or after 6 months of corrected age

Variables	Catch up<6m (n=30)	Catch up>6m (n=33)	P value
Male**	16 (53.3%)	14 (42.4%)	0.454
Maternal age(years)*	25.33±6.26	27±6.77	0.299
C-section**	12 (40%)	18 (60%)	0.093
Preeclampsia**	4 (13.3%)	12 (36.4%)	0.046
Gestational Diabetes**	4 (13.3%)	3 (9.1 %)	0.700
Urinary tract infection**	4 (13.3%)	3 (9.1 %)	0.700
Maternal antibiotics**	20(66.7%)	21(63.6%)	1.000
GA at birth (weeks)*	30.4±2.29	29.6±2.4	0.209
AGA at birth**	22(73.3%)	26(78.8%)	0.612
Weight at birth (kg)*	1.434 ±0.443	1.323±0.479	0.345
Z-score Weight at birth***	-0.33 (-2.08– 1.25)	-0.31 (-1.87–2.46)	0.933
Length at birth(cm)*	38.7±3.84	38.2±4.32	0.654
z-score Length at birth***	-0.34 (-3.4 – 1.5)	-0.42 (-3.04 -1.69)	0.788
Head circumference at birth* (cm)	27.52 ±2.66	26.55±2.92	0.247
Z-score Head circumference at birth ***	-0.27 (-2.36 – 1.79)	-0.34 (-2.4 – 2)	0.785
NICU stay (days)***	49 (14 -114)	61 (29 -122)	0.137
Periintraventricular leukomalacia	2 (6.7%)	3 (9.1.%)	0.546
Necrotizing enterocolitis	4 (13.3%)	6(18.2%)	0.430
Early sepsis	0	1 (3%)	0.625
Late sepsis	2 (6.6%)	3 (9%)	0.423
Gestational age at discharge (weeks)*	37.4±2.3	38.4±3.4	0.174
Weight at discharge (kg)*	2.63±0.572	2.49±0.335	0.625
Weight z-score at discharge ***	-0.94 (-3.2 – 1.38)	-1.35 (-3.33 -0.27)	0.104
AGA at discharge**	18(60%)	19 (57.6%)	0.845
Hospitalization after discharge **	4 (13.3%)	10 (30.3%)	0.106
Use of anticonvulsant **	5 (16.7%)	10 (30.3%)	0.204
Weight at 2 months CA	5.450±0.970	4.98±0.810	0.055

(kg)			
Weight Z-score at 2 months CA	0 (-3.82 – 2.30)	-0.55 (-2.64 – 2.12)	0.134
Head circumference at 2 months CA (cm)	39.44±1.78	38.43±1.70	0.084
Head circumference Z-score at 2 months CA	0.75 (-2.69 – 2.87)	0 (-3.51 – 2.44)	0.040
Weight at 4 months CA (kg)	7.130±1.00	6.240±1.13	0.008
Weight Z-score at 4 months CA	0.37 (-1.81- 2.66)	-0.68 (-4.31 – 2.44)	0.012
Head circumference at 4 months CA (cm)	42.57±1.14	40±2.0	<0.001
Head circumference Z-score at 4 months CA	1.13(-0.54 – 3.23)	-0.27 (-3.63 – 2.81)	0.001
Weight at 6 months CA (kg)	7.80±1.21	7.0±1.15	0.021
Weight Z-score at 6 months CA	0.05(-4.75 – 2.55)	-0.72(-4.38 -2)	0.050
Head circumference at 6 months CA (cm)	44.1±1.25	41.71±1.96	<0.001
Head circumference Z-score at 6 months CA	0.94 (-1.92- 2.75)	-0.39 (-3.55-2.14)	<0.001
Type of milk			
Milk at discharge			
EBM	4 (13.3%)	5 (15.2%)	0.090
BM+Formula	18 (60%)	18 (54.4%)	
Formula	8 (26.7%)	10 (30.3%)	
Milk at 2 months CA			
EBM	4 (14.3%)	6 (17.9%)	0.0752
BM+Formula	9 (28.6%)	11 (33.3%)	
Formula	15(53.6%)	16 (48.4%)	
Cows milk	1 (3%)	0	
Milk at 4 months CA			
EBM	2 (6.6%)	5(14.8%)	0.404
BM+Formula	8 (27.3%)	11(33.3%)	
Formula	19(63.6%)	17(51.9%)	
Cows milk	1 (3%)	0	
Milk at 6 months CA			
EBM	2(6.9) ^{a,b}	3 (7.4%) ^{a,b}	0.038

BM+Formula	3 (10.3%)	12 (37%)	
Formula	21 (69.9%)	18(55.6%) ^b	
Cows milk	4 (13.8%)	0 ^b	

Mean \pm SD; **Absolut frequency (%); ***Mean (Min-Max); CA: corrected age; AGA: Appropriate-for-Gestational-Age; SGA: Small-for-gestational-age BW: Birth weight; L: Length; CP: Head circumference; GA: Gestational Age;; GDM: gestational diabetes mellitus; UTI: Urinary Tract Infection; EBM: Exclusive Breast Milk; BM; Breast Milk

According to the PERMANOVA (Table 3) there was no statistically significant difference for microbial beta diversity between infants with early HC catch-up growth (up to 6 months) and late HC catch-up growth (after 6 months) ($p=0.093$). However, after analyzing differences in microbial alpha diversity, Shannon Index was statistically significant ($p=0.045$), indicating more microbial diversity in meconium from infants who had their HC catch-up growth later, after 6 months of corrected age (Fig. 4). Pre-eclampsia was not associated to differences in the meconium microbiota (p -value= 0.64).

Table 3. Nonparametric Multivariate Analysis of Variance of bacterial community structure used for controlling confounding variables

Variables	F Model	R ²	p-value
Weight Adequacy	0.961	0.101	0.536
HC Catch-up	1.255	0.033	0.201
Preeclampsia	0.836	0.022	0.640

Fig. 4. Alpha diversity measurements of meconium microbial communities from preterm infants comparing head circumference (HC) catch up until or after 6 months of corrected age. The left panel presents the number of observed Operational Taxonomic Unities (OTUs) (p -value = 0.225). The right panel presents the Shannon microbial index of diversity (p -value = 0.045). Boxes span the first to third quartiles; the horizontal line inside the boxes represents the median. Whiskers extending vertically from the boxes indicate variability outside the upper and lower quartiles, and single circles indicate outliers.

The overall microbial composition at phylum level within groups with the head circumference catch-up by 6 months and after 6 months is presented in Figure 5 - B.

Four phyla were found to be dominant within the samples irrespective of the group. They were *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*.

Differential abundance analysis showed increased abundance of *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* phylum, with OTUs belonging to *Salmonella* ($p < 0.001$), *Flavobacterium* ($p = 0.026$), and *Burkholderia* ($p = 0.026$) genus being the most abundant in meconium from infants who achieved HC catch-up growth by the 6th month of corrected age. *Prevotella* ($p = 0.005$), *Enhydrobacter* ($p = 0.036$), *Brevundinomonas* ($p = 0.043$), *Bradyrhizobium* ($p = 0.018$), and *Acinetobacter* ($p = 0.007$) genus were more abundant in meconium of those infants who achieved HC catch-up growth after 6 months of corrected age (Fig. 5 A and B).

Fig5. Differential abundance analysis according to head circumference catch up. Each dot represents an individual OTU, organized by their Genus. **(A)** Differential abundance analysis according to early or late HC catch up. Data plotted as log₂ fold change; OTUs to the right of the zero line were more abundant in HC catch up until 6 months corrected age group, and OTUs to the left of the zero line were more abundant in HC catch up after 6 months corrected age group. **(B)** Difference for microbial composition between infants with early HC catch up growth (up to 6 months) and late HC catch up growth (after 6 months); HC: head circumference

In order to better understand the differences of the gut microbiota in relation with the time of HC catch up, we also explored the functional prediction of these communities, using PICRUSt [24]. Infants with HC catch up before the 6th month of corrected age presented a microbiota with higher predicted genes related with transportation (Transporters and ABC transporters), while those with HC catch up after 6 months had more genes related with sugar and amino acid metabolism (Fig. 6).

When analysing functional gene prediction according with weight adequacy at birth or discharge, there were no significant differences, considering the threshold of effect size > 0.1 (S1_Fig.).

Fig 6. Microbial community functional prediction. Gut microbiota functional prediction, using PICRUSt, of infants with early or late HC catch up. The bar plot represents function mean proportion, and error bars represents the difference

between the two groups. Coloring of the error bar is according with the group with the higher proportion of the respective function. Blue color (A) represents infants with HC catch up until 6 months, and Orange (B) represents those with HC catch up after 6 months of age.

Discussion

Increased abundance of OTU belonging to *Prevotella*, *Polynucleobacter*, and *Gp1* genus in preterm infants born AGA was observed. Preterm AGA at discharge showed increased abundance of OTU belonging to *Escherichia fergusonii* and *Streptococcus dentisani* genus. We also found more abundance of OTUs *Salmonella*, *Flavobacterium*, and *Burkholderia* genus in the meconium of infants who achieved HC catch-up growth by the 6th month of corrected age. There are few studies with similar data; the great majority of studies consider the microbiome of full-term infants, and those that assess prematurity take into account only gestational age, without relating it to adequacy of weight for gestational age [29,30].

Ardissonne et al. (2014) [31] found several taxonomic families within *Firmicutes* phylum correlated to gestational age, including *Staphylococcus* genus, which were most abundant among preterms born at <33 gestational weeks. Jacquot et al. [32] found an association between gestational age less than 28 weeks and lower microbial diversity score at first week of life, where *Staphylococcus spp* genus was found in 67% of the patients. The authors also enlight that although it is clear that preterm infants can also present an important *Staphylococcus* colonization, these infants are at higher risk of late onset sepsis related to coagulase negative *Staphylococcus* during the first weeks of life [32].

Itani et al. (2017) [33] also described increased *Staphylococcus* abundance in feces from preterm infants less than 33 weeks of gestational age. Our data represent meconium microbiome, and we observed significantly increased *Staphylococcus* genus abundance in preterm infants who were SGA at discharge, with hospital discharge being equivalent to the term of gestational age. We hypothesize that besides gestational age, adequacy of weight for gestational age at birth is also related to microbial community structure. Also, although *Staphylococcus* colonization is a normal characteristic of healthy gut microbiota [34], we understand that a microbiota more abundant in *Staphylococcus* might interfere for nutrient absorption e

metabolism, leading to a worse weight gain during NICU stay, despite the efforts of nutrition therapy.

Nataro and Guerrant (2017) [35] suggest that *Prevotella* genus is associated to better growth, while *Streptococcus lutetiensis* and *Escherichia coli* are associated to growth failure, but they do not distinguish preterm from full-term infants. In our study, AGA at birth presented significant higher abundance of *Prevotella* genus, we believe this may reflect fetal period, once this microbe has been associated to improved glucose metabolism by promoting increased glycogen storage [36].

On the other hand, in contrast to Nataro and Guerrant (2017) [35] results, when we evaluate the adequacy of weight for gestational age at discharge, AGA preterms were the ones who presented increased *Escherichia fergusonii* and *Streptococcus dentisani* abundance in meconium, while SGA at discharge preterms presented increased *Prevotellacopri* abundance in meconium. Through our results, we cannot infer about microbiota changes during the hospital stay, however, we have some hypothesis: a) Those infants with better growth (AGA at discharge) possibly had earlier contact with their parents and better evolution of dietary acceptance, both factors that can favor benefic changes in the microbiota. b) As we already mentioned, SGA infants at discharge also had abundant *Staphylococcus* in meconium and maybe during hospital stay this microbe was more resistant or had more impact host metabolism than *Prevotellacopri*, influencing to the worse weight gain. We understand that other external factors act together with the microbiome, being important influences in weight gain during hospital stay. Future studies, evaluating progressive changes in the microbiota, in association with dietary characteristics may answer this hypothesis.

Preterm infants miss an important phase of brain growth and maturation, which would occur during the last trimester of pregnancy[37]. During this phase the cortical gray matter is already matured, but some of the most important developing stages such as the increase in the complexity of connections, axons, glial cells, and oligodendrocytes in the white matter, will be concluded as the 3rd trimester goes by [38,39]. Therefore prematurity is associated with neurodevelopmental disability, with long term effects [3,40,41]. Catch down during hospital stay and during the first months of life are associated to increased risk of neurologic impairment in preterm infants, nevertheless the mechanisms that guarantee this association are not yet completely elucidated [6]. On the other hand, catch-up growth of head circumference

in the first years of life is a protective factor for neurodevelopment, being associated to better cognitive and behavioral performance in early childhood [42, 43].

Taken together, neurological immaturity and a dysbiotic and immature gut, both associated with prematurity may disrupt the bidirectional communication between the nervous system and enteric cells, leading to altered signaling and neurological development, and also altered immune responses [3, 44, 45].

In the present study we were able to verify a higher microbial biodiversity in meconium from those children who had head circumference catch-up growth after 6 months of corrected age, with *Prevotella*, *Enhydrobacter*, *Brevundinomonas*, *Bradyhizobium*, and *Acinetobacter* being the most prevalent genus observed in the group. Moreover, in the group of infants whose head circumference catch-up growth was completed until 6 months of corrected age, *Salmonella*, *Flavobacterium*, and *Burkholderia* were most abundant. Community functional prediction suggests that the gut microbiota of infants with head catch up until the 6th month presented higher presence of transporter genes, including ABC transporters, while infants with head catch up after the 6th month presented more genes predicted to be involved in the metabolism of complex carbohydrates, such as starch, and amino acids. This difference might influence energy intake from different sources and might influence growth.

Despite several studies aiming to explain the role of microbiome in the gut-brain axis, interactions between neurologic mechanisms and microbiome development in preterm infants are not well understood [38]. To our knowledge, this is the first study investigating meconium microbial composition and its association to head circumference catch-up growth in preterm infants. We suggest more studies should be conducted so that the pathways of this relationship may be better understood.

GuneyVaral et al (2018) [46] conducted a study with preterm infants, using a prepared commercial symbiotic solution administered with enteral nutrition. Their results show a lower odd to lower head circumference growth in the study group. Wejryd et al (2018) [47] related supplementation with *L. reuteri* to better head circumference growth, also during hospital stay. Both studies corroborate the hypothesis that a favorable gut microbiota might enhance the chances of achieving better neurodevelopment/ growth via the beneficial effects on cytokines, nervous and immune system. However, a recent systematic review conducted by Hortensius et al

(2019) [48] suggests that until the present, despite the positive results on head growth, there is no significant data regarding the effect of supplementation with probiotics on neurodevelopmental outcome was found. Therefore, it's indeed necessary more follow up studies.

Experimental studies with germ-free mice have observed systemic inflammation and neuroinflammation in the offspring as well as impaired myelination and blood–brain barrier formation. These studies suggest a relationship between microbial colonization, immune system, and brain activity, as well as an essential role for microbiota in neural, structural, and functional development [45,49]. Although animal model studies have already clearly elucidated the role of gut microbiota in childhood development programming, and there is a window of opportunity in which microbiota can affect physiological function of several systems, with long-term consequences, there have been only a limited number of studies with humans, specifically preterm newborns, that would enable complete understanding of processes involving microbiome and neurologic development [50].

Several factors such as infection, neurologic impairment, diet, and antibiotic use are crucial in ensuring growth. In our study the groups were similar for sepsis. However, post-discharge hospitalizations, anticonvulsant treatment, and milk feeding were different at 6 months of corrected age, which may directly interfere with growth, neurodevelopment, and microbial colonization. Thus, we cannot infer if meconium microbiota was the only determinant factor for head circumference catch-up growth. Yet, considering the intimate relationship between brain and gut [51], we suggest identifying microbiome variations associated and predisposing to accelerated head circumference catch-up growth as a relevant tool for clinical practice in the context of improving care and future health of preterm infants.

It is worth mentioning that food directly influences bacterial flora establishment, and human milk is a greater promoter of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* colonization when compared to formula based on cow's milk [52]. Oligosaccharides (HMO) present in breast milk, which are complex glycans and not digestible by humans, are the main microbiome substrate, especially for *Bifidobacteria*, playing a fundamental role for beneficial bacterial community proliferation in children's gut, due to both probiotic and prebiotic effects, highlighting the importance of promoting breastfeeding in the NICU environment [52-54].

It was a challenge to analyze the relationship between microbiome, born SGA or AGA, and head circumference catch-up growth, since there are so few studies and many unanswered questions. This study encountered limitations, such as the lack of microbiome data at discharge and follow up, which could give us more information regarding changes that occurred during hospital stay. We also understand the sample size as a limitation of this study; on the other hand, we emphasize the follow-up of preterm infants as strength.

Conclusion

Meconium microbial abundance seems to be related to adequacy of weight for gestational age as well as to weight gain during neonatal period in low-birth-weight preterm infants. Also, abundance of meconium OTUs from infants who achieved early head circumference catch-up growth (defined in this study as up to the 6th month of corrected age) differs from those who had late head circumference catch-up growth (in this study, after 6 months of corrected age). Further studies following changes in microbial colonization, as well as its associations to diet patterns, in order to verify associations between microbiota and medium-term outcomes, may lead to new conduct definitions for clinical practice.

References

- Krajmalnik-Brown R, Ilhan ZE, ; Kang,, DW, DiBaise, JK. Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation. 2012; 27:201-214
- Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ. The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. Trends in Microbiology 2019; 27: 131-147
- Lu J, Claud E. Connection between gut microbiome and brain development in preterm infants.. Dev Psychobiol. 2019; 61: 739–751
- Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, Tuohy K. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. Eur J Nutr. 2018; 57:1–24
- Turrone F, Milani C, Durant S, Lugli GA, Bernasconi S, Margolles A, et al. The infant gut microbiome as a microbial organ influencing host well-being. Ital J Pediatr. 2020. 46:16

Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, Fernández L, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* 2008; 159: 187–193.

Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, Theriaque D, Li N, Mai V. Intestinal Microbial Ecology in Premature Infants Assessed Using Non-Culture Based Techniques. *J Pediatr.* 2010; 156: 20–25.

Collado, Maria Carmen & Rautava, Samuli & Aakko, Juhani & Isolauri, Erika & Salminen, Seppo. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports.* 2016; 6: 23129

Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol.* 2005; 51:270–274

Perez-Muñoz ME, Arrieta M-C, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome.* 2017; 5:48

Rogers GB, Keating DJ, Young RL, Wong M-L, Licinio, J, Wesselingh, S. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Molecular Psychiatry.* 2016; 21:738–748

Niccolai E, Boem F, Russo E, Amedei A. The Gut–Brain Axis in the Neuropsychological Disease Model of Obesity: A Classical Movie Revised by the Emerging Director “Microbiome”. *Nutrients.* 2019; 11:156.

Henderickx JGE, Zwiittink RD, van Lingen RA, Knol J and Belzer C. The Preterm Gut Microbiota: An Inconspicuous Challenge in Nutritional Neonatal Care. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9:85.

Ong KK, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ.* 2000; 320:967-71.

Fenton TR, Kim JH. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatr.* 2013; 13:59.

Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 91:48-55.

Pyro VS, Roesch LF, Ortega JM, do Amaral AM, Tótoła MR, Hirsch PR, et al. Brazilian Microbiome Project Organization Committee. Brazilian Microbiome Project:

revealing the unexplored microbial diversity--challenges and prospects. *Microb Ecol.* 2014; 67: 237.

Pylro VS, Morais DK, de Oliveira FS, Dos Santos FG, Lemos LN, Oliveira G, et al. BMPOS: a Flexible and User-Friendly Tool Sets for Microbiome Studies. *Microbial Ecology.* 2016; 72: 443-447.

Edgar, R.C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods.* 2013; 10:996-8

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods. Nature Methods.* 2010;

McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 2012; 6: 610-618.

Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika.* 1953; 40: 237±264.

Lemos LN, Fulthorpe RR, Triplett EW, Roesch LFW. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of Microbiological Methods.* 2011; 86:42-51

Langille MGI, Zaneveld, J, Caporaso, JG, McDonald, D, Knights, D, Reyes, J. et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology.* 2013;1-10

McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE.* 2013; 8: e61217.

Oksanen J, Blanchet G, Kindt R, Legendre P, O'Hara R, Simpson G, et al. *Vegan: Community Ecology Package.* 2011.

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology.* 2014; 15:550

Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics.* 2014; 30: 3123-3124.

La Rosa PS, Warner BB, Zhou Y, Weinstock GM, Sodergren E, Hall-Moore CM et al. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111:12522–7.

Korpela K, Blakstad EW, Moltu SJ, Strømme K, Nakstad B, Rønnestad AE, et al. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Scientific Reports*. 2018; 8: 2453

Ardissone AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, Rechcigl KT, Li N, Drew JC et al. Meconium Microbiome Analysis Identifies Bacteria Correlated with Premature Birth. *PLoS ONE*. 2014; 9: e90784.

Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, Jumas-Bilak E, et al. Dynamics and Clinical Evolution of Bacterial Gut Microflora in Extremely Premature Patients. *J Pediatr*. 2011; 158:390-6

Itani T, AyoubMoubareck C, Melki I, Rousseau C, Mangin I, Butel MJ, et al. Establishment and development of the intestinal microbiota of preterm infants in a Lebanese tertiary hospital. *Anaerobe*. 2017; 43:4-1

Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019;7:14

Nataro, J; Guerrant, R. Chronic consequences on human health induced by microbial pathogens: Growth faltering among children in developing countries. *Vaccine* .2017. 35: 6807–6812

Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Clinical And Translational Report*. 2015; 22: 971-982.

Cai, S., Zhang, G., Zhang, H. et al. Normative linear and volumetric biometric measurements of fetal brain development in magnetic resonance imaging. *Childs Nerv Syst*. 2020.

Lu, L; Claud, EC. Intrauterine Inflammation, Epigenetics, and Microbiome Influences on Preterm Infant Health. *Current Pathobiology Reports*. 2018. 6:15–21

Volpe, JJ. The encephalopathy of prematurity - brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. *Semin Pediatr Neurol*. 2009;16: 167-78

Volpe, JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol*. 2009; 8: 110–124

Cheong, J.L.Y., Burnett, A.C., Treyvaud, K. et al. Early environment and long-term outcomes of preterm infants. *J Neural Transm*. 2020; 127: 1–8

Belfort MB, Rifas-Shiman SL, Sullivan T, Collins CT, McPhee AJ, Ryan P, et al. Infant growth before and after term: effects on neurodevelopment in pre-term infants. *Pediatrics* 2011;128:e899-906.

Ramel SE, Demerath EW, Gray HL, Younge N, Boys C, Georgieff MK. The relationship of poor linear growth velocity with neonatal illness and two year neurodevelopment in preterm infants. *Neonatology* 2012;102:19-24

Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Resource*. 2015; 17:690-703

Lu J, Lu L, Yu Y, Cluette-Brown J, Martin CR, Claud EC. Effects of Intestinal Microbiota on Brain Development in Humanized Gnotobiotic Mice. *Scientific Reports*. 2018.:1-16

GuneyVaral I, Koksal N, Ozkan H, Bagci O, Dogan P. Potential use of multi-strain synbiotics for improving postnatal head circumference. *Pak J Med Sci*. 2018;34:1502-1506

Wejryd, E., Marchini, G., Frimmel, V., Jonsson, B. and Abrahamsson, T. Probiotics promoted head growth in extremely low birth weight infants in a double-blind placebo-controlled trial. *Acta Paediatr*. 2019; 108: 62-69

Hortensius LM, van Elburg RM, Nijboer CH, Benders MJNL and de Theije CGM. Postnatal Nutrition to Improve Brain Development in the Preterm Infant: A Systematic Review From Bench to Bedside. *Front. Physiol*. 2019; 10:961

Hoban AE, Stilling RM, Ryan FJ, Shanahan F, Dinan TG, Claesson MJ et al. Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Transl. Psychiatry*. 2016; 6:e774

Ruiz L, Moles L, Gueimonde M, Rodriguez JM. Perinatal Microbiomes' Influence on Preterm Birth and Preterms' Health: Influencing Factors and Modulation Strategies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016; 63:e193-e203

DiBartolomeo ME, Claud EC. The Developing Microbiome of the Preterm Infant. *Clin Ther*. 2016. 38:733–739

Guaraldi F, Salvatori G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 2:94

Petherick, A. Development: Mother's milk: A rich opportunity. *Nature*. 2010; 468:S5–S7

Victora CG, Bahl R, Barros AJ, França GV, Horton S, Krasevec J, et al. Lancet Breastfeeding Series Group. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet*. 2016; 387: 475-490

Figura 2 - Figure 1 – Alpha diversity measurements of meconium microbial communities from preterm infants comparing weight adequacy at birth and at discharge

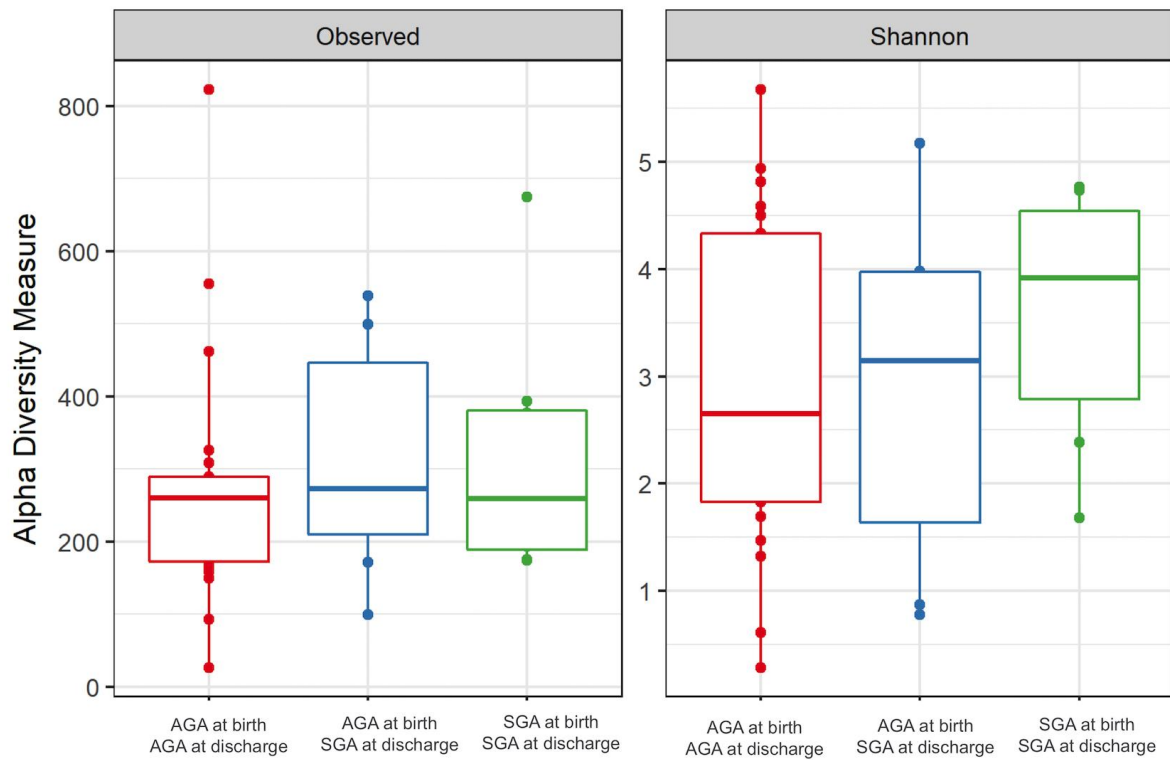


Figura 3- Figure 2 – Relative phyla abundance of the gut microbiota according with weigh adequacy.

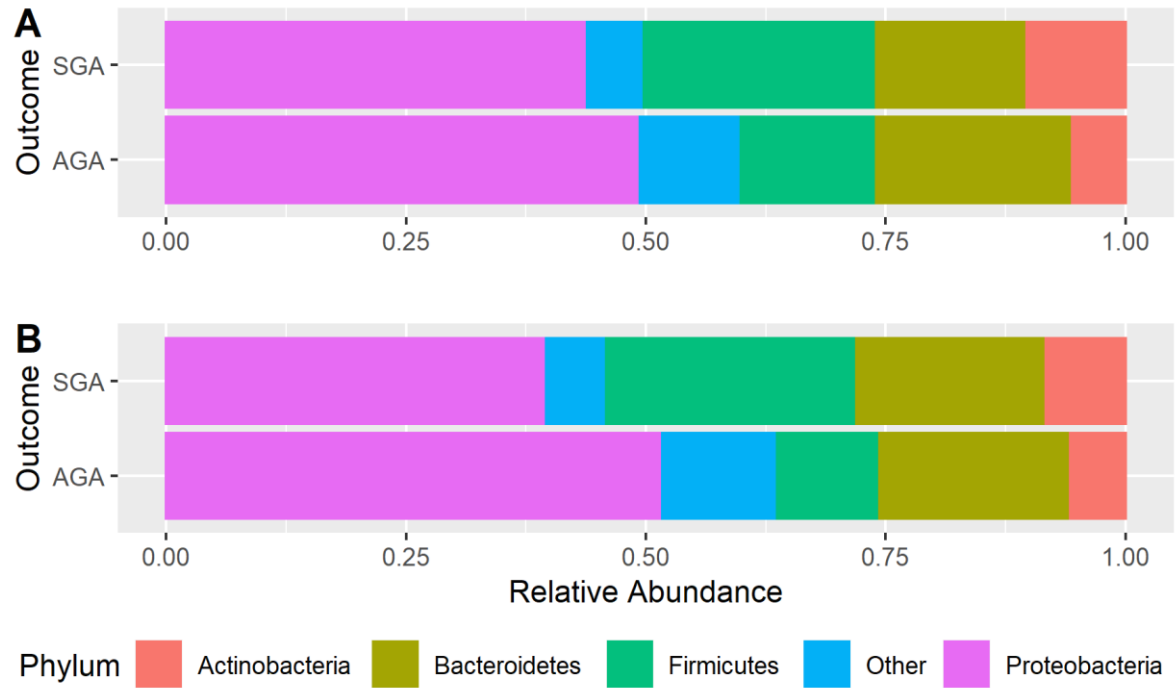


Figura 4 - Figure 3 – Differential abundance analysis according to weight adequacy

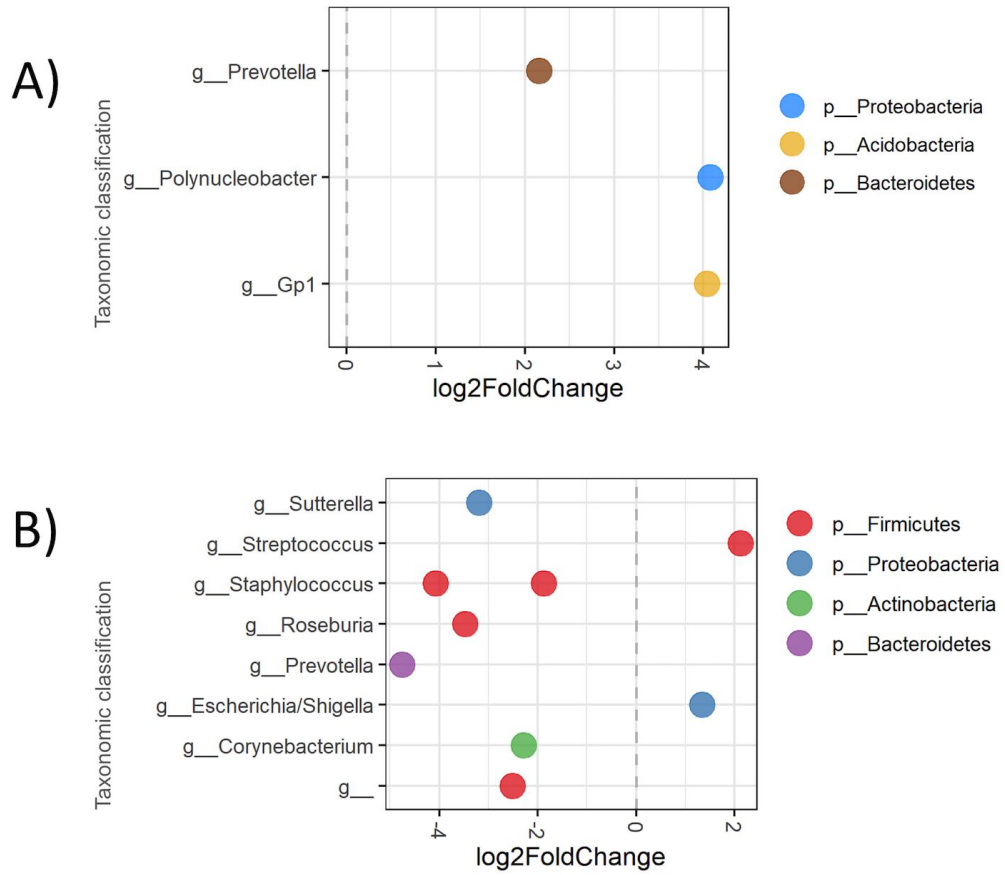


Figure 5 - Figure 4 – Alpha diversity measurements of meconium microbial communities from preterm infants comparing head circumference (HC) catch up until or after 6 months of corrected age.

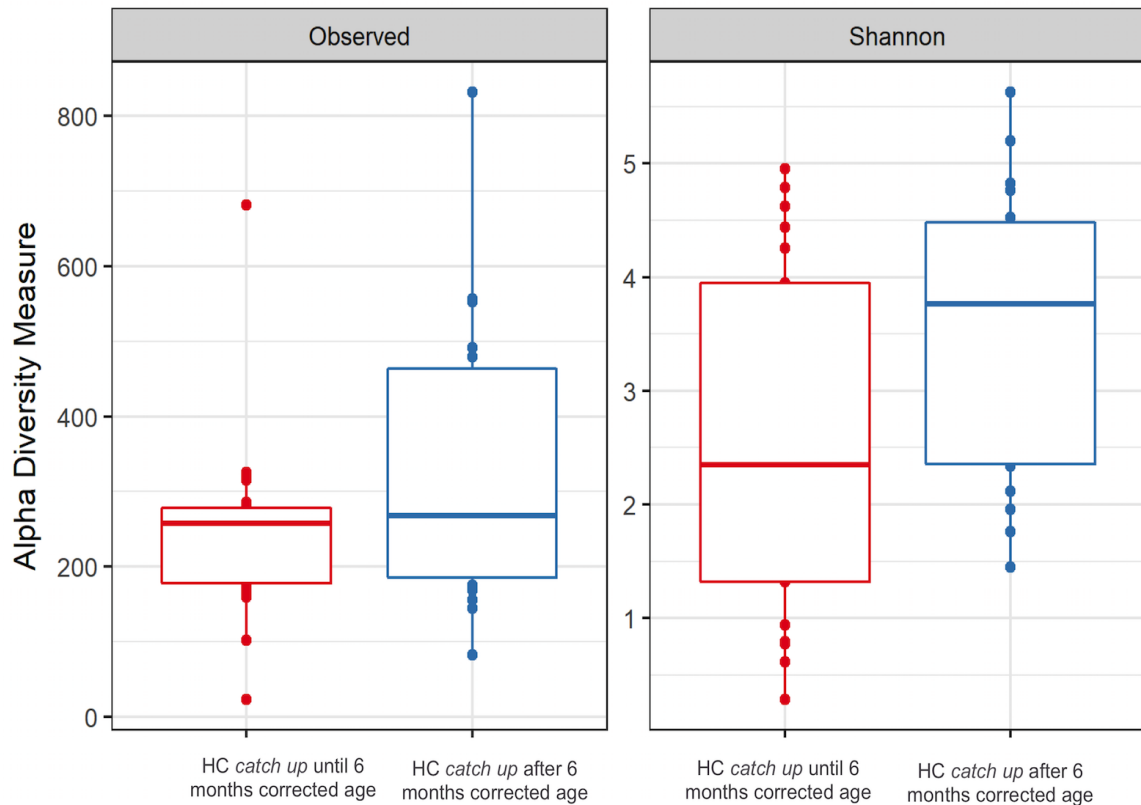


Figura 6 - Figure 5 – Differential abundance analysis according to head circumference catch up

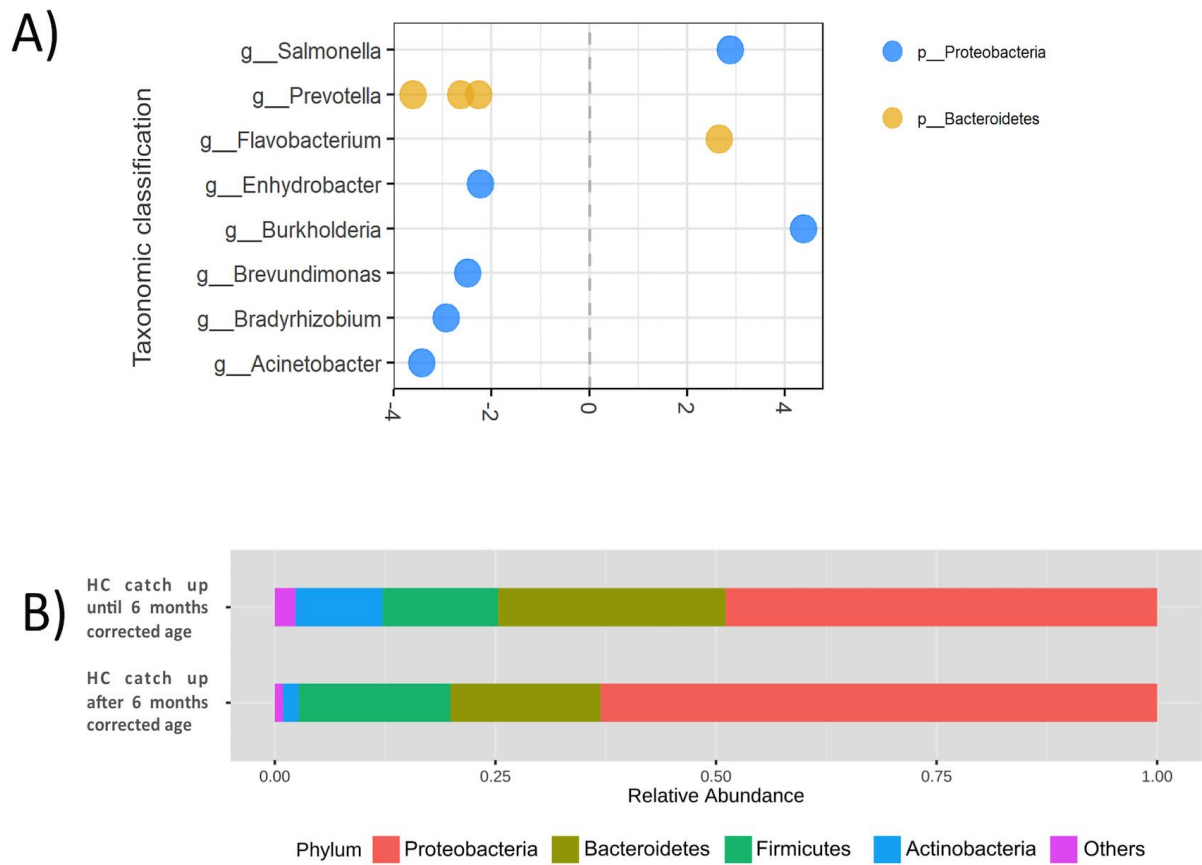
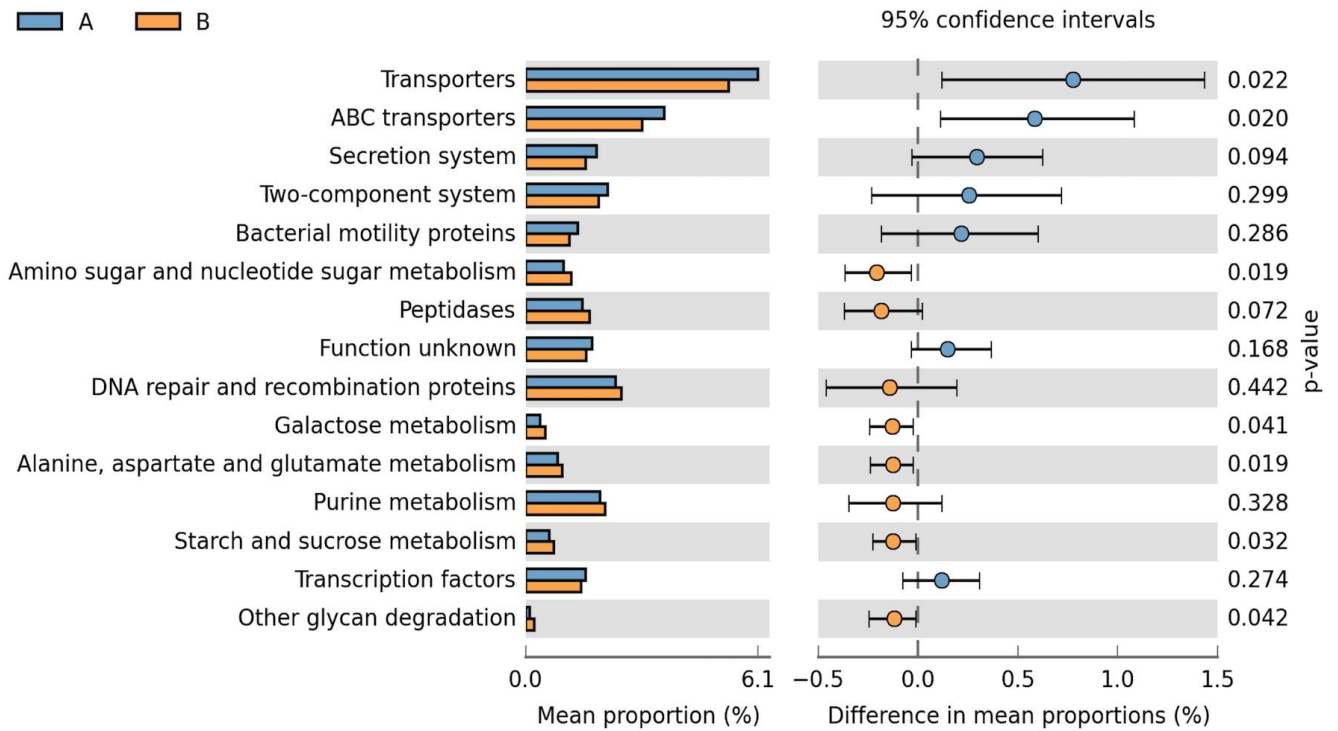


Figura 7 - Figure 6 – Microbial community functional prediction

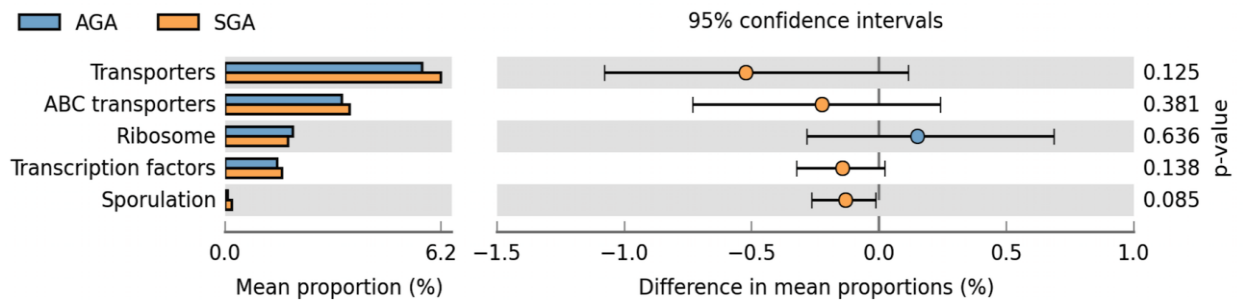


Supporting information

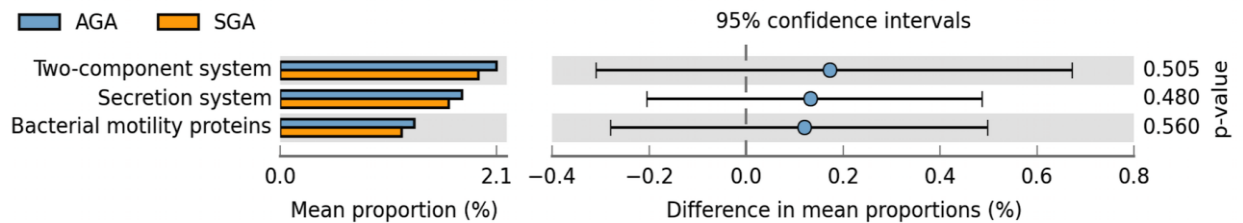
S1_Fig. Microbial community functional prediction. Infant's gut microbiota functional prediction, using PICRUST regarding weight adequacy at birth (A) and at discharge (B). Here are all function predictions with an effect size > 0.1. The bar plot represents function mean proportion, and error bars represents the difference between the two groups.

Figura 8 - S1_Fig. Microbial community functional prediction

A



B



8.2 ARTIGO 2 - POSTNATAL GROWTH STATUS AND FEEDING PATTERN FOR
PRETERM AND HEALTHY FULL-TERM INFANTS DURING FIRST YEAR OF
CORRECTED AGE

RUNNING TITLE: GROWTH AND FEEDING OF PRETERM AND FULL-TERM

ANA CAROLINA TERRAZZAN^a RENATO S PROCIANOY^{a,b}, RITA DE CÁSSIA
SILVEIRA^{a,b,c}

a Postgraduate Program in Child and Adolescent Health - PPGSCA, Federal
University of Rio

Grande do Sul - UFRGS

b Neonatal Intensive Care Unit Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS

c Follow-up Program - Hospital de Clínicas of Porto Alegre, RS;

BACKGROUND: Preterm infants are at increased risk for impaired development and altered metabolism. The aim of this study was to verify the growth pattern of low birth weight preterm infants compared to full-term infants, during the first year.

METHODS: A prospective study, measuring weight, length, head circumference, tricipital, subscapular skinfold and body mass index (BMI) at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months corrected age (CA) and identifying food. Statistical analysis included frequency analysis significance level of $p < 0.005$. Approved by the institution's ethics committee.

RESULTS: Sixty-three preterm and 29 full-term infants were followed up. There was no significant difference for anthropometric variables until 6 months CA. At 6 and 8 months CA, preterm infants were shorter in length. At 10 months CA, preterm were smaller for weight ($p=0.004$), length ($p < 0.001$) and head circumference ($p=0.002$). At 12 months CA, preterm had shorter length ($p=0.041$), head circumference ($p=0.0021$) and tricipital skinfold ($p=0.025$). Tricipital skinfold was positively correlated with weight, subscapular skinfold and brachial perimeter and at 12 months for both, preterm and full term.

CONCLUSIONS: Preterm does not grow equivalent to full-term infants, even when assessed with corrected age. BMI and tricipital skinfold are valid for preterm infants' assessment.

Key-word: prematurity, adiposity, growth, anthropometry, infant, skinfold

INTRODUCTION

Preterm infants are at higher risk for short, medium, and long-term growth, development and metabolic impairment.^{1, 2, 3} Growth rates is one of child's best health indexes, besides being an essential part for pediatric attention⁴, since growth pattern in the first year of life is clearly a predictor of nutritional status during childhood. Therefore, assessing preterm postnatal growth is relevant to identify their prognosis and development.^{5, 6,7,8}

Anthropometric measures are good parameters and may reflect nutritional status.^{9, 10} Also, Body mass index is a subsidiary screening tool and, despite of not providing direct information about body composition, it has been suggested as a reliable method to verify adiposity.^{9, 10, 11, 12}

Body composition evaluation since early childhood has been shown to be a determinant factor in future diseases prevention; thus accurate measurements are important for both clinical assessment and decision-making.^{13, 14}

Skinfold measurement is a valuable and reliable tool for adiposity estimation; and, although it requires a trained professional, it is safe, low cost and ambulatory feasible.¹⁵ Another advantage concerns the fact skinfold measure values can be used as raw data, expressed as z-score and evaluated according to reference values for the population to be studied.¹⁶

Considering the need to know preterm infant's growth dynamics after hospital discharge, as well as the importance of having an assessing adiposity feasible method for these children in high metabolic and nutritional risk, the aim of this study was to perform anthropometric assessment, including skinfolds, and compare growth and adiposity data from low birth weight preterm infants to full-term healthy infants during the first year of life.

Methods

We conducted a prospective cohort study with preterm infants and a healthy full-term infants control group. Data collection was performed from February 2015 to July 2017. The study was approved by the Institution's Ethics Committee (CAAE: 45403915.0.0000.5327) and informed consent was obtained.

The study included preterm infants with less than 33 weeks of gestational age discharged from NICU (Neonatal Intensive Care Unit) and attending the Preterm Follow Up Program at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Also, healthy full-term infants were included as a control group. The exclusion criteria were infants who did not return for follow-up program after NICU discharge, children with congenital malformation and innate errors of metabolism.

Data collection from the preterm group was performed during appointments at follow-up outpatient clinic. According to the service attendance protocol, the infants are addressed to return for monthly appointments up to 6 months of corrected age, and from this age on, every 2 months up to 12 months of corrected age. Assistance routine includes anthropometric measurements (weight, length, head circumference and upper arm circumference) and, additionally, tricipital and subscapular skinfolds were measured at 12 months of corrected age.

For control group data collection, after hospital discharge, we kept routinely telephone contact with the families with the objective of maintaining the bond with research participants. Also, to ensure contact information update, such as phones and addresses. At 12 months of age, a home visit was performed for anthropometric evaluation, which was composed by weight, length, head circumference and brachial perimeter, and tricipital and sub scapular skinfolds.

Both groups were also interviewed about feeding practices such as: age of initiation of complementary feeding, type of milk (mother milk, infant formula or cow milk) consumed at 6 and 12 months of corrected age. At 12 months of corrected age a questionnaire of food consumption marker proposed by the Brazilian Ministry of Health (2016) was applied.¹⁷

During the follow-up period, some preterm families missed appointments on the evaluation dates. According to the protocol, when there was a lack, the researcher and the follow up team performed an active search, and then rescheduled the appointment as soon as possible for the family. Thus managing to rescue follow-up for the baby. For the families of the control group, there was no failure, since the researcher made telephone contact and home visit for data collection.

Anthropometric evaluation was performed using a pediatric scale (Filizolla®) for preterm group, and a portable scale with “mother-baby” tare (Wiso®) in control group home visit; anthropometer (Avanutri®), measuring tape (Cescorf®), and digital adipometer (PrimeMed®). For z-scores generation from preterm infants birth data, gender-separated, we used the Fenton Growth Calculator for Preterm Infants.¹⁸ And WHO Anthro, version 3.2.2¹⁹ program for z-scores generation of full-term infants birth data, and for follow-up period for both groups, taking gender and age into account, as well as corrected age for preterm infants.

Statistical analysis was performed in the SPSS program, 20.0 version (Statistical Package for Social Sciences), which included frequency measures (percentages and absolute numbers), central tendency and dispersion (mean and standard deviation, minimum and maximum, median and quartiles). For between group comparisons, Student t test and ANOVA was used for continuous variables, and Chi-Square or Fisher's exact test for categorical variables. ANCOVA was applied

to adjust for possible confounders Pearson's correlation was applied to verify the relationship between time of complementary feeding, type of milk and anthropometric measures and z-scores. Considered significance level $p < 0.05$.

Results

We evaluated 63 preterm and 29 full-term infants at birth. During the follow up some preterm families failed to attend appointments, however whenever that happened our team kept in touch and rescheduled the appointment for the next month so that the infant did not lose follow up. As expected, all anthropometric variables at birth, gestational age, APGAR scores were higher in the full-term group. Cesarean delivery and preeclampsia prevalence were higher in the preterm infants group; preterm infants also presented lower gestational age and lower weight at discharge when compared to the birth moment of full-term newborns (Table 1). Majority of preterm infants were born AGA and were AGA at discharge (n=36; 57.14%). Thirteen (20.63%) were born AGA and were SGA at discharge, 12 (19.04%) were born SGA and also were SGA at discharge. Only 2 (3.17%) of those infants born SGA were AGA at discharge.

Anthropometric data from both groups are presented in Table 2. As expected, when evaluating anthropometric measurements at birth, preterm infants were smaller. However, evaluating z-scores, a statistically significant difference was not observed.

At 2 months of corrected age, preterm infants were smaller for length. And at 4 months of corrected age, preterm were smaller for weight. At 6 and 8 months of corrected age, preterm infants were smaller lengths and weight, as well as z-scores for both measures at 6 months, and z-score for length at 8 months. At 10 months of corrected age, preterm infants had smaller weight, length and head circumference measures and its respective z-scores. At 12 months of corrected age, preterm infants had smaller head circumference and tricipital skinfold, as well as higher z-score for brachial perimeter. At 6 months of corrected age, preterm and term

infants had significant differences regarding type of milk consumed ($p < 0,001$). Four (7.1%) preterm infants, and 75,9% ($n=22$) term infants were exclusively breastfed. The majority of the preterm were receiving infant formula (64.3% $n=36$) and 21.4% ($n=12$) were receiving breast milk and cow's milk, simultaneously. Among term infants 10.3% ($n=3$) were receiving infant formula, 1(3.4%) cow's milk and 10.3%($n=3$) breast milk and cow's milk, simultaneously. At 12 months of corrected age, there was no significant difference between groups regarding the type of milk consumed.

With respect to the age of introduction of complementary feeding, most preterm infants started eating the complementary foods at 6 months corrected age, while a huge percentage of term infants started solid foods at 4 months of age ($p=0.00$; Figure1). By the age of 12 months corrected age, both preterm and term infants were receiving foods with adequate consistency for age. Preterm infants had increased consumption of cereals and tubers, greens, vegetables and fruits ($p=0,040$; $p=0,012$ and $p=0,002$ respectively) when compared to term infants (table 3).

We found no correlation between z-scores (weight, head circumference, upper arm circumference, length subscapular and tricipital skinfold) at 12 months corrected age and time of introduction of complementary feeding and type of milk consumed at 6 and 12 months.

Discussion

In this study, we observed the growth pattern of preterm infants and compared it to healthy, full-term infants. Preterm infant growth was not equivalent to that of full-term infants, and, at 12 months of corrected age, preterm infants had smaller head circumference, and tricipital skinfold. We also identified low prevalence of exclusive breastfeeding at 6 months of corrected age among preterm infants, high prevalence of consumption of high processed foods, among preterm and term infants and a higher prevalence of consumption of fruits, vegetables among preterm infants, at 12 months corrected age.

For low birth weight infants, an accelerated growth is expected to occur in neonatal period.¹⁸ Toftlund et al.²⁰ performed a follow-up study with breastfeeding preterm infants at hospital discharge (fortified or not fortified human milk), and observed accelerated growth mainly in immediate post-discharge period, regardless of feeding type during this period. Such phenomenon was observed in our preterm infants, which was evident when observing simple anthropometric measures of weight, length and head circumference between birth and two months of corrected age.

Preterm infants and those born with intrauterine growth restriction show short growth when compared to those born at term, however, a growth parameters recovery is expected, as head circumference up to 12 months, followed by length and weight.^{11, 21, 22} In our study, preterm infants presented anthropometric measures evolution during first year corrected age. However, between 8 and 10 months, a slowdown in evolution was shown. We hypothesize this slowdown reflects the period when infants begin to have a higher mobility, higher energy expenditure, and food consumption is not fully established.

Darendeliev et al.²³ found that preterm born children, appropriate for gestational age, presented higher z-score decrease during early childhood. The authors hypothesize that these children may be close to being born with growth restriction and their postnatal growth may have been a continuation of their insufficient intrauterine growth. Recently, Hollanders et al.²⁴ compared growth between extremely preterm infants and very low birth weight infants, indicating that, during childhood, length, weight and head circumference scores increased in non-preterm infants but with very low birth weight, while in very low birth weight preterm infants and preterm infants with not so low birth weight, scores remained stable or decreased. Moreover, when following these children, authors found that, despite of not preterm, but with very low birth weight, they remained smaller and lighter at age 19th.

Although we did not evaluate growth according to birth adequacy, most of our preterm infants were appropriate for gestational age and low weight; being able to fit in this same hypothesis, considering that we verified, our group of preterm babies with delayed growth for length and weight when compared to full-term infants, with statistical significance from 6th until 10th month of corrected age.

Regarding head circumference evolution, our preterm infants also had a growth rate below that of full-term children, showing acceleration up to the 8th month of corrected age, but with a decline between 10th and 12th months of corrected age, corroborating findings of Hollanders et al.²⁴ It is worth to notice the importance of observing head circumference recovery, considering the already known relationship between this measure and medium and long-term neurological outcomes.²⁵ Lidzba et al.²⁶ postulate that, among all anthropometric measures, head circumference growth

between hospital discharge and school age is the best independent predictor for cognitive outcome in very low birth weight preterm infants.

Body mass index (BMI) is used to assess body proportionality and provide important information about growth pattern in early childhood.²⁷ De Cunto et al.²⁷ , evaluated full-term infants and demonstrated that BMI is associated to adiposity in newborns and children, also suggesting that it is a more adequate measure than ponderal index. Ludington-Hoe et al.⁶ also evaluated full-term infants, and found that BMI during the first year of life was a predictor of nutritional status at 5 years. Overweight, obese, and morbidly obese children at 5 years of age had significantly higher BMIs during the first year of life than those with adequate weight at 5 years.

Liu et al.²⁸ also performed a study observing BMI pattern in the first year of life and found a greater chance of obesity at 6 years of age for those children whose BMI curve in the first years was higher. It is worth mentioning that the above-mentioned studies regard full-term children, with different metabolic and growth dynamics from preterm born children. More recently, same authors²⁹ found that preterm infants are among risk groups with the highest chances of maintaining an increasing BMI accelerated pattern in the first year of life

At 12 months of corrected age, preterm infants BMI is higher than full-term infants group. Despite of not being statistically significant, this acceleration should be observed with caution in clinical practice, as it may be a predictor of future metabolic alterations, since studies have indicated BMI as a good index for assessing adiposity not only in full-term born, but also for preterm infants.^{10, 30}

Subcutaneous fat thickness is specific for adipose tissue and can be measured non-invasively, being an important tool and a valid anthropometric indicator of infant body fat.^{31, 32} Rodriguez et al.³³ emphasize that subscapular and

suprailiac skinfolds reflect central fat, while tricipital and bicipital skinfolds reflect peripheral fat. Results from Schmelzle and Fusch³² show that skinfolds have the potential to predict adiposity in neonates younger than 4 months of age. Chen et al.³⁴ state that skinfolds have better predictive power than other anthropometric measures for neonatal body composition. Pecoraro et al.³⁵ reported the validity of tricipital skinfold as an adiposity indicator in early childhood, when evaluating 6-year-old children, verifying correlation between skinfold measures, BMI and bioimpedance.

In our study, preterm infants presented significantly lower tricipital skinfold thickness than those born at term, which we understand is a good result, considering the already known relationship between prematurity and excess adiposity predisposition, which is related to chronic not-transmissible diseases.³⁶ Therefore we suggest this measure to be incorporated in ambulatory routine, as another tool to help early identify adiposity excess with no use of sophisticated equipment that is not available everywhere; as body composition evaluation. Moreover, there are studies associating a higher percentage of lean mass in preterm children with better cognitive scores at 12 months of corrected age³⁷ and 4 years of age³⁸, reinforcing validity of skinfold measurement in routine assistance of high risk follow up programs worldwide.

With respect to type of milk consumption, especially breast milk, our results are in accordance to other studies. For example, Lima et al.³⁹ identified a decrease in prevalence of breastfeeding among preterm infants during the first month after discharge from 85% at discharge to 46% 30 days later. Ribas et al.⁴⁰ found only 7 (6.48%) out of 108 preterm infants to maintain breastfeeding until 6 months corrected age. We emphasize health care professionals must pay attention to practices that promote and protect breastfeeding. Jang and Hong⁴¹ show that a breastfeeding

support program is helpful to increase breastfeeding rates among preterm infants. Furthermore, the evidence about the benefits of breastfeeding for premature infants is already well founded.

Complementary feeding also contributes to growth and development. As for other parameters, there is lack of consensus about the perfect time for introducing complementary feeding for preterm infants.^{42,43} Our results shows a high prevalence of preterm infants initiating complementary feeding at 6 months corrected age, which is the nutritional recommendation for most of the preterm in our follow up program. We found no relationship between time of complementary feeding and growth parameters at 12 months corrected age, in accordance with results shown by Gupta et al.⁴⁴ who also did not find relationship between time of complementary feeding with z-score for weight at 12 months corrected age. However, in their study, the group receiving solid foods since the 4th month had higher rate of hospital admission, therefore the authors recommend initiating complementary feeding at 6 months corrected age, specially in infants less than 34 weeks of gestation which corroborate our recommendation of complementary feeding at 6 months corrected age.

Our results also show the consumption of non adequate foods at 12 months corrected age, as well as found by Ribas et al.⁴⁰ , who found consumption of sweet, teas and yogurt i.e, before 2 years corrected age. It is worrying that there is consumption of ultra-processed foods at such an early age, especially for premature infants who are at high risk for metabolic disorders. Through our results we cannot infer that there is a relationship between type of milk received or quality of food at 12 months corrected age and nutritional status. Nevertheless, we understand that nutritional counseling was an important part of the assistance during the follow-up of preterm infants leading to a greater consumption of minimally processed foods.

We emphasize that our study is one of the few presenting data regarding growth of a Brazilian preterm infants compared to a control group. We are aware of our limitations such as the small sample and that our food marker data are available only at 12 months corrected age. And for that we encourage more follow up studies evaluating growth, feed pattern and food quality of preterm infants.

Despite the lack of consensus on the best growth pattern for preterm infants it's clear that preterm infants' growth pattern is different from those born at term, requiring more time to achieve satisfactory scores, even when assessed at corrected age. Using feasible measures to assess growth and adiposity is critical for preterm children. Also, an interdisciplinary follow-up program with special attention to nutritional guidance is crucial to promote a healthier eating pattern in preterm infants.

Conflicts of interest: NONE

Funding

This study was supported by a grant from Bill and Melinda Gates Foundation, CNPQ and DECIT / Health Ministry, Brazil, Grant number 401596/2013-3. This study was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES), Finance Code 001. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

1. Terrazzan AC, Procianoy RS, Silveira, RC. Neonatal cord blood adiponectin and insulin levels in very low birth weight preterm and healthy full-term infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014;27:616–620.
2. Giabiconi E, Pham A, Brioude F, Mitanchez D, Netchine I. Diagnosis and Management of Postnatal Fetal Growth Restriction. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2018;32:523-534.
3. Gäddlin PO. Follow-up studies of very low birthweight children in Sweden. *Acta Paediatr.* 2011;100: 940-9.
4. Embleton ND, Katz J, Ziegler EE et al. Low-Birth Weight Baby: Born Too Soon or Too Small. *Nestlé Nutr Inst Workshop.* 2015;81:51–60
5. Silveira RC, Proicanoy RS. Crescimento nos primeiros anos de vida de recém-nascido de muito baixo peso. In: Programa de Atualização em Neonatologia - PRORN Artmed/Panamericana Editora Ltda. 2010;C7M4: 49-86.
6. Ludington-Hoe SM, Gittner, LS, Haller, HS. A Pilot Study: Does Obesity Begin in the First Year of Life? *Clinical Pediatrics.* 2013;52:507–512.
7. Fenton TR, Chan HT, Madhu A, et al. Preterm Infant Growth Velocity Calculations: A Systematic Review. *Pediatrics.* 2017;139:e20162045
8. Villar J, Giuliani F, Barros F, et al. Monitoring the Postnatal Growth of Preterm Infants: A Paradigm Change. *Pediatrics.* 2018;141:e20172467.
9. Rugolo LMSS. Crescimento e desenvolvimento a longo prazo do prematuro extremo. *J Pediatr.* 2005;81:S101-10

10. Cole TJ, Statnikov Y, Santhakumaran S, et al. Neonatal Data Analysis Unit and the Preterm Growth Investigator Group. Birth weight and longitudinal growth in infants born below 32 weeks' gestation: a UK population study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2014;99:F34–F4.
11. Ronque ERV, Werneck AO, Bueno MRO, Cyrino ES, Stanganelli LCR, Arruda M. Tracking of body adiposity indicators from childhood to adolescence: Mediation by BMI. *PLoS One*. 2018;13:e0191908.
12. Olsen IE, Lawson ML, Ferguson AN, et al. BMI curves for preterm infants. *Pediatrics*. 2015;135:571-81
13. Kuriyan, R. Body composition techniques Indian J Med Res. 2018;148:648-658.
14. Josefson JL, Nodzenski M, Talbot O, Scholtens DM, Catalano P. Fat mass estimation in neonates: anthropometric models compared with air displacement plethysmography. *British Journal of Nutrition*. Cambridge University Press. 2019;121:285–90.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Orientações para avaliação de marcadores de consumo alimentar na atenção básica [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015. 33 p. : il
16. Wendel D, Weber D, Leonard MB, Magge SN, Kelly A, Stallings V.A et al. Body composition estimation using skinfolds in children with and without health conditions affecting growth and body composition. *Annals of Human Biology*. *Turk J Pediatr*. 2008;50:207–213.

17. Horan M, Gibney E, Molloy E. et al. Methodologies to assess paediatric adiposity. *Ir J Med Sci.* 2015;184:53
18. Fenton TR, Kim, JH. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatrics.*2013;13:59.
19. WHO Anthro for personal computers, version 3.2.2, 2011: Software for assessing growth and development of the world's children. Geneva: WHO, 2010 <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>
20. Toftlund LH, Halken S, Agertoft L, Zachariassen G. Catch-Up Growth, Rapid Weight Growth, and Continuous Growth from Birth to 6 Years of Age in Very-Preterm-Born Children. *Neonatology.* 2018;114:285–293.
21. Cooke RJ. Improving growth in preterm infants during initial hospital stay: principles into practice *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 2016;101:F366-70.
22. Batista RFL, Silva, AAM, Barbieri MA, Simões VMF, Bettiol H. Factors Associated with Height Catch-Up and Catch-Down Growth Among Schoolchildren. *PLoS ONE.* 2012;7:e32903.
23. Darendeliler F, Coban A, Bas F, Bundak R, Disci R, et al. Catch-up growth in appropriate- or small-for-gestational age preterm infants. *Turk J Pediatr.* 2008;50:207-13
24. Hollanders JJ, van der Pal SM, van Dommelen, P et al. Growth pattern and final height of very preterm versus very low birth weight infants. *Pediatric Research.* 2017;82:317-323
25. Cooke RJ. Postnatal Growth Monitoring in Preterm Infants. *Neonatology.* 2018;114:181–183

26. Lidzba K, Rodemann S, Goel R et al. Growth in very preterm children: Head growth after discharge is the best independent predictor for cognitive outcome. *Early Human Development*. 2016;103:183-188.
27. De Cunto, A., Paviotti, G., Ronfani, L., Travan, L., Bua, J., Cont, G., & Demarini, S. Can body mass index accurately predict adiposity in newborns?. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*. 2014;99: F238–F239
28. Liu JX, Liu JH, Frongillo EA, Boghossian NS, Cai B, Hazlett LJ. Body mass index trajectories during infancy and pediatric obesity at 6 years. *Annals of Epidemiology*. 2017;27:708.e1–715
29. Liu JX, Liu JH, Frongillo, EA et al. Body mass index trajectories during the first year of life and their determining factors. *Am J Hum Biol*. 2019;31:e23188
30. Goswami I, Rochow N, Fusch G, et al. Length normalized indices for fat mass and fat-free mass in preterm and term infants during the first six months of life. *Nutrients*. 2016;8:E417.
31. Bedogni G, Lughetti L, Ferrari M, et al. Sensitivity and specificity of body mass index and skinfold thicknesses in detecting excess adiposity in children aged 8-12 years. *Ann Hum Biol*. 2013;30:132-9
32. Schmelzle HR; Fusch C. Body fat in neonates and young infants: validation of skinfold thickness versus dual-energy X-ray absorptiometry, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;76:1096–1100
33. Rodríguez G, Samper MP, Olivares JL et al. Skinfold measurements at birth: Sex and anthropometric influence. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. 2005;90:F273–F275

34. Chen LW, Tint MT, Fortier MV et al. Which anthropometric measures best reflect neonatal adiposity? *International Journal of Obesity*. 2017;42:501-506
35. Pecoraro P, Guida B, Caroli M, et al. Body mass index and skinfold thickness versus bioimpedance analysis: fat mass prediction in children. *Acta Diabetol*. 2003;40 Suppl 1:S278-S281
36. Gianni ML, Roggero P, Taroni F, Liotto N, Piemontese P, Mosca F. Adiposity in small for gestational age preterm infants assessed at term equivalent age. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2009;94:F368-F372.
37. Ramel, S.E. Zhang L, Misra S, Anderson C.G, Demerath E.W. Do anthropometric measures accurately reflect body composition in preterm infants. *Pediatr Obes*. 2017. 12, 72-77
38. Pfister KM, Zhang L, Miller NC, Ingolfsland EC, Demerath EW. et al. Early body composition changes are associated with neurodevelopmental and metabolic outcomes at 4 years of age in very preterm infants. *Pediatr Research*. 2018;84:713-718
39. Lima APE, Castral TC, Leal LP, et al. Exclusive breastfeeding of premature infants and reasons for discontinuation in the first month after hospital discharge. Aleitamento materno exclusivo de prematuros e motivos para sua interrupção no primeiro mês pós-alta hospitalar. *Rev Gaucha Enferm*. 2019;40:e20180406.
40. Ribas SA, de Rodrigues MCC, Mocellin MC, Marques ES, da Rosa GPC, Maganha CR. Quality of complementary feeding and its effect on nutritional status in preterm infants: a cross-sectional study. *J Hum Nutr Diet*. 2021;3:3-12.

41. Jang GJ, Hong YR. Effects of a breastfeeding support program on the prevalence of exclusive breastfeeding and growth in late preterm infants. *Child Health Nursing Research*. 2020;26:90-97.
42. Vissers K, M, Feskens E, J, M, van Goudoever J, B, Janse A, J: The Timing of Initiating Complementary Feeding in Preterm Infants and Its Effect on Overweight: A Systematic Review. *Ann Nutr Metab* 2018;72:307-315
43. Liotto N, Cresi F, Beghetti I, Roggero P, Menis C, Corvaglia L, Mosca F, Aceti A, on behalf of the Study Group on Neonatal Nutrition and Gastroenterology—Italian Society of Neonatology. Complementary Feeding in Preterm Infants: A Systematic Review. *Nutrients*. 2020; 12(6):1843.
44. Gupta S, Agarwal R, Aggarwal KC, et al. Complementary feeding at 4 versus 6 months of age for preterm infants born at less than 34 weeks of gestation: a randomised, open-label, multicentre trial [published correction appears in *Lancet Glob Health*. 2018 May;6(5):e499]. *Lancet Glob Health*. 2017;5:e501-e511.

Table 1 - Sample characterization (n=92)

	Preterm (n=63)	Term (n=29)	p Value
Male**	30 (47.6%)	15 (51.7%)	0.823
AGA**	43 (68.3%)	29 (100%)	<0.001
BW (g)***	1385 (1055- 1745)	3230 (3110 - 3490)	<0.001
L (cm)***	39 (35,5-42)	48 (48 -50)	<0.001
HC (cm)***	27,5 (25-29.5)	34 (33,5-35)	<0.001
GA (weeks)*	30±2.3	39,5±1.2	<0.001
Maternal Age (years)*	25.95±6.5	24.52±5.82	0.275
C-Section**	45 (71.4%)	2 (6.9%)	<0.001
Preeclampsia**	16 (25.4%)	0	0.002
Gestational diabetes mellitus **	7(11.1%)	0	0.095
UTI**	7 (11.1%)	0	0.093
Weight at discharge (g)***	2480 (2200 - 2785)	3230 (3095- 3490)	<0.001
GA at discharge (weeks)*	38±3	39.5±1.2	0.001
W z-score at discharge***	-1.05(-1,40 - - 0.91)	-0.10 (-1.64 - 0.32)	0.087

*Mean±SD; **Absolute frequency (%), ***Median(P25-75); AGA: appropriate for gestational age; BW: birth weight; L: Length; HC: head circumference; GA: gestational age; UTI: urinary tract infection

Table 2 - Comparison between anthropometric data from birth to 12 months for preterm infants and full-term infants

Variables	PT	AT	P value
Birth data			
	n=63	N=29	
W (kg)	1385 (1055- 1745)	3230 (3110 -3490)	<0.001
L (cm)	39 (35,5-42)	48 (48 -50)	<0.001
HC (cm)	27,5 (25-29.5)	34 (33,5-35)	<0.001
W z-score	-0.29 (-1.11 – 0.50)	0.05 (-0.43 –0.55)	0.064
L z-score	-0.36 (-1.35 – 0.52)	-0,71 (-1.09– -0.03)	0.197
HC z-score	-0.28 (-1.17 – 0.47)	-0,23 (-.063– 0.35)	0.423
2 months of age data			
	n=55	N=29	
W (kg)	5.2 (4.73 – 5.65)	5.42 (4.65 -5.85)	0.397
L (cm)	56.5 (55 – 58.5)	58(57–59.1)	0.040
HC (cm)	39 (38–40.5)	39(38.5– 40.25)	0.647
BMI (kg/m ²)	15.94 (14.53– 17.68)	15.45 (14.62–17.27)	0.697
W z-score	-0.10 (-1.06–0.45)	-0.16 (-0.71–0.76)	0.579
L z-score	-0.72 (-1.27– 0.45)	0.03(-0.50–0.70)	0.058
HC z-score	0.57 (-0.21–1.16)	0.61(-0.33–1.44)	0.596
BMI z-score	0.12 (-1.17–0.93)	-.22 (-0.91–0.76)	0.641
4 months of age data			
	n=46	N=29	
W (kg)	6.49 (5.9–7.18)	7.0 (6.72–7.37)	0.034
L (cm)	62.75 (60.88–64.5)	64 (62–65)	0.148
HC (cm)	41.5 (40.88–43)	42 (41–42.5)	0.570
BMI (kg/m ²)	16.6 (15.7–17.8)	17.42 (16.2–18.39)	0.103
W z-score	0.02 (-1.25–0.58)	0.51 (-0.29–0.95)	0.060
L z-score	-.12 (-0.91–1.03)	1.28 (-0.47–1.11)	0.210
HC z-score	0.32 (-0.54–1.23)	0.72 (-0.07–1.51)	0.494

BMI z-score	-0.21(-1.04–0.57)	0.19 (-0.33–0.94)	0.225
6 months of age data			
	n=56	N=29	
W (kg)	7.480 (6.83–7.98)	7.85(7.53–8.36)	0.014
L (cm)	66.25 (64.5–68)	69(65.7–69.4)	0.011
HC (cm)	43.4 (42.5–44.5)	43.5(43–44.25)	0.508
BMI (kg/m ²)	16.81(15.51– 18.14)	17.04(15.04–18)	0.725
W z-score	-0.19(-1.07–0.52)	0.50(-0.18–1.0)	0.036
L z-score	0.11(-1.11–0.96)	0.63 (-0.33–1.43)	0.017
HC z-score	0.22(-0.20–1.36)	0.61 (-0.16–1.38)	0.244
BMI z-score	-0.25(-1.15–0.58)	0.60 (-1.06–0.65)	0.725
8 months of age data			
	n=43	N=29	
W (kg)	8.55 (7.91–9.2)	9.33 (8.87–9.98)	0.042
L (cm)	71 (69.5–73)	73.5 (71.25–75.25)	0.009
HC (cm)	45 (44–46)	46 (45–47)	0.498
BMI (kg/m ²)	16.92 (15.48– 18.48)	17.27 (16.37–18.37)	0.848
W z-score	-0.26 (-.95–0.59)	0.66 (-0.10–1.06)	0.061
L z-score	-0.39 (-1.43–0.42)	0.62 (-0.29–0.98)	0.020
HC z-score	0.80 (-.32–1.26)	0.95 (0.33–1.87)	0.357
BMI z-score	0.20 (-0.85– 0.99)	0.32 (-0.33–1.01)	0.861
10 months of age data			
	n=39	N=29	
W (kg)	8.55 (7.91–9.2)	9.33 (8.87–9.98)	0.002
L (cm)	71(69.5–73)	73.5 (71.25–75.25)	0.001
HC (cm)	45 (44–46)	46 (45–47)	0.007
BMI (kg/m ²)	16.92 (15.48– 18.48)	17.27 (16.37–18.37)	0.204
W z-score	-0.26 (-0.95–0.59)	0.66 (-0.10–1.0)	0.003
L z-score	-.039 (-1.43–0.42)	0.62 (-0.29–0.98)	0.001
HC z-score	0.08 (-.32–1.26)	0.95 (0.33–1.87)	0.004

	0.20 (-0.85–0.99)	0.32 (-.33–1.0)	0.251
12 months of age data			
	n=63	N=29	
W (kg)	9.3 (8.55–10.0)	9.78 (9.0–10.24)	0.097
L (cm)	75 (73–77)	76.15 (74–77.88)	0.084
HC (cm)	46 (45 –47)	47.8 (46.6–49)	<0.001
BMI (kg/m ²)	16.6 (15.61–17.85)	16.65 (15.6–18.25)	0.977
UAC (cm)	16 (15–17)	14.85 (14.25–15.3)	0.004
TSF (mm)	6.3 (5–8.6)	8 (7.08– 8.85)	0.011
SSF (mm)	5.8 (4.2–7)	5.75 (5.2–7.38)	0.429
W z-score	-0.80 (-0.73–0.9)	0.24 (-0.27–0.94)	0.180
L z-score	0.11(-0.94–1.16)	0.39 (-0.35–1.31)	0.120
HC z-score	0.34 (-0.44–1.51)	1.83 (0.78–2.29)	<0.001
UAC z-score	1.16 (0.31–1.96)	0.31 (-0.14–0.89)	0.002
BMI z-score	1.56 (-0.83–0.84)	0.05 (-0.84–1.17)	0.983
TSF z-score	-1.23 (-2.4–0.35)	-0.03 (-0.7–0.46)	0.011
SSF z-score	-0.63 (-2.6–0.45)	-0.69(-1.3–0.72)	0.422

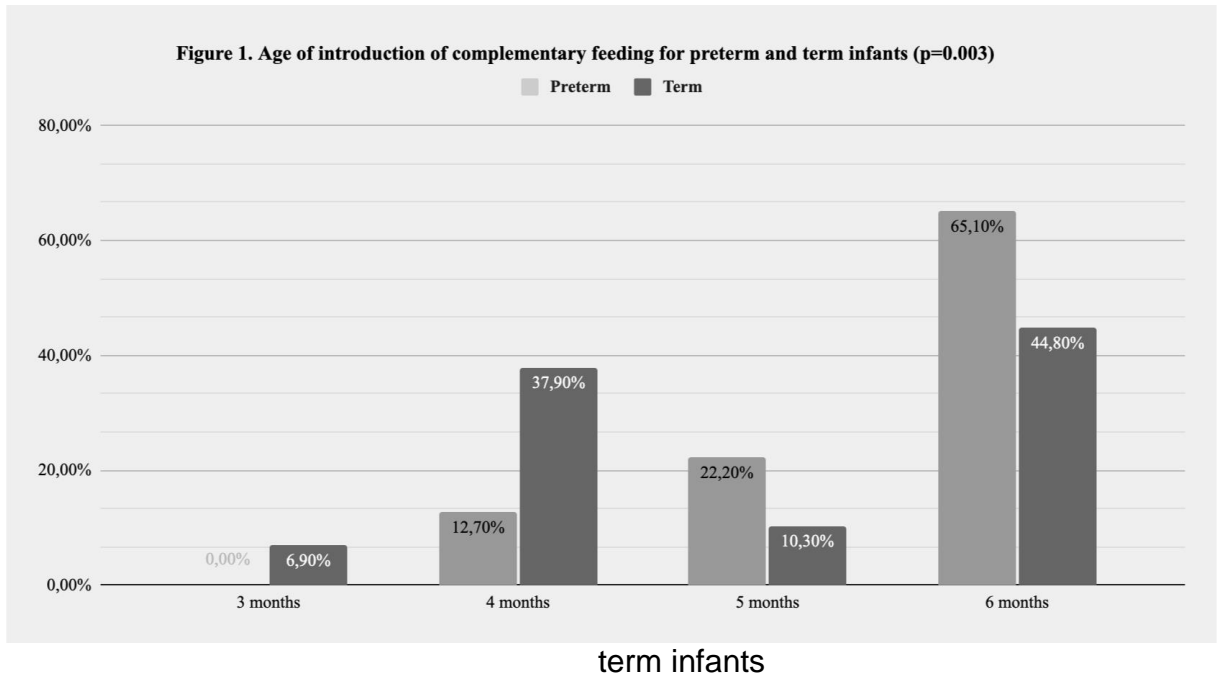
Data presented as Median (P25-75); PT: preterm infants; AT: full-term infants; W: weight; L: length; HC: head circumference; UAC: Upper Arm Circumference; BMI: body mass index; TSF: tricipital skinfold; SSF: subscapular skinfold

Table 3 - Food consumption markers at 12 months of age

	Preterm (n=63)	Term (n=29)	P value
Food consistency adequate for age	47 (75.9%)	21 (72.4%)	0.355
Sweet cookies	33 (53.4%)	15 (51.7%)	1.00
Sweet beverages	27 (39.7%)	10 (34.5%)	0.815
Sausage and equivalent food	32 (50,7%)	15 (53.6%)	0.820
Cereal and tubers	62 (98.3%)	25 (86.2%)	0.040
Beans	60 (95.2 %)	29 (100%)	0.550
Animal protein	59 (93.6%)	27 (93,1%)	1.00
Greens and vegetables	58 (92%)	20 (69%)	0.012
Fruits	61 (96.8%)	21 (72.45)	0.002

Absolute frequency (%), qui-square test

Figura 9 - Figure1. Age of introduction of complementary feeding for preterm and



9 CONCLUSÕES

Concluimos que o crescimento de crianças nascidas prematuras difere daqueles nascidos a termo, mesmo quando a idade corrigida é considerada. Embora os avanços na assistência tenham sido relevantes, estas crianças de alto risco mantêm crescimento aquém daquelas nascidas a termo, saudáveis.

Faz-se necessário estar atento à evolução dos parâmetros e referências para melhor avaliação do crescimento, sendo fundamental também que esta avaliação seja feita o mais precoce possível, a fim de identificar falhas no crescimento. O índice de Massa Corporal e aferição das dobras cutâneas são factíveis para serem incorporados à rotina assistencial durante o *follow up* de prematuros, a fim de incrementar a avaliação nutricional.

Para tanto, o *follow up* de prematuros de muito baixo, com presença de equipe interdisciplinar é uma das principais estratégias, uma vez que possibilita a avaliação global e integralizada da criança e sua família, contribuindo para melhores prognósticos e melhor qualidade de vida.

Concluimos, também, que há relação entre variações do microbioma e parâmetros de crescimento. A abundância microbiana do mecônio parece estar relacionada à adequação do peso ao nascer para a idade gestacional e à evolução do peso no período perinatal em prematuros. A abundância de unidades operacionais taxonômicas no mecônio difere entre crianças que atingem *catch up* de perímetro cefálico até o sexto mês de idade corrigida ou após esse período.

A modulação do microbioma está dentre as novas perspectivas para melhorar a saúde do ser humano. A literatura traz evidências robustas acerca dos benefícios em se manter a microbiota saudável para o bom estabelecimento do sistema

imunológico. A influência da microbiota para bom prognóstico em se tratando de recém-nascidos de alto risco, como os prematuros de muito baixo peso.

Novos estudos, de caráter longitudinal, avaliando fatores influenciadores da microbiota serão de grande valia para agregar conhecimento e auxiliar para o planejamento de novas estratégias de assistência.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de desenvolvimento desta tese, desde a concepção do projeto, passando pelas vivências durante a coleta de dados no ambulatório de seguimento de prematuros e nas visitas domiciliares, e por fim, culminando na escrita da tese e artigos foi enriquecedor. Foram alguns anos ultrapassando obstáculos na tentativa de obter o melhor resultado. A escrita da tese e a conclusão do doutorado resultaram em uma conquista profissional e pessoal, com aprendizados que levarei para toda a vida.

O estudo realizado tem importância não somente acadêmica, mas principalmente para a prática clínica, uma vez que os resultados apontam para a viabilidade de incorporar uma ferramenta simples e de baixo custo, como a aferição das dobras cutâneas, nos serviços de *follow up* de prematuros, como sendo de grande valia para averiguar composição corporal. Tal avaliação é certamente importante para a saúde do prematuro.

Quanto à microbiota, ainda se trata de um tema com diversos questionamentos e hipóteses, e a “avaliação da microbiota” ainda é uma estratégia pouco viável para prática clínica, tendo em vista todos os processos e protocolos necessários para que tenhamos resultados adequados e fidedignos. Contudo, com o avanço das pesquisas e com diversos estudos apontando para os efeitos benéficos do uso de probióticos em inúmeras situações, acredito que em breve teremos maior viabilidade também para avaliar a microbiota e aplicar os resultados desta avaliação na prática clínica.

APÊNCICE A - PROTOCOLO DE REGISTRO DE DADOS RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS

N código RN _____ Pront.: _____

SEXO: (1) masculino (2) feminino DN: ___ / ___ / ___ data alta: ___ / ___ / ___

Préclampsia (1) sim (2) não

Dados maternos:

Idade materna: _____ anos N° gestações: _____ Prematuros anteriores: (1) sim (2) não

N° consultas pré-natal: _____

DMG/ DM: (1) sim (2) não (9) ignorado

ITU/Inf. ovular: (1) sim (2) não (9) ignorado

Dados da internação hospitalar:

Tempo de internação: _____ dias IGO: _____ sem

Eco com _____ sem IG final: _____ sem

PN: _____ g Comp: _____ cm PC: _____ cm IGP (Ballard, sem): _____ sem

Classif. IG/P: (1) AIG (2) PIG Percentil <3: (1) não (2) sim TAX _____ na
admissão: _____

Tipo de parto: (1) _____ vaginal (2) _____ cesariana

(9) ignorado Indicação: _____

Apgar 1': _____ Apgar 5': _____ SNAPPE II: _____

Suporte nutricional:

NPT AA nas 24h dv: (1) sim (2) não (9) ignorado Tempo de NPT: _____ dias

Usou NPT do dia _____ ao dia _____

NPT plena (3g/kg/dia de AA) com 5dv: (1) sim (2) não (8) não usou NPT (9) ignorado

Início da nutrição enteral: _____ dv (___/___/___)

Enteral plena (150ml/kg/d): _____ dv (___/___/20__)

Leite materno: _____

Fórmula para PMT _____

Fórmula para primeiro semestre _____

Peso mínimo: _____ g _____ dv(___/___/200__)

Recuper. PN: _____ dv (___/___/20__)

Protocolo de registro de dados recém-nascidos prematuros

Dados da alta hospitalar

Peso: _____ g Comp: _____ cm PC: _____ cm PT: _____ cm PB: _____ cm

Alimentação: (1) SM exclusivo (2) Aleitamento misto (3) Fórmula exclusiva

Após alta

<u>Idade</u>	<u>Tipo de leite</u>	<u>dados antropométricos</u>					
		<u>P</u>	<u>C</u>	<u>PC</u>	<u>PB</u>	DCT	DCSE
2m	(1)LM (2)FL (3)LV						
4m	(1)LM (2)FL (3)LV						
6m	(1)LM (2)FL (3)LV						
8m	(1)LM (2)FL (3)LV						
10m	(1)LM (2)FL (3)LV						
12m	(1)LM (2)FL (3)LV						

APÊNDICE B - PROTOCOLO DE REGISTRO DE DADOS RECÉM-NASCIDOS A TERMO

N código RN _____ Pront.: _____

SEXO: (1) masculino (2) feminino DN: ___ / ___ / ___ data alta: ___ / ___ / ___

Préclampsia (1) sim (2) não

Dados maternos:

Idade materna: _____ anos N° gestações: _____ Prematuros anteriores: (1) sim (2) não

N° consultas pré-natal: _____

DMG/ DM: (1) sim (2) não (9) ignorado

ITU/Inf. ovular: (1) sim (2) não (9) ignorado

HAC: (1) sim (2) não (9) ignorado BR: _____ horas (1) ³18h (2) < 18h (9) ignorado

LA: (1) alterado (2) claro/ normal (9) ignorado

Cultura de estrepto B: (1) positiva (2) negativa (8) não fez

Corticóide: (1) sim completo (2) não (3) sim incompleto (9) ignorado

Dados da internação hospitalar:

Tempo de internação: _____ dias IGO: _____ sem Eco com _____ sem

IG final: _____ sem

PN: _____ g Comp: _____ cm PC: _____ cm IGP (Ballard, sem): _____ sem

Classif. IG/P: (1) AIG (2) PIG Percentil <3: (1) não (2) sim TAX _____ na
admissão: _____

Tipo de parto: (1) _____ vaginal (2) _____ cesariana

(9) ignorado Indicação: _____

Apgar 1': _____ Apgar 5': _____ SNAPPE II: _____

APÓS A ALTA – CONTATO TELEFÔNICO

<u>Idade</u>	<u>Tipo de leite</u>	<u>dados antropométricos</u>					
		<u>P</u>	<u>C</u>	<u>PC</u>	<u>PB</u>	DCT	DCSE
2m	(1)LM (2)FL (3)LV						
4m	(1)LM (2)FL (3)LV						
6m	(1)LM (2)FL (3)LV						
8m	(1)LM (2)FL (3)LV						
10m	(1)LM (2)FL (3)LV						
12m	(1)LM (2)FL (3)LV						

APÊNDICE C – TCLE GRUPO PREMATUROS

Título do Projeto: INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL NO PERÍODO PERINATAL NO CRESCIMENTO DE CRIANÇAS PREMATURAS DE MUITO BAIXO PESO

A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o crescimento de bebês prematuros e saber se existe relação entre este padrão de crescimento com a população de bactérias que habitam o intestino dos bebês. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: buscar dados sobre o período de internação, medir peso, comprimento, circunferência da cabeça e, também, medir a espessura da pele do braço.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são: incômodo com o tempo de aferição das medidas, tendo em vista que o bebê precisa ficar deitado para medir a circunferência da cabeça e o peso.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos para seu bebê, mas vai auxiliar para o aumento do conhecimento sobre as crianças prematuras e poderá influenciar e beneficiar futuros pacientes.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo específico com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá haver ressarcimento por despesas decorrentes da participação cujos custos foram absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa foram sempre tratados confidencialmente. Os resultados foram apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra. Rita de Cássia Silveira, pelo telefone 33598794 e com a nutricionista Ana Carolina Terrazzan (55) 33070519 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

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

Nome do participante da pesquisa:

Assinatura (*se aplicável*)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

APÊNDICE D – TCLE GRUPO CONTROLE

Título do Projeto: **INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL NO PERÍODO PERINATAL NO CRESCIMENTO DE CRIANÇAS PREMATURAS DE MUITO BAIXO PESO**

A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o crescimento de bebês prematuros e saber se existe relação entre este padrão de crescimento com a população de bactérias que habitam o intestino dos bebês. Para isto, também é necessário realizar avaliação do estado nutricional de crianças nascidas a termo e saudáveis, assim, teremos dados para comparação com as crianças prematuras. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: buscar dados sobre o nascimento, entrar em contato via telefone aos 2, 4, 6, 8, 10 meses para saber sobre o tipo de leite que o bebê está recebendo. E uma visita domiciliar aos 12 meses para medir peso, comprimento, circunferência da cabeça e, também, medir a espessura da pele do braço.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são: incômodo com o tempo de aferição das medidas, tendo em vista que o bebê precisa ficar deitado para medir a circunferência da cabeça e o peso.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos para seu bebê, mas vai auxiliar para o aumento do conhecimento sobre as crianças prematuras e poderá influenciar e beneficiar futuros pacientes.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a

assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo específico com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá haver ressarcimento por despesas decorrentes da participação cujos custos foram absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa foram sempre tratados confidencialmente. Os resultados foram apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra Rita de Cássia Silveira, pelo telefone 33598794 e com a nutricionista Ana Carolina Terrazzan (55) 33070519 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

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

Nome do participante da pesquisa

Assinatura (se aplicável)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.388.950

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será realizado com a amostra de recém-nascidos prematuros de muito baixo peso (idade gestacional < 32 semanas), e um grupo controle de recém-nascidos a termo saudáveis, todos nascidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, recrutados para o projeto Associação entre microbiota fetal, prematuridade e morbidades do recém-nascido pré-termo (aceito no CEP da instituição e registrado sob número 140009).

GRUPO CASOS – RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS

No momento de alta da UTI Neonatal os recém-nascidos são encaminhados ao Ambulatório de Seguimento de Prematuros do Hospital de Clínicas e na primeira consulta ambulatorial do recém-nascido os pais e/ou responsáveis serão convidados a participar do estudo, por meio de leitura e explicação do Termo de Consentimento Livre e esclarecido.

A coleta de dados do grupo de prematuros será realizada durante as consultas no Ambulatório de Seguimento, portanto não será necessário agendar consulta especificamente para a pesquisa. Conforme o protocolo de atendimentos do serviço, todas as crianças são atendidas mensalmente até os 6 meses de idade corrigida, e a partir desta idade a cada 2 meses até os 12 meses de idade corrigida, momento no qual será realizada avaliação nutricional.

Serão coletados do prontuário dados acerca do tipo de leite consumido pela criança (leite materno, fórmula substituta do leite materno ou outros tipos de leite), bem como momento de início da alimentação complementar (papa de fruta, papa principal ou alimentação da família). As crianças serão entrevistadas pela pesquisadora (ACT).

GRUPO CONTROLE – RECÉM-NASCIDOS A TERMO No momento de alta hospitalar os pais e/ou responsáveis serão convidados a participar do estudo de seguimento, por meio de leitura e explicação do Termo de Consentimento Livre e esclarecido.

Os pesquisadores manterão contato telefônico com as famílias com periodicidade de 2 meses, com objetivo de manutenção do vínculo com os participantes da pesquisa. Bem como, para garantir a atualização de informações de contato como telefones e endereços. Ainda, durante o contato telefônico os pais e/ou responsáveis serão questionados sobre tipo de leite consumido pela criança (leite materno, fórmula substituta do leite materno ou outros tipos de leite), bem como momento de início da alimentação complementar (papa de fruta, papa principal ou alimentação da família).

Aos 12 meses de idade as famílias serão convidadas a comparecer em consultório particular (munido de balança e estadiômetro pediátricos), para consulta clínica e realização da avaliação nutricional. Em caso de impossibilidade de comparecimento por parte das famílias os

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-003
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3350-7640 Fax: (51)3350-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.388.950

pesquisadores realizarão visita domiciliar para avaliação do grupo controle.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE para o grupo de crianças nascidas prematuras e controles.

Apresenta ficha de coleta de dados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 1.139.066 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 30/12/2015. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto e TCLE de 30/12/2015 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Para que possa ser realizado o mesmo deve estar cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras.

O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG.

Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.

A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na Intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_505463.pdf	30/12/2015 20:38:02		Aceito
Outros	Termo_Compromisso_UtilizacaoDados.pdf	30/12/2015 20:36:29	Ana Carolina Terrazzan	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-003
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: ospcpa@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.388.050

Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_DocAnaTerrazzan.pdf	30/12/2015 20:35:10	Ana Carolina Terrazzan	Aceito
Outros	CartaRetorno_ao_GPPG_DocAnaTerrazzan.docx	30/12/2015 20:34:54	Ana Carolina Terrazzan	Aceito
Outros	Declaracao_Funcoes_DocAnaTerrazzan.pdf	30/12/2015 20:33:05	Ana Carolina Terrazzan	Aceito
Outros	Anexo4_ProtocoloRegistroControle.docx	30/12/2015 20:30:55	Ana Carolina Terrazzan	Aceito
Outros	Anexo3_ProtocoloRegistroRNPT.docx	30/12/2015 20:30:11	Ana Carolina Terrazzan	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RNAT.doc	30/12/2015 20:27:15	Ana Carolina Terrazzan	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RNPT.doc	30/12/2015 20:25:19	Ana Carolina Terrazzan	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompleto_InfluenciadaMicrobiotaNoCrescimentoPrematuros.docx	30/12/2015 20:24:26	Ana Carolina Terrazzan	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 15 de Janeiro de 2016

Assinado por:
José Roberto Goldim
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-003
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7840 Fax: (51)3359-7840 E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br