



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Pediatria

Alimentação entérica e microbiota do recém-nascido

Diana Marques dos Santos

Orientado por:

Maria da Graça Oliveira

Janeiro 2023

Resumo

A microbiota intestinal consiste na população de microrganismos que coloniza o intestino humano, estando envolvida em funções como a digestão e síntese de nutrientes, desenvolvimento do sistema imunitário e do sistema nervoso central (neurogênese e mielinização), bem como barreira contra organismos patogénicos. Esta desenvolve-se progressivamente desde o nascimento e é influenciada por vários fatores, como o tipo de parto, exposição a antibióticos, alimentação do recém-nascido (leite materno ou suplementação), introdução de alimentos sólidos e fatores ambientais. A microbiota adquirida no início de vida é crítica para a determinação da resposta e tolerância imunitária, sendo que alterações do ambiente intestinal podem ser responsáveis por patologias do foro inflamatório, autoimune e alérgico em todo o ciclo de vida. Deste modo, a formação da microbiota neonatal detém um papel importante na prevenção destas patologias.

O leite materno modela a aquisição e o desenvolvimento da microbiota do recém-nascido através dos seus componentes bioativos, como os oligossacáridos do leite materno, lactoferrina e imunoglobulinas. Para além disso, é fonte de bactérias comensais, responsáveis pela colonização inicial adequada do intestino, evitando a disrupção da homeostase intestinal. Apesar de o leite materno ser o *gold standart* da nutrição infantil, o uso de fórmulas ao invés do aleitamento materno exclusivo tem vindo a aumentar, o que tem consequências a nível da composição e diversificação da microbiota intestinal.

Esta revisão da literatura tem como objetivo avaliar a influência da alimentação entérica do recém-nascido no desenvolvimento e composição da microbiota intestinal, comparando o aleitamento materno *versus* diferentes tipos de fórmulas infantis.

Palavras-chave: microbiota do recém-nascido, leite materno, fórmulas, prebióticos, probióticos

O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados.

Abstract

The intestinal microbiota consists of the population of microorganisms that colonizes the human intestine, being involved in functions such as digestion and synthesis of nutrients, development of the immune system and central nervous system (neurogenesis and myelination), as well as barrier against pathogenic organisms. It develops progressively from birth and is influenced by several factors, such as the type of delivery, exposure to antibiotics, feeding of the newborn (breastfeeding or formula feeding), introduction of solid foods and environmental factors. The microbiota acquired at the beginning of life is critical for the determination of immune response and tolerance, and alterations in the intestinal environment may be responsible for pathologies of the inflammatory, autoimmune and allergic forum throughout the life cycle. Thus, the formation of the neonatal microbiota has an important role in the prevention of these pathologies.

Breast milk models the acquisition and development of the newborn's microbiota through its bioactive components, such as oligosaccharides of breast milk, lactoferrin and immunoglobulins. In addition, it is a source of bacteria, responsible for the proper initial colonization of the intestine, avoiding the disruption of intestinal homeostasis. Although breast milk is the gold standart of infant nutrition, the use of formulas instead of exclusive breastfeeding has been increasing, which has consequences in terms of the composition and diversification of the intestinal microbiota.

This review aims to evaluate the influence of enteric feeding of the newborn on the development and composition of the intestinal microbiota, comparing breastfeeding versus different types of infant formulas.

Keywords: newborn microbiota, breast milk, formulas, prebiotics, probiotics

The Final Work expresses the opinion of the author. FMUL is not responsible for the contents presented.

Índice

1. Introdução	5
2. Microbiota intestinal	
2.1 Definição e composição	7
2.2 Funções da microbiota intestinal	9
2.3 Impacto da microbiota no desenvolvimento de patologias	11
2.4 Fatores que modelam o desenvolvimento da microbiota do recém-nascido	12
3. Leite materno	
3.1 Introdução	14
3.2 Componentes que influenciam a microbiota intestinal	
3.2.1 Oligossacáridos do leite materno	14
3.2.2 Microbiota do leite materno	16
3.2.3 Proteínas e péptidos antimicrobianos	17
3.2.4 Hormonas	20
3.2.5 Vesículas extracelulares	21
3.2.6 Membrana do glóbulo de gordura do leite	21
4. Suplementação	
4.1 Composição das fórmulas	23
4.2 Fórmulas com prebióticos	24
4.3 Fórmulas com probióticos	26
4.4 Fórmulas com simbióticos	26
4.5 Fórmulas com posbióticos	27
5. Aleitamento materno vs suplementação – impacto na microbiota do recém-nascido	28
6. Conclusão	31
7. Agradecimentos	32
8. Referências bibliográficas	33

Lista de abreviaturas

RN: recém-nascido

TGI: trato gastrointestinal

SCFAs: *small chain fatty acids*/ácidos gordos de cadeia curta

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

SNC: sistema nervoso central

HMOs: *human milk oligosaccharides*/oligossacáridos do leite materno

FUT-2: fucosiltransferase-2

FUT-3: fucosiltransferase-3

LNFP-1: lacto-N-fucopentaose 1

2'-FL: 2'-fucosilactose

LnNT: lacto-N-neotetraose

MFGE8: *milk fat globule epidermal growth factor VIII*

sIgA: imunoglobulina A secretória

MALT: tecido linfóide associado às mucosas

miRNA: micro ácido ribonucleico

TLR: *toll-like receptor*

MFGM: *milk fat globule membrane*/membrana do glóbulo de gordura do leite

LC-PUFAs: ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa

1. Introdução

A microbiota intestinal é constituída por bactérias, arqueobactérias, vírus, fungos e protozoários, atuando a nível do metabolismo do hospedeiro, para além de desempenhar função de barreira contra microrganismos patogénicos e estar envolvida no desenvolvimento do sistema imunitário e processos de neurogénese e mielinização. Acredita-se que o estabelecimento da microbiota no período neonatal e a ordem de colonização de diferentes espécies no recém-nascido e lactente tem impacto na saúde ao longo da vida. A disbiose, ou seja, a desregulação da microbiota, tem sido associada a aumento do risco para desenvolvimento de doenças alérgicas, patologia autoimune, diabetes, obesidade, doença inflamatória intestinal e síndrome do intestino irritável.

A colonização do trato gastrointestinal e a diversidade de espécies presentes é influenciada por vários fatores, incluindo o tipo de parto, a exposição a antibióticos, idade gestacional, fatores ambientais e geográficos, mas acredita-se que um dos principais determinantes do estabelecimento da microbiota neonatal é a dieta (aleitamento materno vs alimentação por fórmulas).

A Organização Mundial de Saúde recomenda o aleitamento materno exclusivo durante os primeiros 6 meses de vida. O aleitamento materno diminui a incidência e/ou gravidade de várias doenças infecciosas na infância, diminui o risco a longo prazo de diabetes, obesidade e doença atópica, bem como fornece, para além de macro- e micronutrientes, componentes bioativos que não estão presentes nas fórmulas infantis tradicionais, como oligossacáridos do leite materno, imunoglobulinas secretórias, lactoferrina, hormonas e bactérias, que vão influenciar o estabelecimento da microbiota do recém-nascido (Brink et al., 2020).

Por vários motivos, nem todos os recém-nascidos são amamentados, pelo que a fonte de nutrição será nesses casos a fórmula infantil. Esta apresenta diferenças em termos de composição relativamente ao leite materno, o que tem influência na microbiota intestinal. Recentemente têm sido desenvolvidas fórmulas infantis de nova geração, adicionando-se ingredientes bioativos com o objetivo de reproduzir efeitos benéficos ou semelhantes aos do leite materno na composição da microbiota intestinal, por exemplo

oligossacáridos do leite materno, probióticos e prebióticos. No entanto, a sua eficácia e segurança ainda não se encontram bem estudadas.

Os objetivos desta revisão narrativa incluem identificar os constituintes do leite materno que afetam a microbiota do recém-nascido, comparando a influência do aleitamento materno vs alimentação por fórmulas tradicionais e fórmulas com prebióticos e/ou probióticos no desenvolvimento e diversidade da microbiota.

2. Microbiota intestinal

2.1 Definição e composição

A **microbiota intestinal** corresponde à comunidade microbiana que coloniza o intestino humano, estabelecendo relações complexas com o hospedeiro. Para além dos microrganismos **Archaea, Bacteria e Eukarya**, também estão presentes **vírus**.

A microbiota é constituída por microrganismos autóctonos e por microrganismos transitórios. Alguns microrganismos patogénicos são considerados membros da microbiota, mas apenas se tornam uma ameaça quando o equilíbrio desta é perturbado (Milani et al., 2017).

A **homeostase da microbiota intestinal** é mantida através de **mecanismos de feedback positivo e negativo**. No caso de existir **feedback positivo**, ocorre **disrupção do equilíbrio**, pois uma ou várias bactérias começam a proliferar excessivamente. Quanto ao feedback negativo, este tem o objetivo de criar pressão seletiva nos constituintes da microbiota, através do sistema imune e da separação das bactérias por vários segmentos do intestino, impedindo a interação entre elas (Adak & Khan, 2019).

Relativamente às bactérias, existem cerca de 10^{14} bactérias no TGI e o conjunto de genomas bacterianos contém mais do que 3 milhões de genes. O ambiente intestinal favorece o crescimento de bactérias pertencentes a 7 filos – **Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia e Cyanobacteria**. No adulto, aproximadamente **90% das bactérias da microbiota intestinal pertencem aos filos Bacteroidetes** (Gram negativos que incluem géneros *Bacteroides* e *Prevotella*) e **Firmicutes** (Gram positivos que incluem *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus*) (Gomes, 2017).

A microbiota intestinal pode ser também dividida em 3 enterotipos de acordo com o género bacteriano prevalente: *Bacterioides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*. Contudo, esta divisão é artificial, no sentido que existe uma elevada variabilidade de combinações de enterotipos no ser humano (Adak & Khan, 2019).

O conteúdo microbiano do TGI varia ao longo dos seus segmentos: o estômago e intestino delgado proximal apresentam baixo número e diversidade de bactérias, ao

contrário do cólon, que apresenta mais de 30 géneros bacterianos identificados e pelo menos 500 espécies diferentes (Chong et al., 2018).

Ao longo do tempo tem-se tentado identificar um **core na microbiota intestinal**, ou seja, um conjunto de bactérias partilhado entre 95% dos indivíduos testados. Este conceito é importante porque variações significativas podem indicar uma disbiose. Para além disso, este *core* estará provavelmente envolvido no controlo da inflamação e imunidade inata. Outros estudos sugerem que existe um *core* de genes funcionais do microbioma e que alterações deste poderão influenciar diferentes patologias (Gomes, 2017).

Inicialmente, a microbiota intestinal apresenta uma baixa diversidade de espécies e um elevado fluxo bacteriano até aos 2-3 anos de idade. **O desenvolvimento da microbiota começa *in útero***, modelado pela presença de **bactérias na placenta e líquido amniótico**, apesar de ser difícil avaliar a importância destas face à colonização por milhões de bactérias durante e após o parto (Gopalakrishna & Hand, 2020). **Após o nascimento**, o TGI começa a ser colonizado por **anaeróbios facultativos**, como *Enterobacteriaceae* e espécies dos géneros *Enterococcus* e *Lactobacillus*, cujo objetivo é consumir oxigénio e criar um ambiente propício para o desenvolvimento de anaeróbios (Voreades et al., 2014). Os microrganismos anaeróbios, como os pertencentes aos géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium*, vão-se desenvolvendo gradualmente e contribuem para uma redução ao longo do tempo da razão anaeróbios facultativos/anaeróbios estritos. Com **a introdução de alimentos sólidos**, a abundância de *Bifidobacteriaceae* diminui, aumentando a prevalência de *Bacteroides*, *Ruminococcus* e *Clostridium*. No fim do primeiro ano de vida, o perfil microbiano é distinto para cada criança, existindo uma grande variabilidade individual neste período, enquanto pela idade dos **2 anos e meio – 3 anos** é atingida, em termos de composição, a **microbiota intestinal de adulto**, caracterizada pela dominância dos filos *Firmicutes* e *Bacterioidetes*. **Posteriormente, a microbiota intestinal permanece relativamente constante durante o ciclo de vida**, podendo sofrer alterações relacionadas com **mudança dos hábitos alimentares, terapêutica antibiótica ou modificação do estado fisiológico do indivíduo** (Gomes, 2017).

2.2 Funções da microbiota intestinal

A microbiota intestinal apresenta diversas funções essenciais para a manutenção do estado de saúde do ser humano, entre as quais a homeostase da energia, ao nível da expressão de genes que regulam o metabolismo lipídico.

As bactérias do cólon expressam enzimas capazes de metabolizar hidratos de carbono complexos, gerando metabolitos como os SCFAs, que incluem propionato, butirato e acetato, envolvidos em processos de expressão génica, quimiotaxia, diferenciação, proliferação e apoptose. O butirato apresenta características anti-inflamatórias, sendo importante como fonte de energia para as células do cólon. É também capaz de atenuar a translocação bacteriana e aumentar a função de barreira epitelial. O propionato ativa a gluconeogénese hepática, enquanto o butirato e o acetato têm uma ação lipogénica (Gomes, 2017).

Um componente importante da membrana celular bacteriana é o ácido siálico, que ocupa a porção terminal de várias glicoproteínas e glicolípidos da membrana celular. Algumas bactérias desenvolveram uma via de síntese de ácido siálico, enquanto outras utilizam ácido siálico proveniente do hospedeiro. O ácido siálico participa na interação entre bactéria-hospedeiro – ao cobrir a superfície celular, permite às bactérias escapar à resposta imune do hospedeiro, bem como interagir com superfícies celulares específicas. Para além disso, trata-se de um precursor do ácido polissialico, que é um constituinte da molécula de adesão de células neuronais, sendo essencial para o desenvolvimento cerebral. Um estudo em porcos lactentes analisou a suplementação com ácido siálico sob a forma de glicomacropéptido caseína, desde o 3º até ao 35º dia de vida, tendo sido reportado um aumento da expressão de mRNA de genes associados à aprendizagem (Brink & Lönnnerdal, 2020).

A microbiota está envolvida também na desconjugação de ácidos biliares: *Bacteroides intestinalis*, mas também *Bacteroides fragilis* e *Escherichia coli*, têm a capacidade de desconjugar e desidratar os ácidos biliares primários não reabsorvidos no intestino para biotransformação e convertê-los em ácidos biliares secundários no cólon do hospedeiro.

A microbiota é capaz de converter **fármacos inativos (pró-fármacos) em formas ativas**, como a sulfasalazina, utilizada no tratamento da colite ulcerosa. Para além disso, pode também **alterar a eficácia/toxicidade de xenobióticos**, como é o caso da digoxina.

As bifidobactérias produzem **folato**, essencial para os processos metabólicos do hospedeiro, como a síntese e reparação do ácido desoxirribonucleico. Outras vitaminas que são produzidas pela microbiota são **vitamina K2 ou menaquinona** (Dominguez-Bello et al., 2019), **riboflavina, biotina e ácido nicotínico** (Gomes, 2017).

Outras funções incluem o **desenvolvimento e estimulação do sistema imunitário e do TGI do hospedeiro**. A maturação do sistema imune no período pós-natal depende do estabelecimento da microbiota intestinal. Vários estudos demonstraram o papel da microbiota neonatal no **desenvolvimento de células T reguladoras FoxP3+**, sendo que um deles relata que a colonização de ratinhos recém-nascidos por espécies de *Clostridium* da microbiota resultava em maior número de células T reguladoras FoxP3+ na idade adulta. Outro estudo demonstrou o papel da colonização no período neonatal por *Bacterioides fragilis* - esta bactéria expressa polissacárido A, importante para a **inibição de células iNKT e desenvolvimento de células T reguladoras no intestino**. Outros papéis incluem a secreção de **IL-22** e **efeitos diretos no sistema imune pela sinalização MAMP (microorganism-associated molecular pattern)** (van den Elsen et al., 2019).

Os metabolitos bacterianos podem induzir **alterações epigenéticas** como modificações da cromatina (van den Elsen et al., 2019).

A microbiota intestinal apresenta uma **função barreira**. Os membros da microbiota, como *L. fermentum*, *L. salivarius* e *L. gasseri*, levam ao **aumento da produção de mucinas pelas células caliciformes**, formando-se uma camada de glicoproteínas que lubrifica e protege o epitélio contra agentes patogénicos (Olivares et al., 2006).

Por fim, nos últimos anos propôs-se que a microbiota intestinal influencia o **desenvolvimento do SNC através do eixo cérebro-intestino-microbiota**. Os metabolitos e produtos bacterianos, entre os quais o ácido siálico referido anteriormente, atuam como moléculas sinalizadoras, com efeitos a nível do SNC e do sistema nervoso entérico, afetando a neurogénese, mielinização, função das células da glia, formação das sinapses

e a permeabilidade da barreira hemato-encefálica (Heiss & Olofsson, 2019). Uma disbiose poderá traduzir-se numa resposta inflamatória; esta contribui para a perda da barreira intestinal, com translocação de componentes bacterianos para a circulação, com ativação do sistema imune e produção de citocinas pró-inflamatórias, afetando o desenvolvimento e função do SNC (Cerdó et al., 2019).

2.3 Impacto da microbiota no desenvolvimento de patologias

A compreensão da microbiota e das suas funções no hospedeiro permite perceber de que forma esta poderá influenciar o início e progressão de determinadas patologias, levando ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

O estabelecimento de uma microbiota intestinal saudável após o nascimento contribui para o estado de saúde do indivíduo ao longo da vida. Portanto, **a formação da microbiota no período neonatal é uma fase chave no sentido em que qualquer disrupção poderá predispor a patologia, sendo também visto como um potencial alvo de prevenção em saúde.**

A associação da microbiota às doenças autoimunes é explicada pela hipótese da higiene: a ausência de uma microbiota robusta resulta em defeitos no desenvolvimento e regulação do sistema imune (Bertelsen et al., 2016).

As alterações da microbiota intestinal foram associadas a várias doenças crónicas, como obesidade, diabetes, cirrose, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal, bem como ao desenvolvimento de cancro colorrectal, gástrico e prostático. **Pensa-se que os mecanismos implicados incluem a produção de genotoxinas pelas bactérias, a formação de compostos cancerígenos pelo metabolismo de elementos da dieta pelas bactérias e a ativação de cascatas inflamatórias** (Voreades et al., 2014).

2.4 Fatores que modelam o desenvolvimento da microbiota do recém-nascido

Os fatores que modelam o desenvolvimento da microbiota do recém-nascido são a idade gestacional (parto termo vs parto pré-termo), via de parto (parto vaginal vs cesariana), contacto pele a pele, exposição a antibióticos, fatores geográficos, fatores maternos (por exemplo, a dieta, a composição da microbiota materna e a genética) e o tipo de alimentação (aleitamento materno vs alimentação artificial). Apesar de estes fatores terem sido identificados, a sua importância na estrutura da microbiota a longo prazo e na relação com certas patologias continua a ser debatida.

No caso da idade gestacional, os recém-nascidos prematuros com menos de 32 semanas de gestação apresentam uma superfície intestinal mais permeável e uma maior vulnerabilidade a disbiose comparativamente a recém-nascidos de termo (Morais et al., 2021). Pelo subdesenvolvimento intestinal em termos peristálticos, de função barreira e do sistema imune, há um maior risco de doenças infecciosas como sépsis e enterocolite necrotizante (Korpela et al., 2018).

Durante o parto, se este for vaginal, o recém-nascido vai contactar com microrganismos da flora vaginal, pele e TGI da mãe, por exemplo *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp (Chong et al., 2018). Por outro lado, se o parto for por cesariana, na primeira hora de vida estes RN irão apresentar maiores níveis de anaeróbios facultativos como *Enterobacteriaceae* e *Enterococcaceae*. Contudo, estas diferenças na microbiota só estão presentes no 1º mês de vida (Gopalakrishna & Hand, 2020).

A exposição a antibióticos pode aumentar os níveis de anaeróbios facultativos, como *Enterobacteriaceae*, e uma diminuição de *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium* (Gopalakrishna & Hand, 2020).

No caso da dieta materna, um estudo em ratinhos demonstrou que uma dieta materna com elevado teor em gorduras durante o período perinatal pode afetar a microbiota do recém-nascido; os filhos de ratinhos fêmea alimentadas com ração rica em gorduras apresentavam diferenças na microbiota fecal em comparação com filhos de ratinhos fêmea alimentados com ração normal: encontrou-se uma diminuição de bactérias

favoráveis e aumento de bactérias desfavoráveis (*Lachnoclostridium* e *Desulfovibrio*), bem como menor diversidade e abundância de *Lactobacillus* (Zheng et al., 2022).

A constante interação entre a microbiota e componentes dos alimentos no TGI leva à hipótese de que a dieta é um dos principais modeladores da evolução da microbiota ao longo da vida. Portanto, o tipo de alimentação do RN terá efeitos significativos no desenvolvimento da microbiota saudável.

3. Aleitamento materno

3.1 Introdução

O leite materno é a fonte nutritiva de eleição para o RN, apresentando o equilíbrio ideal de nutrientes como hidratos de carbono, proteínas e lípidos, sendo que a sua composição se altera consoante as necessidades do RN e lactente (Lyons et al., 2020). O aleitamento materno confere proteção contra infeções respiratórias e gastrointestinais e uma diminuição do risco de doenças inflamatórias como asma, atopia, diabetes, obesidade e doença inflamatória intestinal. Para além disso, está associado a um melhor desenvolvimento cognitivo (Doare et al., 2018).

Para além de macronutrientes, o leite materno possui componentes com funções biologicamente ativas que intervêm no desenvolvimento da microbiota intestinal, tais como os oligossacáridos do leite humano, várias bactérias que formam a microbiota do leite materno, proteínas e péptidos com funções antimicrobianas, hormonas, vesículas extracelulares e a membrana do glóbulo de gordura do leite.

3.2 Componentes que influenciam a microbiota intestinal

3.2.1 Oligossacáridos do leite materno

Os HMOs constituem o terceiro maior componente do leite materno (Chong et al., 2018). São hidratos de carbono complexos, solúveis, formados a partir de combinações de 5 monossacáridos: glucose, galactose, N-acetilglucosamina, fucose e ácido siálico (Walsh et al., 2020). Todos os HMOs contêm lactose na terminação redutora, que é alongada pela adição de unidades de N-acetilglucosamina. A sua concentração no leite materno atinge o nível máximo no colostro (20-23 g/L) e diminui no leite maduro (12-14 g/L) (Wiciński et al., 2020).

A produção de HMOs nas glândulas mamárias é geneticamente determinada. Diferentes perfis de HMOs ocorrem como resultado da expressão de certas enzimas transferases nos lactócitos, como FUT-2 e FUT-3, sendo que a etnia e o estadió de lactação também podem ter influência. Os polimorfismos na FUT-2 e FUT-3 resultam em diferentes perfis de HMOs, que por sua vez podem levar a um maior ou menor grau de proteção contra determinadas infeções (Andreas et al., 2015). As mulheres que expressam FUT-2

apresentam uma maior diversidade de HMOs do que mulheres que não secretam esta fucosiltransferase (Vandenplas et al., 2018).

Os HMOs influenciam o estabelecimento da microbiota através de vários mecanismos. Em primeiro lugar, têm a capacidade de se ligar a bactérias patogênicas no lúmen intestinal, alterando a conformação dos locais de ligação das bactérias aos recetores celulares. Depois, modulam a resposta imune das células epiteliais intestinais ao alterarem a expressão de recetores celulares, prevenindo a ligação de bactérias patogênicas aos enterócitos. Para além disso, não sendo digeridos pelo organismo humano, funcionam como prebióticos – favorecem o crescimento de certas estirpes de bactérias benéficas como *Bifidobacterium infantis*, que utilizam os HMOs como substrato para processos fermentativos. Um estudo recente demonstrou também que os HMOs podem modificar a atividade transcricional de certas bactérias como *B. fragilis* ao invés de modificarem a sua abundância relativa. Outra bactéria comensal, *E.coli*, beneficia indiretamente dos HMOs ao consumir os metabolitos gerados pela digestão de HMOs por *B. fragilis* (van den Elsen et al., 2019).

Acredita-se que as funções dos HMOs expliquem em parte as diferenças que existem entre a microbiota de RN amamentados e de RN alimentados por fórmula, uma vez que não estão presentes nas fórmulas tradicionais (Vandenplas et al., 2018).

Enquanto a microbiota dos RN amamentados é representada por 90% de bifidobactérias e lactobacilos, a microbiota dos RN alimentados por fórmulas sem HMOs adicionados é composta por 40-60% de bifidobactérias e lactobacilos, e o restante consiste em *Enterobacteriaceae* e *Bacterioides*. Para além disso, o ritmo de estabelecimento da microbiota é maior em RN amamentados por mãe que expresse FUT-2 do que RN amamentados por mãe que não expresse FUT-2. A composição da microbiota é ligeiramente diferente entre estes dois grupos, com maior colonização por *Bifidobacterium adolescentis* e ausência de *Bifidobacterium catenulatum* nos RN amamentados por mãe que não expresse FUT-2 (Boudry et al., 2021).

A análise de HMOs e da composição da microbiota fecal de bebés amamentados de 1 e 3 meses mostrou que 2'-FL e LNFP-I, que são os principais HMOs presentes no leite materno de mães que secretam FUT-2, afetam a microbiota intestinal do RN. De entre

os HMOs sintetizados, 2'-FL e LNnT são os mais estudados e considerados seguros. A composição da microbiota fecal de RN alimentados por fórmulas com 2'-FL e LNnT é mais semelhante à dos RN amamentados em termos de diversidade microbiana do que a microbiota fecal dos RN alimentados por fórmulas não suplementadas com estes HMOs (Wiciński et al., 2020). A suplementação com 2'-FL e LNnT foi associada a menor prescrição de antibióticos durante o 1º ano de vida, apesar de os perfis de microbiota fecal não diferirem em RN amamentados e não amamentados aos 12 meses de vida (Boudry et al., 2021).

Contudo, nem tudo se encontra esclarecido acerca dos HMOs, nomeadamente as funções de cada HMO individual, a síntese em laboratório para suplementação e a manipulação da expressão de HMOs.

3.2.2 Microbiota do leite materno

O leite materno é colonizado por bactérias que incluem *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacteria*, *Enterococcus* e membros da família *Enterobacteriaceae*. Foram identificadas centenas de espécies bacterianas, sendo que o colostro apresenta maior diversidade em comparação com o leite de transição e com o leite maduro.

A origem das bactérias do leite materno não está bem esclarecida. Pode haver contribuição das bactérias comensais da pele da região areolar, mas também se coloca a hipótese de que exista translocação de bactérias do intestino materno através de internalização por células dendríticas, circulando estas por via linfática e hemática até às glândulas mamárias (Doare et al., 2018).

Foram propostos alguns fatores influenciadores da microbiota do leite materno, entre os quais fatores ambientais e demográficos, o estadió de lactação, o tipo de parto, o índice de massa corporal da mãe e a paridade. Também o modo de amamentação pode influenciar a microbiota do leite, tendo sido demonstrado que o leite materno extraído por bomba apresenta mais potenciais bactérias patogénicas e menos bifidobactérias e espécies da cavidade oral. Para além disso, doenças maternas (incluindo mastite), antibioterapia e quimioterapia podem alterar a diversidade bacteriana (Boudry et al., 2021).

Os RN amamentados partilham cerca de 28% dos microrganismos presentes nas fezes com os microrganismos do leite materno. Para além disso, a frequência de microrganismos partilhados aumenta de acordo com a frequência de mamadas de forma dose-dependente, o que sugere a transferência de bactérias do leite materno para o intestino do RN, influenciando assim a formação da microbiota do RN (Doare et al., 2018).

As bactérias presentes no leite materno têm efeitos a curto e longo prazo na redução da incidência e gravidade de infeções bacterianas em RN amamentados. As bactérias comensais podem competir com bactérias patogénicas em termos de nutrientes ou locais de ligação na mucosa intestinal, e ainda expressar propriedades antimicrobianas – os lactobacilos inibem a adesão e crescimento de estirpes de *Escherichia coli*, *Shigella spp*, *Pseudomonas spp* e *Salmonella spp* (Doare et al., 2018). Outros papéis da microbiota do leite materno incluem a modulação da produção de citocinas, a indução de IgA secretória e o conseqüente impacto na função de barreira intestinal.

Contudo, apesar dos estudos realizados, persistem dúvidas acerca da origem da microbiota do leite materno, a sua viabilidade, os fatores que influenciam a sua composição e a contribuição para a formação da microbiota intestinal do RN.

3.2.3 Proteínas e péptidos antimicrobianos

A lactoferrina corresponde a 20% das proteínas do leite materno. Encontra-se presente em maiores concentrações no colostro (5 g/L) em comparação com o leite maduro (3 g/L). A capacidade digestiva reduzida do recém-nascido protege contra a degradação da lactoferrina e mantém as suas propriedades funcionais.

É uma proteína ligante de ferro com capacidades bactericidas, bacteriostáticas e imunomoduladoras. Tem efeito citotóxico direto contra vários microrganismos como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli*, *Vibrio cholera*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Outra função inclui o sequestro do ferro, tornando-o indisponível para uso pelas bactérias, que necessitam de ferro para o seu crescimento. Para além disso, impede a formação de biofilmes e a interação das bactérias com as células epiteliais do hospedeiro (Gopalakrishna & Hand, 2020). A nível imunomodulador, induz a ativação de macrófagos na resposta fagocitária contra bactérias Gram positivas.

Portanto, a lactoferrina protege contra infecções bacterianas e auxilia no desenvolvimento de uma microbiota benéfica no RN. A quantidade de bifidobactérias e lactobacilos nas fezes de RN correlaciona-se de forma positiva com os níveis de lactoferrina fecal. Para além disso, em estudos que avaliaram a suplementação com lactoferrina no RN, demonstrou-se uma redução da incidência de sépsis de início tardio em RN pré-termo suplementados com lactoferrina bovina comparando com placebo (Boudry et al., 2021).

Outras proteínas e péptidos antimicrobianos presentes no leite materno incluem a lisozima, calprotectina, defensinas, MFGE8, citocinas e imunoglobulinas secretórias.

A **lisozima** é uma **enzima que degrada a parede celular das bactérias Gram positivas**. Está presente numa concentração de cerca de 0,32 g/L no colostro. Um estudo *in vitro* mostrou que pode atuar de **forma sinérgica com a lactoferrina: a lactoferrina liga-se aos lipossacáridos da membrana das bactérias Gram negativas, criando orifícios na membrana, através dos quais a lisozima penetra, degradando os peptidoglicanos das bactérias, tendo assim um efeito bactericida** (Boudry et al., 2021).

As proteínas S100A8 e S100A9 e o seu complexo extracelular S100A8–A9, também conhecidas por calprotectina, estão presentes em elevadas quantidades no leite materno, apresentando um papel no desenvolvimento da microbiota intestinal e do sistema imune do RN. Elevados níveis de calprotectina demonstraram capacidade antimicrobiana, que pode ser atribuída à sua capacidade de **quelção de iões metálicos, resultando na inibição do crescimento de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do grupo B**. Um estudo em ratinhos demonstrou que a perda de S100A8 e S100A9 altera o fenótipo dos macrófagos presentes na lâmina própria do cólon. Ratinhos recém-nascidos sem produção de S100 apresentavam níveis reduzidos da **proteína CX3CR1, diminuição do mRNA de IL-10 e TGF- β , bem como menos células T reguladoras**. Para além disso, apresentavam **maior abundância de *Enterobacteriaceae* na microbiota fecal**. Pelo contrário, introduzir S100 em ratinhos após o nascimento prevenia a expansão de *Enterobacteriaceae*, aumentava a quantidade de células T reguladoras, de proteína CX3CR1 e de mRNA de IL-10 no intestino, reduzindo também a morte por sépsis neonatal. Portanto, o défice de calprotectina no intestino de RN

umenta o risco de desenvolvimento de uma microbiota não favorável (Willers et al., 2020).

As **defensinas** do leite materno também demonstraram capacidades antimicrobianas e de modulação da microbiota intestinal, sendo que a **β -defensina 1 promove a maturação de células dendríticas.**

O **MFG8 ou lactaderina** previne a enterocolite necrotizante por limitar a permeabilidade intestinal. Elevados níveis de lactaderina no leite materno foram associados a um ambiente intestinal anti-inflamatório (Kalbermatter et al., 2021).

As **citocinas** são constituintes essenciais do sistema imune, estando o TGF- β presente no leite materno. Este estimula a produção de IgA pela mucosa e inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Portanto, está envolvido na maturação do sistema imune do RN. As citocinas participam no estabelecimento de tolerância a bactérias comensais, mas o seu papel no desenvolvimento da microbiota intestinal ainda precisa de ser melhor caracterizado (Boudry et al., 2021).

Das imunoglobulinas secretórias IgG, IgM e IgA, a **slgA** é a que tem um papel mais claro no estabelecimento de uma microbiota saudável, apoiado pelo facto de em indivíduos com défice total de IgA a microbiota intestinal ser constituída principalmente por *Enterobacteriaceae*. A slgA é produzida pelas **mucosas** e **apresenta efeitos antibacterianos ao ligar-se às bactérias, impedindo a invasão do epitélio da mucosa, prevenindo a expansão e penetração de bactérias patogénicas enquanto o sistema imunitário intestinal se encontra em desenvolvimento.** Permite a remoção de bactérias inflamatórias/invasivas do microbioma e previne a sua interação com outras bactérias intestinais e aquisição de material genético. **Também pode modular a composição bacteriana, a expressão génica e a função metabólica da microbiota por ligação independente de antigénio às bactérias.** Regula o crescimento de uma microbiota saudável ao **promover o crescimento de *Bacterioides* e *Firmicutes*, enquanto limita o crescimento de anaeróbios facultativos inflamatórios como *Enterobacteriaceae*.** O leite materno é a única fonte de slgA nas primeiras semanas de vida uma vez que o intestino do RN demora cerca de 3-4 semanas a produzir células B secretoras de IgA. A **especificidade da slgA no leite materno depende da exposição materna a**

microrganismos patogénicos e das bactérias comensais no intestino materno (Gopalakrishna & Hand, 2020).

A **IgG secretória** é transferida para o RN quer *in utero* quer através do aleitamento materno. É importante para **funções de opsonização e citotoxicidade mediada por anticorpos**, sendo crítica para o controlo de infeções entéricas por exemplo por *Enterobacteriaceae*. Para além disso, **previne a ativação do MALT, auxiliando na manutenção da homeostase da microbiota** (Gopalakrishna & Hand, 2020).

3.2.4 Hormonas

No leite materno encontram-se presentes hormonas pituitárias, hipotalâmicas, tiroideias, paratiroideias, esteroides, insulina, grelina, leptina, adiponectina e fatores de crescimento (EGF, IGF-I e IGF-II, relaxina, TGF- α e TGF- β).

As hormonas do leite materno permanecem ativas, possivelmente devido a modificação pós-transcricional na glândula mamária antes da sua secreção para o leite materno, o que pode aumentar a resistência à digestão.

Influenciam a proliferação de células intestinais na mucosa, a atividade de várias enzimas e a expressão de transportadores de glucose. Contudo, o seu papel no desenvolvimento da microbiota não está esclarecido. Recentemente, um estudo em RN com 2 semanas de vida amamentados mostrou uma associação positiva entre a insulina do leite materno e a diversidade e abundância de *Enterobacteriaceae*, bem como uma associação negativa entre a insulina do leite materno e a abundância de *Streptococcaceae*. Para além disso, a leptina e a insulina do leite materno foram associadas a diminuição de proteases bacterianas implicadas na permeabilidade intestinal, bem como redução de piruvato cinase, um marcador de inflamação intestinal. No entanto, não houve associação entre a leptina do leite materno e a microbiota (Boudry et al., 2021).

3.2.5 Vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares foram recentemente identificadas no leite materno. Contêm mRNA, miRNA e proteínas citosólicas e de membrana, estando envolvidas na sinalização celular.

As vesículas extracelulares têm o potencial de modular a interação microrganismo-hospedeiro, nomeadamente na resposta das células epiteliais do intestino e das células do sistema imune na presença de *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*. As vesículas aumentam a agregação e fagocitose das bactérias e modulam as respostas TLR. No entanto, não se sabe ainda se as vesículas presentes no leite humano têm estas capacidades (Doare et al., 2018).

3.2.6 Membrana do glóbulo de gordura do leite

A membrana do glóbulo de gordura do leite (*milk fat globule membrane*, MFGM) é constituída por proteínas, fosfolípidos, esfingolípidos, gangliosidos, colina, ácido siálico e colesterol. Esta não está presente nas fórmulas infantis, sendo substituída por óleos vegetais.

A MFGM é digerida a vários níveis do TGI. Como o RN apresenta um TGI imaturo, os componentes da MFGM podem não ser totalmente digeridos a nível do estômago e jejuno-íleon, conseguindo atingir o cólon.

Os componentes desta membrana têm influência a nível do desenvolvimento cognitivo e intestinal. Para além disso, reduzem o risco de infeção do RN através da diminuição da aderência de bactérias patogénicas ao epitélio intestinal (Brink & Lönnerdal, 2020).

A MFGM também apresenta efeitos no estabelecimento da microbiota intestinal. Um estudo mostrou que a adição de gangliosidos a fórmulas em RN pré-termo diminuía os níveis de *E. coli* fecal e aumentava os níveis de bifidobactérias (Rueda et al., 1998). Outro estudo em suínos avaliou o efeito da adição de concentrado de fosfolípidos e frações de MFGM de bovinos, caprinos e ovinos na microbiota. A digestão do concentrado de fosfolípidos e MFGM foi efetuado *in vitro*, sendo depois fermentado com inóculos ileais e cecais recolhidos de suínos alimentados por fórmula 20 dias antes da colheita. Verificou-se que o concentrado de fosfolípidos e a MFGM caprina reduzem a

diversidade da microbiota ileal. A MFGM caprina aumentava e o concentrado de fosfolípidos reduzia o rácio ileal de *Firmicutes* : *Proteobacteria*. A MFGM bovina e ovina aumentava a produção de ácido acético, butírico e hexanóico, bem como reduzia a quantidade ileal de bactérias do filo *Proteobacteria*. Portanto, os efeitos da MFGM e do concentrado de fosfolípidos a nível da população microbiana ocorreram principalmente a nível do íleon (Thum et al., 2020).

Contudo, vários dos estudos efetuados reportam os efeitos da MFGM associada a outras substâncias, pelo que o efeito específico da MFGM pode não estar totalmente esclarecido.

4. Suplementação

4.1 Composição das fórmulas infantis

Nos casos em que o aleitamento materno está contraindicado ou quando a mulher opta por não amamentar, a fonte de nutrição do RN consiste numa fórmula infantil *standard*. Existem também outras fórmulas infantis com manipulação de vários constituintes (hidrolisadas, de soja, antirrefluxo, sem lactose, entre outras), que devem ser utilizadas com base em indicações médicas específicas (Costa et al., 2021).

A composição das fórmulas infantis tem como objetivo ser o mais semelhante possível à fonte nutritiva de eleição, o leite materno. A sua base é constituída por uma de duas fontes proteicas possíveis: proteína do leite de vaca e proteína de soja. A grande maioria das fórmulas tem por base a proteína do leite de vaca, sendo que a indústria alimentar tem vindo a tentar aprimorar a composição de macronutrientes, bem como adicionar nutrientes funcionais presentes no leite materno e que se encontram ausentes ou em quantidade reduzida no leite de vaca (Martin et al., 2016).

Em termos de macronutrientes (proteínas, hidratos de carbono e lípidos), existem diferenças entre o leite materno e a fórmula infantil. O leite materno apresenta um rácio de seroproteína relativo a caseína de 90:10 no colostro e de 55:45 no leite maduro, enquanto o leite de vaca contém um rácio de seroproteína:caseína de 40:60. Este facto levou a que se alterasse o rácio nas fórmulas infantis. Para além disso, o leite de vaca apresenta uma baixa concentração de aminoácidos essenciais como o triptofano, sendo necessária a adição de α -lactalbumina, seroproteína rica em triptofano. Relativamente a lípidos, o leite materno contém os ácidos palmítico, oleico, linoleico e linolénico, enquanto nas fórmulas infantis são adicionados óleos vegetais com o objetivo de aproximar os rácios de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados aos do leite materno (Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável, 2019).

Quando a micronutrientes, estão presentes nas fórmulas infantis vitaminas A, D, E, K, C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, ferro, cálcio, fósforo, magnésio, zinco, cobre, selénio, iodo e manganésio (Koletzko et al., 2005).

Existem outras substâncias adicionadas às fórmulas infantis com o propósito de melhorar as suas características, como os nucleótidos, os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LC-PUFAs), os HMOs, bem como pré-, pró- e simbióticos.

Os **nucleótidos** (adenina, guanina, citosina, tiamina e uridina) estão presentes no leite humano, mas apenas em **quantidades residuais no leite de vaca**. São adicionados em algumas fórmulas infantis pelo seu **efeito benéfico no sistema imunitário e nas fases de crescimento acelerado**. Contudo, há escassez de evidência acerca do seu mecanismo de **ação e dos benefícios clínicos** (Costa et al., 2021).

Os **LC-PUFAs**, nomeadamente o ácido araquidónico e o ácido docosahexaenóico, representam 0,47% e 0,32% do total de ácidos gordos do leite materno, mas estão praticamente ausentes no leite de vaca. Algumas fórmulas infantis são suplementadas com LC-PUFAs devido a **efeitos benéficos no desenvolvimento neuronal, imunitário e oftalmológico** (Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável, 2019).

Os **prebióticos** são substâncias que são seletivamente usadas pelos microrganismos do hospedeiro conferindo benefícios em termos de saúde. Os **probióticos** são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para o hospedeiro. Os **simbióticos** são uma combinação de probióticos e prebióticos. **A adição destes componentes às fórmulas infantis tem como objetivo reproduzir efeitos benéficos semelhantes aos do leite materno na composição da microbiota intestinal e, por sua vez, no sistema imune.**

4.2 Fórmulas com prebióticos

Os prebióticos são usados nas fórmulas infantis com o objetivo de estimular o estabelecimento e manutenção de uma microbiota saudável, semelhante à dos RN amamentados. Os mais usados e estudados são **galactooligosacáridos (GOS), polidextrose, fructooligosacáridos (FOS), 2'-fucosilactose (2'-FL), lacto-N-neo-tetraose (LNnT), inulina, oligofrutose e galactofrutose.**

Ao contrário do leite materno, o leite de vaca não contém oligossacáridos com função prebiótica naturalmente presentes, sendo estes adicionados às fórmulas infantis para estimular o crescimento de *Bifidobacteria* e *Lactobacilli*.

Diferentes tipos de prebióticos atuam de forma diferente na estimulação do crescimento bacteriano, por exemplo, a maltodextrina e polidextrose foram associados a um crescimento reduzido de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em comparação com GOS e lactulose (Vandenplas et al., 2015). Ensaios clínicos aleatorizados que avaliaram GOS e FOS bem como fórmulas apenas com GOS mostraram um efeito estimulador seletivo para *Bifidobacterium* e/ou *Lactobacilli*, assemelhando-se ao efeito do leite materno (Fabiano et al., 2021). Um estudo que analisou o impacto de fórmula infantil suplementada com oligossacáridos do tipo inulina demonstrou uma menor duração de infecções e uma maior quantidade de *Bifidobacterium* no grupo alimentado com fórmula enriquecida em comparação com o grupo alimentado por fórmula tradicional (Neumer et al., 2021).

Recentemente foram adicionados dois HMOs às fórmulas infantis, 2'-FL e LNnT. Um estudo demonstrou que em lactentes alimentados com fórmula suplementada com 2'-FL e LNnT a flora intestinal era idêntica à flora de RN amamentados, nomeadamente em termos da quantidade de *Bifidobacterium*. Para além disso, a concentração fecal de propionato, butirato e lactato em RN suplementados com estes HMOs aproximava-se da concentração fecal destes metabolitos em RN amamentados (Wiciński et al., 2020). De acordo com dados existentes, as fórmulas infantis enriquecidas com 2'-FL e LNnT são consideradas seguras. Contudo, o número de ensaios clínicos acerca destas fórmulas é limitado, pelo que não se encontra bem estudado o seu impacto na saúde do RN e lactente.

Devido ao número limitado e à heterogeneidade dos estudos realizados, não se podem tirar conclusões robustas acerca das fórmulas com prebióticos, pelo que estas não devem ser por rotina recomendadas. Reconhecem-se alguns dos potenciais benefícios dos prebióticos – vários estudos associaram-nos a uma modulação favorável do microbioma e atividade metabólica, promovendo um desenvolvimento da microbiota intestinal semelhante à dos RN amamentados. Contudo, o seu impacto não é totalmente conhecido, sendo necessários mais estudos para avaliar a especificidade, segurança, dosagem e combinações de prebióticos. Conhecendo alguns dos seus benefícios a nível do aumento de bifidobactérias, diminuição do pH fecal, fezes mais moles e aumento da frequência de dejeções, as fórmulas com prebióticos podem ser consideradas ao invés

das fórmulas tradicionais em RN não amamentados selecionados, como os que apresentam obstipação (Fabiano et al., 2021).

4.3 Fórmulas com probióticos

Os probióticos são identificados pela sua estirpe específica, sendo os gêneros mais utilizados *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia* e *Bacillus*.

As fórmulas infantis suplementadas com probióticos têm o objetivo de modular a atividade da microbiota intestinal modificando o seu equilíbrio. Segundo a Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (ESPGHAN), não existem preocupações acerca do impacto destas fórmulas no crescimento infantil. No entanto, foram reportados alguns casos de sépsis por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em crianças que recebiam probióticos, o que levanta questões acerca da funcionalidade e estabilidade dos probióticos. Para além disso, há estudos insuficientes relativamente ao desenvolvimento da microbiota intestinal em RN alimentados por fórmulas suplementadas com probióticos (Fabiano et al., 2021). Os dados existentes acerca de benefício clínico são específicos para determinadas doenças, nomeadamente enterocolite necrotizante em RN pré-termo (Salminen et al., 2020).

Um dos problemas relativos aos probióticos consiste no momento da sua introdução, muitas vezes logo no período neonatal – a adição de um fator externo numa fase em que a microbiota se está a desenvolver pode influenciar e afetar permanentemente o desenvolvimento do ecossistema. A duração da administração também é outra preocupação, uma vez que a administração por períodos prolongados não foi suficientemente estudada (Fabiano et al., 2021).

4.4 Fórmulas com simbióticos

Existe um efeito sinérgico na combinação de prebióticos e probióticos, sendo que se demonstrou benefício em combinar prebióticos como GOS e FOS com *Bifidobacterium breve* M-16V: menor quantidade de bactérias patogénicas como *Clostridium*, menor pH fecal e alterações no padrão de SCFA (maior quantidade de acetato e menor de ácido butírico, isobutírico e isovalérico). Contudo, são necessários mais estudos para avaliar o

impacto fisiológico e metabólico dos simbióticos no organismo humano (Salminen et al., 2020).

4.5 Fórmulas com posbióticos

Os **posbióticos** são **preparados de microrganismos não viáveis e/ou seus componentes que conferem benefícios em termos de saúde para o hospedeiro**. Incluem supernatantes, exopolissacáridos, enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase e NADH-oxidase, fragmentos da parede celular, SCFA, lisados bacterianos e produtos de fermentação como péptidos e galacto-oligossacáridos 3'-GL e 6'-GL (Salminen et al., 2020).

Os posbióticos podem atuar a nível da microbiota e epitélio intestinal, sistema imune, metabolismo e sistema nervoso. Apesar de o efeito poder ser temporário, moléculas como ácido láctico e bacteriocinas podem ter atividade antimicrobiana direta. Também podem competir com os microrganismos residentes para adesão na presença de fímbrias ou lectinas. Para além disso, os SCFA podem influenciar a função de barreira do intestino (Fabiano et al., 2021).

Foi demonstrado que posbióticos derivados de fermentação podem ter efeitos benéficos na microbiota intestinal, vias metabólicas e resposta imunológica. Um estudo mostrou que uma **fórmula infantil fermentada por *Bifidobacterium breve* C50 e *Streptococcus thermophilus* 065, em comparação com fórmula tradicional, estava associada a menor consistência das fezes, menor pH fecal, aumento dos níveis de ácido acético e sIgA, aumento de bifidobactérias e diminuição de *Clostridium difficile*** (Béghin et al., 2021).

O uso de posbióticos parece ter benefício em RN de termo saudáveis no desenvolvimento da microbiota ou imunomodulação. Contudo, a segurança e a adequação de posbióticos específicos nas fórmulas infantis ainda não estão esclarecidas. Para além disso, devem ser realizados estudos para estabelecer a dose recomendada e os seus efeitos no organismo.

5. Aleitamento materno vs suplementação – impacto na microbiota do recém-nascido

A alimentação é um dos fatores com maior impacto na formação da microbiota neonatal. Pensa-se que o estabelecimento e desenvolvimento da microbiota do RN é modulado por componentes específicos do leite materno com propriedades pró- e antimicrobianas. Foi demonstrado que certos genomas de bactérias comensais do intestino, em particular bifidobactérias, são geneticamente adaptados para utilizar glicanos específicos do leite materno, o que representa um exemplo de co-evolução microrganismo-hospedeiro (Milani et al., 2017).

A microbiota dos RN amamentados apresenta uma menor diversidade do que a de RN alimentados por fórmulas (Ho et al., 2018). A análise transcriptômica de células epiteliais intestinais mostrou que o tipo de alimentação tem implicações nos genes expressos, na medida em que os RN amamentados apresentam uma maior transcrição de genes associados a atividades metabólicas e imunológicas. Os RN alimentados por fórmula estão expostos a diferentes hidratos de carbono, bactérias e nutrientes, provocando um padrão de colonização do intestino distinto (Milani et al., 2017).

Aceita-se que a dominância de *Bifidobacterium spp* no microbioma intestinal é a chave para o desenvolvimento de uma microbiota saudável (Wong et al., 2022). O aleitamento materno, em comparação com a alimentação por fórmulas, promove uma maior abundância de *Bifidobacterium spp* (Mancabelli et al., 2020). Enquanto a microbiota dos RN amamentados é representada por 90% de bifidobactérias e lactobacilos, a microbiota dos RN alimentados por fórmulas sem HMOs adicionados é composta por 40-60% de bifidobactérias e lactobacilos, e o restante consiste em *Enterobacteriaceae* e *Bacterioides*. Para além disso, os RN alimentados por fórmula mantêm anaeróbios facultativos (*Enterobacteriaceae*) por mais tempo (Gopalakrishna & Hand, 2020).

Os RN alimentados por fórmulas apresentam uma microbiota mais diversa, com maiores níveis de anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos, semelhante à de crianças mais velhas (van den Elsen et al., 2019), com domínio de *Staphylococcus*, *Bacterioides*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* e *Atopobium*. Parece, assim, que os RN alimentados por fórmula evoluem mais cedo para uma microbiota semelhante à do

adulto. Mesmo pequenas quantidades de suplementação nos primeiros dias de vida em RN amamentados resultam em alterações da microbiota (Brahm & Valdés, 2017).

Em relação a metabolitos, nomeadamente SCFAs, os RN alimentados por fórmulas apresentam maior quantidade de propionato e butirato, enquanto os RN amamentados apresentam menores concentrações absolutas de SCFAs fecais, devido a terem uma microbiota menos diversa (van den Elsen et al., 2019). Contudo, a proporção de acetato é maior nos RN amamentados exclusivamente, o que poderá ser devido à ausência de HMOs nas fórmulas infantis tradicionais (van den Elsen et al., 2019).

A microbiota intestinal nos RN alimentados por fórmula difere conforme o tipo de suplementação utilizado, nomeadamente fórmula tradicional ou fórmula com prebióticos e/ou probióticos adicionados. **Fórmulas suplementadas com os prebióticos GOS e FOS podem influenciar a presença de mais bifidobactérias nos RN alimentados por fórmulas** – o nível de bifidobactérias nos RN amamentados e nos RN alimentados por fórmulas com prebióticos é semelhante, enquanto nos RN alimentados por fórmula tradicional é inferior. Para além disso, **as espécies de bifidobactérias são semelhantes entre RN amamentados e RN alimentados com fórmula com prebióticos. Pelo contrário, RN com fórmula tradicional apresentam espécies diferentes de bifidobactérias, com maior abundância de *B. cantenulatum* e *B. adolescentis*, que habitualmente estão presentes em maior quantidade nos adultos** (Voreades et al., 2014).

Relativamente a **fórmulas com probióticos**, foi demonstrado que a **suplementação com estirpes de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* tem um impacto positivo na microbiota do RN. A suplementação com *B. bifidum* e *L. acidophilus* em RN pré-termo permitiu um aumento da população de bifidobactérias para valores semelhantes aos de RN de termo** (Alcon-Giner et al., 2020). Para além disso, **a suplementação com probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Bifidobacterium lactis* reduz o risco de enterocolite necrotizante, sépsis e mortalidade por várias causas em RN pré-termo** (Dermyshe et al., 2017). Outro estudo mostrou que a **suplementação com *Bifidobacterium breve* Bb12 em RN com muito baixo peso à nascença resulta em colonização intestinal por bifidobactérias e crescimento de *Lactobacillus* em comparação com RN que não receberam suplemento probiótico** (Bertelsen et al., 2016). Outro estudo avaliou a

administração de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 em RN; não foram observadas diferenças no número de bifidobactérias e lactobacilos entre o grupo de estudo e o grupo de controlo, mas foi demonstrada uma diminuição de bacilos anaeróbios Gram negativos no grupo tratado com probióticos, o que aparenta ser benéfico na prevenção de enterocolite necrotizante (Savino et al., 2015).

Por fim, outro estudo avaliou o impacto do uso de fórmula infantil suplementada com simbióticos, LC-PUFAs e membrana do glóbulo de gordura do leite (MFGM) na formação da microbiota. Demonstrou-se uma maior diversidade de espécies bacterianas nos grupos alimentados por fórmula tradicional e pela fórmula do estudo em comparação com o grupo amamentado. A abundância de bifidobactérias foi superior nos RN amamentados; entre o grupo fórmula tradicional e o grupo da fórmula de estudo, o número de bifidobactérias foi semelhante, mas a fórmula do estudo conseguiu uma abundância relativa mais prolongada de *B. breve*, *B. longum* e *B. pseudocatenulatum* até aos 6 meses de idade. Para além disso, a evolução da microbiota ao longo do tempo foi semelhante entre o grupo da fórmula de estudo e o grupo amamentado. Assim, a combinação de simbióticos, LC-PUFA e MFGM demonstrou um efeito bifidogénico e lactogénico, induzindo uma maturação da microbiota semelhante à de RN amamentados (Cerdó et al., 2022).

6. Conclusão

O leite materno consiste na fonte nutritiva de eleição do RN, apresentando o equilíbrio ideal de macro- e micronutrientes e componentes bioativos. A presença de HMOs no leite materno permite o estabelecimento de uma microbiota benéfica, rica em bifidobactérias e lactobacilos, o que por sua vez tem impacto ao longo da vida no estabelecimento de diversas patologias do foro autoimune, alérgico e inflamatório. Para além disso, o leite materno possui outros componentes cuja importância no desenvolvimento da microbiota tem vindo a ser esclarecida, como a microbiota do leite materno, proteínas e péptidos antimicrobianos, membrana do glóbulo de gordura do leite, hormonas, entre outros.

Ao longo dos anos, a indústria tem vindo a tentar melhorar a composição das fórmulas infantis para que se aproximem ao máximo do leite materno. Contudo, para já o leite materno e as fórmulas continuam a apresentar diferenças, o que tem impacto na microbiota – os RN alimentados por fórmula infantil apresentam menor abundância de bifidobactérias e uma maior diversidade bacteriana, com uma transição precoce para uma microbiota semelhante à do adulto.

Têm sido desenvolvidas fórmulas infantis suplementadas com prebióticos e/ou probióticos, com o objetivo de estimular a formação de uma microbiota semelhante à de RN amamentados. Alguns estudos demonstraram uma maior aproximação à microbiota de RN amamentados em termos de abundância de bifidobactérias e lactobacilos. Contudo, a evidência científica é limitada, nomeadamente acerca da sua eficácia, dosagem, período adequado de administração e segurança.

Assim, o aleitamento materno permanece como primeira opção de nutrição para o RN. Nos casos em que se opta ou é necessária suplementação, a fórmula infantil tradicional é a escolhida, sendo necessária uma maior investigação acerca de componentes bioativos como prebióticos e/ou probióticos e do seu impacto no organismo humano para que a sua utilização possa ser expandida.

Agradecimentos

À Dra. Maria da Graça Oliveira por ter aceitado orientar este Trabalho Final de Mestrado, pela sua paciência, apoio, conselhos e, principalmente, disponibilidade.

À Patrícia, Cláudia, Rita e Madalena pelo apoio constante e incentivo para dar sempre o meu melhor e não perder o foco.

À minha família pela paciência, apoio incondicional e motivação para alcançar os meus objetivos e nunca desistir.

Referências bibliográficas

- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 76, Issue 3, pp. 473–493). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Alcon-Giner, C., Dalby, M. J., Caim, S., Ketskemety, J., Shaw, A., Sim, K., Lawson, M. A. E., Kiu, R., Leclaire, C., Chalklen, L., Kujawska, M., Mitra, S., Fardus-Reid, F., Belteki, G., McColl, K., Swann, J. R., Kroll, J. S., Clarke, P., & Hall, L. J. (2020). Microbiota Supplementation with Bifidobacterium and Lactobacillus Modifies the Preterm Infant Gut Microbiota and Metabolome: An Observational Study. *Cell Reports Medicine*, 1(5). <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100077>
- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. In *Early Human Development* (Vol. 91, Issue 11, pp. 629–635). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Béghin, L., Tims, S., Roelofs, M., Rougé, C., Oozeer, R., Rakza, T., Chirico, G., Roeselers, G., Knol, J., Rozé, J. C., & Turck, D. (2021). Fermented infant formula (with Bifidobacterium breve C50 and Streptococcus thermophilus O65) with prebiotic oligosaccharides is safe and modulates the gut microbiota towards a microbiota closer to that of breastfed infants. *Clinical Nutrition*, 40(3), 778–787. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.07.024>
- Bertelsen, R. J., Jensen, E. T., & Ringel-Kulka, T. (2016). Use of probiotics and prebiotics in infant feeding. In *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* (Vol. 30, Issue 1, pp. 39–48). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.01.001>
- Boudry, G., Charton, E., le Huerou-Luron, I., Ferret-Bernard, S., le Gall, S., Even, S., & Blat, S. (2021). The Relationship Between Breast Milk Components and the Infant Gut Microbiota. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.629740>

- Brahm, P., & Valdés, V. (2017). Benefits of breastfeeding and risks associated with not breastfeeding. *Revista Chilena de Pediatría*, 88(1), 15–21. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062017000100001>
- Brink, L. R., & Lönnerdal, B. (2020). Milk fat globule membrane: the role of its various components in infant health and development. In *Journal of Nutritional Biochemistry* (Vol. 85). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108465>
- Brink, L. R., Mercer, K. E., Piccolo, B. D., Chintapalli, S. v., Elolimy, A., Bowlin, A. K., Matazel, K. S., Pack, L., Adams, S. H., Shankar, K., Badger, T. M., Andres, A., & Yeruva, L. (2020). Neonatal diet alters fecal microbiota and metabolome profiles at different ages in infants fed breast milk or formula. *American Journal of Clinical Nutrition*, 111(6), 1190–1202. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa076>
- Cerdó, T., Diéguez, E., & Campoy, C. (2019). Early nutrition and gut microbiome: interrelationship between bacterial metabolism, immune system, brain structure, and neurodevelopment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 317, 617–630. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00188.2019>
- Cerdó, T., Ruíz, A., Acuña, I., Nieto-Ruiz, A., Diéguez, E., Sepúlveda-Valbuena, N., Escudero-Marín, M., García-Santos, J. A., García-Ricobaraza, M., Herrmann, F., Moreno-Muñoz, J. A., de Castellar, R., Jiménez, J., Suárez, A., & Campoy, C. (2022). A synbiotics, long chain polyunsaturated fatty acids, and milk fat globule membranes supplemented formula modulates microbiota maturation and neurodevelopment. *Clinical Nutrition*, 41(8), 1697–1711. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.05.013>
- Chong, C. Y. L., Bloomfield, F. H., & O’Sullivan, J. M. (2018). Factors affecting gastrointestinal microbiome development in neonates. In *Nutrients* (Vol. 10, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu10030274>
- Costa, C., Mascarenhas-Melo, F., & Bell, V. (2021). Fórmulas Infantis: indicação, função e constituição. *Acta Portuguesa de Nutrição*, 27. <https://doi.org/10.21011/apn.2021.2704>

- Dermyshe, E., Wang, Y., Yan, C., Hong, W., Qiu, G., Gong, X., & Zhang, T. (2017). The “golden Age” of Probiotics: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized and Observational Studies in Preterm Infants. In *Neonatology* (Vol. 112, Issue 1, pp. 9–23). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000454668>
- Doare, K. le, Holder, B., Bassett, A., & Pannaraj, P. S. (2018). Mother’s Milk: A purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00361>
- Dominguez-Bello, M. G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R., & Blaser, M. J. (2019). Role of the microbiome in human development. *Gut*, 68(6), 1108–1114. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317503>
- Fabiano, V., Indrio, F., Verduci, E., Calcaterra, V., Pop, T. L., Mari, A., Zuccotti, G. V., Cokugras, F. C., Pettoello-Mantovani, M., & Goulet, O. (2021). Term infant formulas influencing gut microbiota: An overview. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu13124200>
- Gomes, A. P. P. (2017). *A microbiota intestinal e os desenvolvimentos recentes sobre o seu impacto na saúde e na doença* [Trabalho Final de Mestrado Integrado , Universidade de Lisboa]. <http://hdl.handle.net/10451/36100>
- Gopalakrishna, K. P., & Hand, T. W. (2020). Influence of maternal milk on the neonatal intestinal microbiome. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12030823>
- Heiss, C. N., & Olofsson, L. E. (2019). The role of the gut microbiota in development, function and disorders of the central nervous system and the enteric nervous system. In *Journal of Neuroendocrinology* (Vol. 31, Issue 5). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jne.12684>
- Ho, N. T., Li, F., Lee-Sarwar, K. A., Tun, H. M., Brown, B. P., Pannaraj, P. S., Bender, J. M., Azad, M. B., Thompson, A. L., Weiss, S. T., Azcarate-Peril, M. A., Litonjua, A. A., Kozyrskyj, A. L., Jaspán, H. B., Aldrovandi, G. M., & Kuhn, L. (2018). Meta-analysis

of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06473-x>

Kalbermatter, C., Fernandez Trigo, N., Christensen, S., & Ganai-Vonarburg, S. C. (2021). Maternal Microbiota, Early Life Colonization and Breast Milk Drive Immune Development in the Newborn. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683022>

Koletzko, B., Baker, S., Cleghorn, G., Fagundes Neto, U., Gopalan, S., Hernell, O., Seng Hock, Q., Jirapinyo, P., Lonnerdal, B., Pencharz, P., Pzyrembel, H., Jaime Ramirez-Mayans, J., Shamir, R., Turck, D., Yamashiro, Y., Zong-Yi, D., & Williams, L. (2005). Medical Position Paper Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 41(No. 5), 584–599.

Korpela, K., Blakstad, E. W., Moltu, S. J., Strømmen, K., Nakstad, B., Rønnestad, A. E., Brække, K., Iversen, P. O., Drevon, C. A., & de Vos, W. (2018). Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20827-x>

Lyons, K. E., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Ross, R. P., & Stanton, C. (2020). Breast milk, a source of beneficial microbes and associated benefits for infant health. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12041039>

Mancabelli, L., Tarracchini, C., Milani, C., Lugli, G. A., Fontana, F., Turrone, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2020). Multi-population cohort meta-analysis of human intestinal microbiota in early life reveals the existence of infant community state types (ICSTs). *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 2480–2493. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.028>

Martin, C. R., Ling, P. R., & Blackburn, G. L. (2016). Review of infant feeding: Key features of breast milk and infant formula. In *Nutrients* (Vol. 8, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu8050279>

Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Montes, S. A., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de

- Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). *The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota*. <https://doi.org/10.1128/MMBR>
- Morais, J., Marques, C., Faria, A., Teixeira, D., Barreiros-Mota, I., Durão, C., Araújo, J., Ismael, S., Brito, S., Cardoso, M., Macedo, I., Pereira, E., Tomé, T., & Calhau, C. (2021). Influence of human milk on very preterms' gut microbiota and alkaline phosphatase activity. *Nutrients*, *13*(5). <https://doi.org/10.3390/nu13051564>
- Neumer, F., Urraca, O., Alonso, J., Palencia, J., Varea, V., Theis, S., Rodriguez-palmero, M., Moreno-muñoz, J. A., Guarner, F., Veereman, G., Vandenplas, Y., & Campoy, C. (2021). Long-term safety and efficacy of prebiotic enriched infant formula—a randomized controlled trial. *Nutrients*, *13*(4). <https://doi.org/10.3390/nu13041276>
- Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Martín, R., Rodríguez, J. M., & Xaus, J. (2006). Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(1), 72–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x>
- Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. (2019). *Alimentação saudável dos 0 aos 6 anos - linhas de orientação para profissionais e educadores*.
- Rueda, R., Sabatel, J. L., Maldonado, J., Molina-Font, J. A., & Gil, A. (1998). *Addition of gangliosides to an adapted milk formula modifies levels of fecal Escherichia coli in preterm newborn infants*. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(98\)70184-2](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(98)70184-2)
- Salminen, S., Stahl, B., Vinderola, G., & Szajewska, H. (2020). Infant formula supplemented with biotics: Current knowledge and future perspectives. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 7, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12071952>
- Savino, F., Fornasero, S., Ceratto, S., de Marco, A., Mandras, N., Roana, J., Tullio, V., & Amisano, G. (2015). Probiotics and gut health in infants: A preliminary case–control observational study about early treatment with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *Clinica Chimica Acta*, *451*, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.02.027>

- Thum, C., Young, W., Montoya, C. A., Roy, N. C., & McNabb, W. C. (2020). In vitro Fermentation of Digested Milk Fat Globule Membrane From Ruminant Milk Modulates Piglet Ileal and Caecal Microbiota. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00091>
- van den Elsen, L. W. J., Garssen, J., Burcelin, R., & Verhasselt, V. (2019). Shaping the gut microbiota by breastfeeding: The gateway to allergy prevention? In *Frontiers in Pediatrics* (Vol. 7, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00047>
- Vandenplas, Y., Berger, B., Carnielli, V. P., Ksiazek, J., Lagström, H., Luna, M. S., Migacheva, N., Mosselmans, J. M., Picaud, J. C., Possner, M., Singhal, A., & Wabitsch, M. (2018). Human milk oligosaccharides: 2'-fucosyllactose (2'-FL) and lacto-n-neotetraose (LNnT) in infant formula. In *Nutrients* (Vol. 10, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu10091161>
- Vandenplas, Y., de Greef, E., & Veereman, G. (2015). Prebiotics in infant formula. In *Gut Microbes* (Vol. 5, Issue 6, pp. 681–687). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.972237>
- Voreades, N., Kozil, A., & Weir, T. L. (2014). Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 5(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00494>
- Walsh, C., Lane, J. A., van Sinderen, D., & Hickey, R. M. (2020). Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health. *Journal of Functional Foods*, 72. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104074>
- Wiciński, M., Sawicka, E., Gębalski, J., Kubiak, K., & Malinowski, B. (2020). Human milk oligosaccharides: Health benefits, potential applications in infant formulas, and pharmacology. *Nutrients*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/nu12010266>
- Willers, M., Ulas, T., Völlger, L., Vogl, T., Heinemann, A. S., Pirr, S., Pagel, J., Fehlhaber, B., Halle, O., Schöning, J., Schreek, S., Löber, U., Essex, M., Hombach, P., Graspeuntner, S., Basic, M., Bleich, A., Cloppenburg-Schmidt, K., Künzel, S., ... Viemann, D. (2020). S100A8 and S100A9 Are Important for Postnatal Development

of Gut Microbiota and Immune System in Mice and Infants. *Gastroenterology*, 159(6), 2130-2145.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.08.019>

Wong, E., Lui, K., Day, A. S., & Leach, S. T. (2022). Manipulating the neonatal gut microbiome: current understanding and future perspectives. In *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* (Vol. 107, Issue 4, pp. 346–350). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1136/archdischild-2021-321922>

Zheng, J., Zhang, L., Gao, Y., Wu, H., & Zhang, J. (2022). The dynamic effects of maternal high-calorie diet on glycolipid metabolism and gut microbiota from weaning to adulthood in offspring mice. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.941969>