

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Medicina
Departamento de Medicina Social
Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia



Tese de Doutorado

**Avaliação do papel de fatores genéticos e alimentares
no microbioma intestinal humano na adolescência**

Etiene Dias Alves

Pelotas, 2025

Etiene Dias Alves

Avaliação do papel de fatores genéticos e alimentares no microbioma intestinal humano na adolescência

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Epidemiologista.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Tovo-Rodrigues

Coorientadores: Dr^ª. Maria Carolina Borges

Dr^ª. Marina Xavier Carpena

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

A472a Alves, Etiene Dias

Avaliação do papel de fatores genéticos e alimentares no microbioma intestinal humano na adolescência [recurso eletrônico] / Etiene Dias Alves ; Luciana Tovo-Rodrigues, orientadora ; Maria Carolina Borges, Marina Xavier Carpena, coorientadoras. — Pelotas, 2025.

412 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Epidemiologia. 2. Alimentos ultraprocessados. 3. Microbioma intestinal. 4. Amamentação. 5. Genética. I. Tovo-Rodrigues, Luciana, orient. II. Borges, Maria Carolina, coorient. III. Carpena, Marina Xavier, coorient. IV. Título.

CDD 614.4

Etiene Dias Alves

Avaliação do papel de fatores genéticos e alimentares no microbioma intestinal humano na adolescência

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Epidemiologia, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 25/06/2025

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Luciana Tovo-Rodrigues (Orientadora)

Doutor(a) em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof(a). Dr(a) Iná da Silva dos Santos (Examinador interno)

Doutor(a) em Ciências Médicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof(a). Dr(a) Janaína Vieira dos Santos Motta (Examinador interno)

Doutor(a) em Epidemiologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof(a). Dr(a) Andrea Kely Campos Ribeiro dos Santos (Examinador externo)

Doutor(a) em Genética pela Universidade de São Paulo

Agradecimentos

Agradeço à instituição Universidade Federal de Pelotas que foi mais do que um espaço de formação desde a graduação até a conclusão deste doutorado, e proporcionou construir minha trajetória acadêmica. Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia (PPGEpi) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo suporte e recursos que tornaram viáveis a realização deste trabalho.

Agradeço às professoras que formarão esta banca, Iná, Janaína e Andrea, que aceitaram o convite para revisar este trabalho. Tenho uma grande admiração por vocês!

Agradeço imensamente à minha orientadora, Luciana, por toda a paciência, determinação e sabedoria na condução e construção deste trabalho. Às minhas coorientadoras, Marina e Carolina, agradeço pela confiança e pelo incentivo constantes que recebi ao longo desses quatro anos. O apoio de vocês foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho que nos desafiou de diversas maneiras, vocês caminharam ao meu lado em cada desafio. Sou imensamente grata pela disponibilidade em ensinar, vocês são exemplos de excelência como mulheres e pesquisadoras!

Além disso, agradeço especialmente os co-autores dos artigos da tese, que dedicaram seu tempo para revisar e contribuir com boas críticas e conselhos, tornando este trabalho ainda mais completo.

À minha família, base de tudo, agradeço pelo amor, pelas palavras de encorajamento, pelo suporte e compreensão em todos os momentos. Em especial ao meu companheiro, Jáder, agradeço pelo amor, suporte e apoio às minhas decisões. Tu me ajuda a manter as coisas sob controle, contigo estou

segura!

Agradeço às minhas amigas, Gabriela Fernandez e Gabriela Ferreira, Riceli, Karen, Jackeline e Karisa. Obrigada a cada uma de vocês pelas palavras de incentivo, pelo acolhimento nos momentos de dúvida e pela celebração das pequenas vitórias. É um baita privilégio poder contar com vocês na minha jornada!

Por fim, agradeço aos participantes das Coortes de Nascimentos de Pelotas, especialmente a Coorte de 2004, que confiam seu tempo e disposição para contribuírem com esta tese e divtantas outras pesquisas científicas.

Resumo

ALVES, Etiene Dias. **Avaliação do papel de fatores genéticos e alimentares no microbioma intestinal humano na adolescência**. Orientadora: Luciana Tovo-Rodrigues. Co-orientadoras: Maria Carolina Borges e Marina Xavier Carpena. 2025. 412f. Tese (Doutorado em Epidemiologia) – Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

O microbioma intestinal caracteriza-se como um ecossistema complexo de espécies de microrganismos que habitam o intestino e modulam a relação entre o hospedeiro e os processos de homeostase e doença. A formação da comunidade bacteriana intestinal sofre drásticas transformações durante o desenvolvimento do indivíduo e mudanças substanciais ocorrem desde o início da vida até o envelhecimento. Fatores genéticos influenciam neste processo, assim como fatores ambientais precoces e determinantes para a colonização de bactérias no intestino, como tipo de parto, aleitamento, alimentação, nível socioeconômico, atividade física, dentre outros. O objetivo principal do presente projeto consiste em investigar a associação entre fatores genéticos e alimentares, especificamente o consumo de ultraprocessados e o aleitamento materno, e parâmetros de composição e diversidade do microbioma intestinal em uma subamostra de participantes da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004 durante a adolescência. O primeiro artigo original da tese tem como objetivo investigar a relação entre o consumo longitudinal de alimentos ultraprocessados (AUP) e as características quantitativas do microbioma intestinal. Os resultados sugerem que o consumo de AUP aos 11 anos de idade esteve associado a uma redução de bactérias benéficas como *gênero Bacteroides* e aumento de *Peptostreptococcus* e *Actinobacteria*. O segundo artigo objetiva identificar regiões genômicas que influenciem as características quantitativas (abundância e diversidade bacteriana) relacionadas ao microbioma intestinal em humanos, encontramos uma variante do gene *SLC5A1* foi associada a menor abundância da bactéria *Oxalobacter*, um gênero potencialmente envolvido na regulação do metabolismo do oxalato. O terceiro artigo da tese buscou avaliar a associação entre padrão de amamentação aos 3 meses de idade (amamentados exclusivamente, amamentação mista e não amamentados) na diversidade e composição da microbiota intestinal dos participantes da subamostra. Não foram encontradas diferenças na diversidade alfa entre os padrões de amamentação investigados. Foram observadas associações modestas entre os padrões de amamentação e a composição da microbiota intestinal aos 12 anos de idade. A amamentação não exclusiva e a introdução precoce de líquidos ou alimentos semissólidos foram associadas a uma maior abundância ou presença de *Ruminococcus* e *Eubacterium*. No entanto, essas associações não permaneceram significativas após a correção para múltiplos testes, sugerindo efeitos limitados a longo prazo.

Palavras-chave: microbiota intestinal; alimentos ultraprocessados; genética; amamentação; coorte 2004.

Abstract

ALVES, Etienne Dias. **Evaluation of the role of genetic and dietary factors in the human intestinal microbiome in adolescence.** Doctoral Advisor: Luciana Tovo-Rodrigues. Co-advisors: Maria Carolina Borges and Marina Xavier Carpena. 2025. 412f. Thesis (Doctorate in Epidemiology) – Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2025.

The gut microbiome is characterized as a complex ecosystem of microorganism species that inhabit the intestine and modulate the relationship between the host and the processes of homeostasis and disease. The formation of the intestinal bacterial community undergoes drastic transformations during the development of the individual and substantial changes occur from early life to aging. Genetic factors influence this process, as well as early environmental factors that determine the colonization of bacteria in the intestine, such as type of delivery, breastfeeding, diet, socioeconomic level, physical activity, among others. The main objective of this project is to investigate the association between genetic and dietary factors, specifically the consumption of ultra-processed foods and breastfeeding, and parameters of composition and diversity of the intestinal microbiome in a subsample of participants from the 2004 Pelotas Birth Cohort. The first original article of the thesis aims to investigate the relationship between the longitudinal consumption of ultra-processed foods (UPF) and the quantitative characteristics of the intestinal microbiome. The results suggest that UPF consumption at 11 years of age was associated with a reduction in beneficial bacteria such as the *Bacteroides* genus and an increase in *Peptostreptococcus* and *Actinobacteria*. The second article aims to identify genomic regions that influence quantitative characteristics (bacterial abundance and diversity) related to the intestinal microbiome in humans. We found that a variant of the *SLC5A1* gene was associated with a lower abundance of the bacterium *Oxalobacter*, a genus potentially involved in the regulation of oxalate metabolism. The third article of the thesis sought to evaluate the association between breastfeeding practices (exclusively breastfed, mixed breastfeeding, and non-breastfed until three months of age) on the diversity and composition of the intestinal microbiota of the participants in the subsample. No differences in alpha diversity were found between the breastfeeding patterns investigated. Modest associations were observed between breastfeeding patterns and the composition of the intestinal microbiota at 12 years of age. Non-exclusive breastfeeding and early introduction of liquids or semi-solid foods were associated with a higher abundance or presence of *Ruminococcus* and *Eubacterium*. However, these associations did not remain significant after correction for multiple testing, suggesting limited long-term effects.

Keywords: gut microbiota; ultraprocessed food; genetics; breastfeeding; epidemiology; cohort 2004.

Sumário

Apresentação	9
Seção I. Projeto de pesquisa	10
Seção II. Modificações no projeto de pesquisa	157
Seção III. Relatório de Trabalho de Campo	160
Seção IV. Artigos resultantes da pesquisa	292
Artigo 1	293
Artigo 2	336
Artigo 3	405
Seção V. Nota para a imprensa	463

Apresentação

A presente tese de doutorado foi estruturada de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas. A qualificação do projeto ocorreu no dia 23 de setembro de 2022, a banca foi composta pelas Professoras Doutoras Iná da Silva Santos (Universidade Federal de Pelotas) e Andrea Kely Campos Ribeiro dos Santos (Universidade Federal do Pará). No presente volume da tese será apresentado, inicialmente, o projeto de pesquisa atualizado de acordo com a revisão da banca na qualificação (Seção I), seguido pela descrição das modificações realizadas após a qualificação (Seção II). Posteriormente, é apresentado o Relatório de Trabalho de Campo (Seção III), seguido da apresentação dos três artigos originais da tese (Seção IV). Por fim, apresentamos a nota para a imprensa (Seção V), que consiste na síntese dos principais achados da tese e elaborado para a divulgação à imprensa local e à comunidade não científica. O primeiro artigo, intitulado “Exploring the relationship between ultra-processed food consumption and gut microbiota at school age in a Brazilian birth cohort” está apresentado de acordo com a versão aprovada para publicação em 31 de março de 2025 no periódico *Cadernos de Saúde Pública*. Trata-se de um artigo original sobre a associação entre a composição da microbiota intestinal e o consumo de alimentos ultraprocessados. O segundo artigo, intitulado “Host genetics and gut microbiome associations: Implications for the Gut-Brain Axis in Brazilian adolescents from the 2004 Pelotas Birth Cohort” avaliou se os resultados do Genome-Wide Association Study (GWAS) de microbiota intestinal mais abrangente foram replicados em adolescentes de uma coorte de nascimentos de base populacional brasileira, submetido na revista *Human Genetics*. O terceiro artigo intitulado “Exploring the relationships between breastfeeding and gut microbiota in adolescence: Results from a Cohort Study in Southern Brazil” descreve a associação entre padrão de amamentação aos 3 meses de idade e composição da microbiota intestinal e parâmetros de diversidade aos 12 anos. Ele está formatado de acordo com as normas da revista *Clinical Nutrition*, jornal escolhido para a submissão.

SEÇÃO I. PROJETO DE PESQUISA

Projeto de pesquisa apresentado em 01 de Setembro de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Medicina
Departamento de Medicina Social
Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia



Projeto de Tese

**Avaliação do papel de fatores genéticos e consumo de
alimentos ultraprocessados no microbioma intestinal
humano na adolescência**

Etiene Dias Alves

Pelotas, 2022

Etiene Dias Alves

Avaliação do papel de fatores genéticos e consumo de alimentos ultraprocessados na composição e na diversidade do microbioma intestinal humano durante a adolescência

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Epidemiologista.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Luciana Tovo-Rodrigues

Coorientadores: Dr^a. Maria Carolina Borges
Dr^a. Marina Xavier Carpena

Pelotas, 2022

Sumário

Artigos planejados para a tese.....	15
Definição de termos e abreviaturas.....	16
Lista de figuras.....	17
Lista de tabelas.....	18
Lista de quadros.....	19
INTRODUÇÃO.....	20
MARCO TEÓRICO.....	22
Definição e características do microbioma intestinal humano.....	22
Tecnologias de sequenciamento do microbioma.....	26
Composição do microbioma intestinal da gestação à adolescência.....	27
Determinantes do microbioma intestinal.....	28
Fatores precoces e determinantes da microbiota.....	28
Alimentação e relação com microbioma.....	35
Relação entre microbioma e saúde na adolescência.....	37
REVISÃO DA LITERATURA.....	39
Aspectos genéticos do hospedeiro e microbioma intestinal.....	39
Síntese dos achados.....	41
Consumo de ultraprocessados e microbioma intestinal.....	67
Síntese dos achados.....	68
JUSTIFICATIVA.....	83
OBJETIVOS.....	85
HIPÓTESES.....	85
METODOLOGIA.....	86
Metodologia artigo 1.....	86
Estratégia de busca.....	86
Seleção dos estudos.....	87
Registro da revisão sistemática.....	87
Metodologia artigo 2.....	88
Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas.....	88
Seleção de subamostra.....	89
Logística.....	91
Análise dos dados.....	91

Metodologia do artigo 3.....	96
Delineamento.....	96
Critérios de elegibilidade para o atual estudo.....	96
Instrumentos de coleta de dados.....	96
Análise dos dados.....	97
ASPECTOS ÉTICOS.....	102
ORÇAMENTO/FINANCIAMENTO.....	102
CRONOGRAMA.....	103
DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS.....	103
REFERÊNCIAS.....	104
ANEXOS.....	121

Resumo

O microbioma intestinal caracteriza-se como um ecossistema complexo de espécies de microrganismos que habitam o intestino e modulam a relação entre o hospedeiro e os processos de homeostase e doença. A formação da comunidade bacteriana intestinal sofre drásticas transformações durante o desenvolvimento do indivíduo e mudanças substanciais ocorrem desde o início da vida até o envelhecimento. Fatores genéticos influenciam neste processo, assim como fatores ambientais precoces e determinantes para a colonização de bactérias no intestino, como tipo de parto, aleitamento, alimentação, nível socioeconômico, atividade física, dentre outros. O objetivo principal do presente projeto consiste em investigar a associação entre fatores genéticos e alimentares, especificamente o consumo de ultraprocessados, e parâmetros de composição e diversidade do microbioma intestinal em uma subamostra de participantes da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004. O primeiro artigo proposto para a tese irá revisar a literatura com intuito de identificar e descrever os trabalhos publicados acerca da relação entre aspectos genéticos do hospedeiro e o microbioma intestinal. O segundo artigo terá o objetivo de identificar regiões genômicas que influenciem as características quantitativas (abundância e diversidade bacteriana) relacionadas ao microbioma intestinal em humanos. O terceiro artigo proposto para esta tese terá como objetivo investigar a relação entre o consumo longitudinal de alimentos ultraprocessados e as características quantitativas do microbioma intestinal.

Artigos planejados para a tese

Artigo 1 (revisão) – Aspectos genéticos do hospedeiro associados ao microbioma intestinal: uma revisão sistemática

Artigo 2 (original) – O papel de aspectos genéticos do hospedeiro na composição do microbioma intestinal na adolescência em participantes da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004

Artigo 3 (original) – Consumo de alimentos ultraprocessados e sua relação com o microbioma intestinal: análise longitudinal aos 6, 11 e 12 anos em uma subamostra da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004.

Definição de termos e abreviaturas

AGCC - ácidos graxos de

cadeia curta AUP -

Alimentos ultraprocessados

DMC - Dor musculoesquelética crônica generalizada

ERP ou PRS - escore de risco poligênico (em inglês, *polygenic risk score*) GWAS – *Genome-wide association study* ou estudo de associação genômica ampla

IMC - índice de massa corporal

NSE - nível socioeconômico

SNP - *Single nucleotide polymorphism* ou polimorfismo de nucleotídeo único PCA - componentes principais

QFA - questionário de

frequência alimentar RM -

Randomização mendeliana

TGI - trato gastrointestinal

Lista de figuras

Figura 1: Classificação taxonômica bacteriana conforme o National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy Database	13
Figura 2. Modelo teórico para relação entre aspectos determinantes e o microbioma intestinal	20
Figura 3. Fluxograma da seleção de artigos para revisão sistemática	30
Figura 4. Fluxograma de seleção de artigos a partir da revisão bibliográfica da literatura	57
Figura 5. Fluxograma do subestudo do Microbioma	79
Figura 6. Gráfico acíclico direcionado representando os efeitos das variáveis sob o microbioma intestinal	84
Figura 7. Gráfico acíclico direcionado representando os efeitos das variáveis sob o microbioma intestinal	88

Lista de tabelas

Tabela 1. Descrição dos genes e fenótipos associados encontrados na revisão	37
Tabela 2. Descrição dos números relativos a cada acompanhamento realizado na Coorte de Nascimentos de 2004. Pelotas, RS	78

Lista de quadros

Quadro 1. Exemplos de diferentes índices para medir a composição do microbioma intestinal	15
Quadro 2. Resumo dos artigos selecionados para revisão entre associação de aspectos genéticos e composição do microbioma intestinal.	48
Quadro 3. Resumo dos artigos selecionados para a revisão sobre a associação entre consumo de alimentos de ultraprocessados e características quantitativas relacionadas ao microbioma intestinal.	64
Quadro 4. Apresentação das variáveis que serão usadas no artigo 2	82
Quadro 5. Apresentação das variáveis que serão usadas no artigo 3	87

1. INTRODUÇÃO

O microbioma humano é definido como o conjunto de microrganismos, seus genes e produtos gênicos que colonizam o corpo humano. Estes conjuntos são adquiridos desde o nascimento e sofrem alterações ao longo da vida (Fredrik, Ruth E, Justin L., Daniel A., & Jeffrey I., 2005; Freidin et al., 2021; Robertson, Manges, Finlay, & Prendergast, 2019b). Embora diversos tecidos e sistemas do corpo humano sejam colonizados por microrganismos, desde a pele até o intestino, a microbiota intestinal é a mais amplamente estudada.

O intestino humano é colonizado por inúmeras bactérias de diferentes espécies, apresentando uma alta diversidade microbiana. Apesar de haver grande variabilidade na composição do microbioma intestinal entre indivíduos, a maior parte das bactérias observadas no intestino humano pertencem aos filos Firmicutes e Bacteroidetes. A diversidade e a composição são associadas a diferentes determinantes ambientais e genéticos, como diferentes origens das populações, devido a coevolução entre a microbiota intestinal e o hospedeiro ao longo dos anos (Liang, Leung, Guan, & Au, 2018), dieta, medicamentos, tabagismo, entre outros fatores ambientais (Moran-Ramos et al., 2020), bem como fatores genéticos do hospedeiro (Goodrich et al., 2016).

O consumo de alimentos ultraprocessados (AUP), produtos de alta densidade energética, economicamente acessíveis e convenientes (prontos para o preparo ou consumo) (BRASIL, 2014), podem modular a microbiota intestinal (Sonnenburg & Bäckhed, 2016). A literatura aponta que o consumo em longo prazo deste tipo de alimento pode levar a mudanças duradouras na microbiota intestinal, como aparente diminuição da diversidade alfa (Matsuyama et al., 2019) ou abundância relativa de táxons específicos, apresentando uma microbiota descrita como inflamatória (García-Vega, Corrales-Agudelo, Reyes, & Escobar, 2020; O'Keefe et al., 2015).

A composição e a atividade desse complexo sistema microbiano têm sido associada a vários desfechos de saúde como obesidade, diabetes melito, cânceres, transtornos psiquiátricos e distúrbios inflamatórios, metabólicos e degenerativos (Cani, 2018; Liang et al., 2018; Martins-Silva et al., 2021; Salvucci, 2019), sendo consideradas, por alguns autores, um valioso biomarcador de risco e prognóstico de doenças (Cong & Zhang, 2018). Para aprofundar o

conhecimento sobre características que modulam o microbioma intestinal e possibilitar futuros estudos de intervenção, é importante mais estudos que explorem fatores dietéticos, como o consumo de AUP, e fatores genéticos do hospedeiro.

Diante disso, este projeto tem por objetivo explorar fatores determinantes nutricionais e genéticos do microbioma intestinal na adolescência utilizando dados coletados de uma subamostra da Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Definição e características do microbioma intestinal humano

A microbiota corresponde à comunidade ecológica de microrganismos comuns, tanto benéficos quanto patogênicos que habitam as superfícies externas e internas do organismo como pele, cabelo, cavidade oral, vias aéreas, trato gastrointestinal (TGI) e trato urogenital (Lederberg & McCray, 2001). Essa comunidade, em sua maioria, é composta por espécies bacterianas, mas também por vírus, fungos e protozoários. A coleção de genomas desses microrganismos, em um ambiente determinado e especialmente no organismo humano, é chamada de microbioma (del Castillo, Valladares-García, & Halabe-Cherem, 2018; Peter J Turnbaugh et al., 2009). Apesar da clara diferenciação, muitas vezes os termos microbiota e microbioma são utilizados como sinônimo na literatura.

O TGI, em particular o intestino grosso, é colonizado por microrganismos vivos (Jethwani & Grover, 2019), que formam a microbiota intestinal. Nos anos 1900, surgiu uma teoria de que as bactérias podem exercer papéis de regulação da saúde e da doença. O cientista russo Metchnikoff postulou que semear o intestino com bactérias saudáveis, consumindo produtos lácteos fermentados, poderia combater bactérias nocivas e prolongar a vida (Metchnikoff, 1908). Desde então, e mais especificamente nas últimas décadas, devido a avanços técnicos em microbiologia e bioinformática, as pesquisas têm conseguido estabelecer padrões consistentes de investigação da microbiota por meio do processamento e análise de vasta quantidade de dados, capazes de determinar o perfil e as características dos ecossistemas complexos.

Atualmente, reconhece-se que as células microbianas que colonizam o corpo humano - principalmente em superfícies mucosas e cutâneas - são aproximadamente tão numerosas quanto as células humanas e, coletivamente, apresentam um repertório genético muito mais amplo do que o genoma do hospedeiro (Gilbert et al., 2018; Sender, Fuchs, & Milo, 2016). Em indivíduos saudáveis, o microbioma normal é relativamente estável e compõe com o hospedeiro uma relação de simbiose (Scholtens, Oozeer, Martin, Ben Amor, & Knol, 2012).

A diversidade é a chave para um microbioma saudável, uma vez que cada indivíduo tem uma assinatura única da microbiota intestinal, com variações em abundância ao longo do TGI, permitindo que vários micróbios sejam capazes de desempenhar funções semelhantes (Huttenhower et al., 2012). Sua composição é dinâmica, sofrendo influência de acordo com idade, tipo de parto, tipo de dieta, uso de medicamentos e diversos outros fatores (Hopkins, Sharp et al. 2002).

A microbiota intestinal caracteriza-se como um ecossistema complexo, não só pela diversidade de espécies de microrganismos que habitam o intestino, como também pela influência marcante em seu hospedeiro nos processos de homeostase e doença (Lozupone, Stombaugh, Gordon, Jansson, & Knight, 2012). Portanto, a colonização dessa mucosa tem funções essenciais para a manutenção e o equilíbrio da homeostase do hospedeiro, tais como modulação do sistema imunológico, regulação das vias de sinalização do hospedeiro, prevenção da invasão de microrganismos patógenos, síntese de vários produtos metabólicos, bem como o controle da proliferação e diferenciação de células epiteliais (Gomaa, 2020; Mills, Stanton, Lane, Smith, & Ross, 2019; Rothschild et al., 2018). Mudanças na composição da comunidade microbiana intestinal podem, portanto, influenciar as relações de saúde-doença do hospedeiro.

Sabe-se que mais de cinquenta filos bacterianos colonizam o TGI e a microbiota intestinal humana é especificamente dominada por filos como: Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes (Greiner & Bäckhed, 2011; Sheehan & Shanahan, 2017), representando até 90% de todas as bactérias intestinais de indivíduos saudáveis (Jethwani & Grover, 2019). Já os gêneros mais comumente encontrados são Bacteroides, Clostridium, Peptococcus, Bifidobacterium, Eubacterium, Ruminococcus, Faecalibacterium e Peptostreptococcus (Morgan, Segata , & Huttenhower, 2014). Para melhor compreensão, na Figura 1 podemos visualizar uma representação gráfica da taxonomia bacteriana.

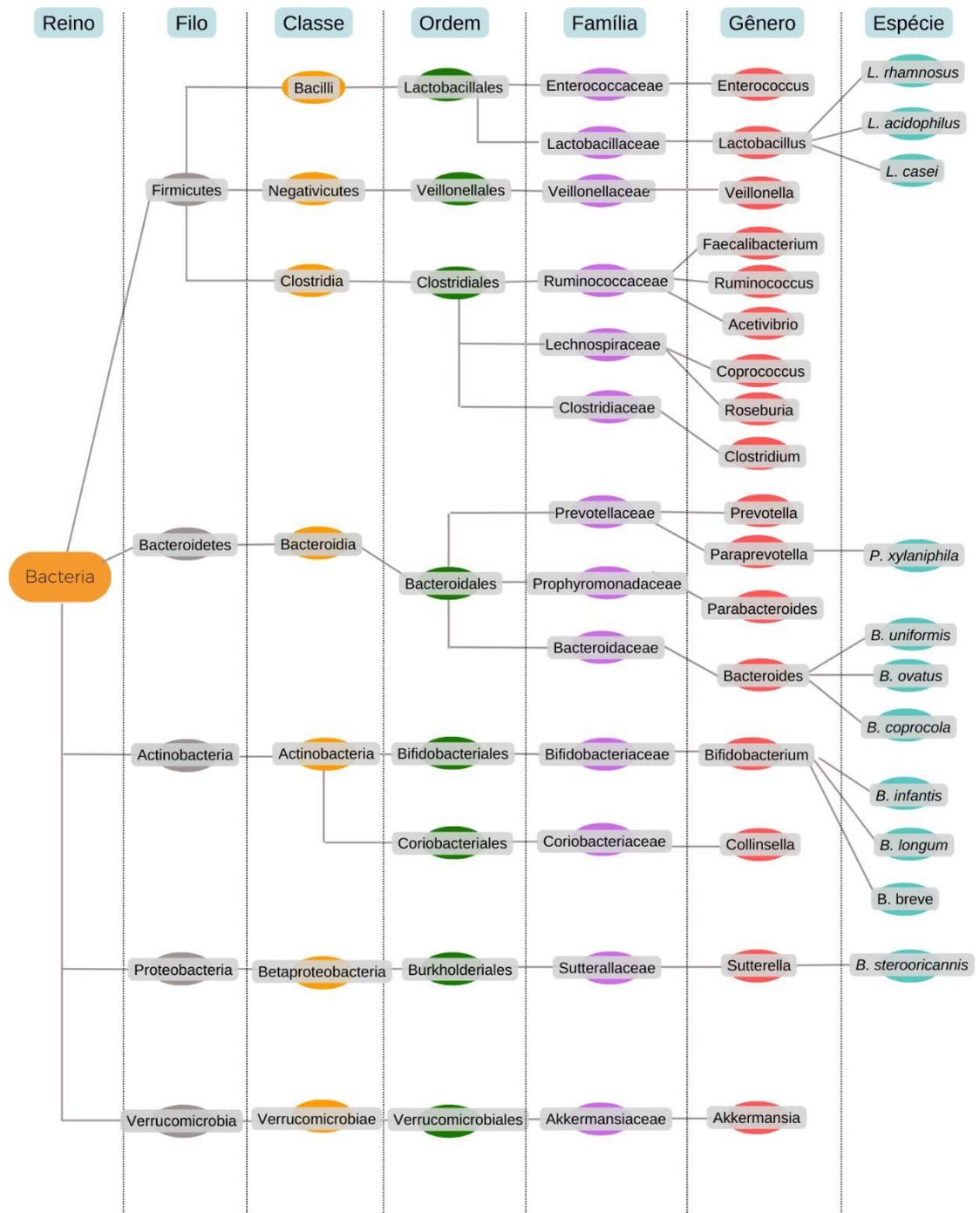


Figura 1. Classificação taxonômica bacteriana conforme o National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy Database (Schoch et al., 2020). Adaptado de Checa-Ros, Jeréz-Calero, Molina-Carballo, Campoy, and Muñoz-Hoyos (2021).

Na literatura científica, há três medidas capazes de expressar a diversidade da microbiota, sendo elas: abundância, diversidades alfa e beta. Abundância é uma característica numérica, definida como a medida ou frequência de microrganismos de uma comunidade em determinado ecossistema (Booth, Murphy, & Swanton, 2003). A diversidade alfa descreve o número de táxons distintos (espécies, gêneros, famílias) dentro de um ecossistema microbiano (no caso do projeto, o ecossistema é o microbioma intestinal) (Willis, 2019). Por sua vez, a diversidade beta compara as diferenças de composição e táxons entre quaisquer dois ecossistemas (no caso do presente projeto, microbioma intestinal de dois indivíduos, por exemplo), esta medida fornece uma medida da distância ou dissimilaridade entre as amostras, além de permitir equiparar a contagem de táxons que são únicos para cada um dos ecossistemas (Li, Yan, Zhang, Zhang, & Niu, 2021). Portanto, obter medidas de diversidade se torna um fator importante para avaliar a composição, função e dinâmica da microbiota.

No Quadro 1, estão apresentados os diferentes índices utilizados para medir a diversidade e a abundância de uma área. Não existem métodos melhores que outros, mas há métodos que conseguem se adequar melhor a determinado tipo de dado coletado. Dos estimadores tido como clássicos, temos o índice de Shannon-Wiener que valoriza as espécies mais comuns e o índice de Simpson para as espécies consideradas mais raras, ambos são relativamente independente de tamanho amostral (Odum, 1988). O índice de Diversidade de Pielou indica a distribuição dos indivíduos dentre as espécies de uma amostra (Pielou, 1966). Outro meio de resumir a diversidade é por meio de estimadores de riqueza, por exemplo, Chao 1 e 2. Chao 1 estima a riqueza a partir da abundância e Chao 2 é um estimador de riqueza baseado na incidência de espécies.

Dentre os índices de diversidade beta ou de dissimilaridade, o índice de Bray-Curtis pode ser expresso como a distância entre abundâncias das espécies, já a matriz de dissimilaridade de Jaccard, indica a proporção de espécies compartilhadas entre duas amostras em relação ao total de espécies.

Quadro 1. Exemplos de diferentes índices para medir a composição do microbioma intestinal.

Abundância	Diversidade alfa	Diversidade beta
Relativa	Shannon-Wiener	Índice de Bray-Curtis
	Simpson	Matrizes de dissimilaridade de Jaccard
	Chao 1 e 2	
	Diversidade de Pielou	

2.2. Tecnologias de sequenciamento do microbioma

Nos últimos anos, os avanços das tecnologias de sequenciamento genético e de bioinformática evoluíram rapidamente (Gao et al., 2021). A partir de amostras fecais humanas, as comunidades microbianas do intestino podem ser investigadas, possibilitando que toda a microbiota presente possa ser detectada (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016). Desta maneira, são fornecidas informações importantes sobre a composição e funcionalidade do microbioma intestinal e de que forma o microbioma e seus constituintes são definidos.

Atualmente, dois métodos são aplicados para caracterização de microbioma: metagenômico e metataxonômico. O primeiro utiliza um sequenciamento aleatório em genomas inteiros, conhecido como *shotgun*, é aplicado para sequenciar o DNA, permitindo o estudo direto do material genético presente no ambiente (Handelsman, Rondon, Brady, Clardy, & Goodman, 1998). As moléculas longas de DNA podem ser quebradas aleatoriamente em fragmentos que são então sequenciadas. Assim, todo o genoma bacteriano pode ser sequenciado (Weinstock, 2012). A segunda abordagem, de metataxonomia, escolhida para ser utilizada neste projeto, é mais econômica e consiste no sequenciamento direcionado de regiões hipervariáveis do gene da subunidade 16S do ácido ribonucleico (RNA) ribossomal (16s rRNA), que é encontrado em todas as bactérias. Esse gene contém regiões que permaneceram bastante conservadas ao longo da evolução e consiste em nove regiões hipervariáveis (V1 a V9), o que permite a identificação e classificação dos táxons de determinada amostra (Hamady & Knight, 2009).

Esta abordagem é capaz de

definir um amplo perfil de microbiomas bacterianos, embora seja limitado à identificação de bactérias a nível de espécie (exemplo: *Bifidobacteria*).

Ambas as abordagens têm suas limitações, como: o sequenciamento de 16S rRNA pode ser tendencioso devido à amplificação desigual do gene 16S rRNA das espécies, além de sequenciar apenas este gene. Não há padronização no local ou método de coleta ou nas regiões do 16s rRNA usadas o que poderia justificar a disparidade nos resultados encontrados nos estudos de microbioma. A composição taxonômica recuperada depende dos primers selecionados e da região variável alvo.

No sequenciamento *shotgun* não há seleção de um alvo definido, se faz toda extração do DNA da amostra que pode ser fragmentado e sequenciado; o sequenciamento *shotgun* mostra-se oneroso frente ao sequenciamento do gene 16S rRNA, pois requer métodos de análises mais caros e de bioinformática mais complexas. Por fragmentar aleatoriamente o DNA, o sequenciamento *shotgun* poderia identificar e traçar o perfil de bactérias, fungos, vírus e muitos outros tipos de microrganismos ao mesmo tempo.

A partir do sequenciamento, o pesquisador pode optar em seguir com a abordagem por OTU (*Operational Taxonomic Unit*) ou ASV (*Amplicon Sequence Variant*). Uma OTU representa um agrupamento de sequências de nucleotídeos que são altamente semelhantes, assim cepas de uma mesma espécie terão menos variações entre si, quando comparadas com outras espécies. A abordagem por ASV, diferente da formação de OTU, procura encontrar quantas sequências únicas e exatas foram encontradas em um determinado organismo. A abordagem ASV apresenta maior reprodutibilidade e facilidade na comparação entre os estudos, por apresentar sequências únicas, que são idênticas independente do estudo, entretanto a abordagem OTU é mais utilizada pela comunidade e apresenta maior vantagem em relação ao poder computacional (Callahan et al., 2016).

2.3. Composição do microbioma intestinal da gestação à adolescência

A formação da comunidade bacteriana intestinal sofre drásticas transformações durante o desenvolvimento humano (Ihekweazu & Versalovic, 2018) e

mudanças substanciais ocorrem desde o início da vida até a fase idosa (Tiihonen, Ouwehand, & Rautonen, 2010). Esse processo complexo é dependente de múltiplos fatores, incluindo idade, tipo de parto, alimentação e exposições ambientais. A colonização da mucosa intestinal se dá por flutuações em sua diversidade, até que em determinado ponto alcança um equilíbrio, a partir do qual a comunidade de microrganismos se mantém relativamente estável (Yatsunenکو et al., 2012). Intercorrências no desenvolvimento de um ecossistema saudável de microbioma no início da vida podem ter efeitos duradouros (Yatsunenکو et al. 2012) ao longo da vida e na saúde do hospedeiro. Atualmente, a literatura sobre composição do microbioma provém, majoritariamente, de estudos em adultos, havendo poucas as evidências sobre a composição da microbiota intestinal na adolescência. Os estudos exploram o período crítico de desenvolvimento e no decorrer da vida adulta, quando a microbiota é presumivelmente madura (Hollister et al., 2015).

O início da vida constitui uma janela crítica para o desenvolvimento imunológico e fisiológico. Entretanto, há controvérsia entre dois pontos de vista acerca do momento em que a microbiota do indivíduo é colonizada pela primeira vez. Um deles aponta que o ambiente intrauterino saudável é estéril, portanto, os microrganismos são adquiridos durante e após o parto (Tissier, Carre, & Naud, 1900), qualquer situação adversa, levantaria suspeita de predisposição a infecções ou complicações na gravidez. O outro ponto de vista sugere que existam comunidades microbianas na placenta (Aagaard et al., 2014), líquido amniótico e mecônio (as primeiras fezes do bebê) (Aagaard et al., 2014; Collado, Rautava, Aakko, Isolauri, & Salminen, 2016; Perez-Muñoz, Arrieta, Ramer-Tait, & Walter, 2017). Embora esses achados possam endossar a transferência vertical de um microbioma menos complexo como o do feto antes do nascimento, essa hipótese ainda é controversa.

2.4. Determinantes do microbioma intestinal

2.4.1. Fatores precoces e determinantes da microbiota

Importantes fatores no início da vida são considerados determinantes da diversidade e composição do microbioma intestinal, incluindo fatores genéticos

do hospedeiro e fatores ambientais. Alguns fatores relacionados com o ciclo vital serão explorados a seguir.

Como relatado anteriormente, o tipo de parto influencia a formação, consolidação e maturação da microbiota bacteriana do recém-nascido (Clemente, Ursell, Parfrey, & Knight, 2012). Diversos estudos relatam que a composição da microbiota de crianças nascidas por parto cesáreo é distinta das nascidas por parto vaginal (Dobbler et al., 2017; Perez-Muñoz et al., 2017). Aqueles nascidos de parto normal apresentam maior quantidade de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* adquiridas no canal do parto, enquanto os nascidos de parto cesariano a microbiota tem maior abundância de *Staphylococcus* e *Corynebacterium* (Dominguez-Bello et al., 2010; Makino et al., 2013), colonização mais consistente com a pele humana. Portanto, conforme o tipo de parto, ressalta-se uma importante disparidade de amadurecimento da microbiota intestinal que, de acordo com achados anteriores, levam a maturações ímpares no organismo do recém-nascido (Dominguez-Bello et al., 2010) e, posteriormente, na saúde infantil, uma vez que há evidência de que as diferenças começam a se tornarem imperceptíveis apenas após o segundo ano de vida (Robertson, Manges, Finlay, & Prendergast, 2019a).

O desenvolvimento da microbiota intestinal é influenciado, em grande parte, pela amamentação (leite materno *versus* fórmula infantil) (Moore & Townsend, 2019), devido ao contato com os micróbios areolares e do leite materno e a oferta de fontes de energia importantes para muitas bactérias (oligossacarídeos do leite humano) (Donnet-Hughes et al., 2010). Há uma associação dose-dependente entre a composição do microbioma intestinal infantil e a ingestão diária de leite materno (Pannaraj et al., 2017). Bebês amamentados com leite materno apresentam proporções mais altas de espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, enquanto aqueles que consomem fórmula apresentam maior prevalência de *Clostridium* e *Anaerostipes*, além de diminuição da diversidade bacteriana, mesmo após o primeiro ano de vida (Fredrik et al., 2005; Ihekweazu & Versalovic, 2018). Com a introdução de alimentos sólidos, inicia uma mudança na microbiota para um aumento da abundância de Firmicutes e Bacteroidetes degradadores de fibras (Bergström et al., 2014; Palmer, Bik, DiGiulio, Relman, & Brown, 2007) que formam a maioria

dos microrganismos da microbiota adulta.

Apesar dos relatos de que o microbioma se encontra relativamente estável após os primeiros três anos de idade (De Filippo, Di Paola, Giani, Tirelli, & Cimaz, 2019), outras evidências indicam que ele continua a se desenvolver na adolescência (Palmer et al., 2007). Embora, aparentemente, adolescentes ainda compartilhem a configuração central do microbioma da infância, há indícios de que haja comunidades bacterianas suficientemente diferentes entre os grupos etários (Agans et al., 2011). Com o aumento da idade o microbioma intestinal mostra-se menos complexo em relação as bactérias (Hopkins, Sharp, & Macfarlane, 2002). Ao nível do filo, em adultos, o microbioma intestinal é caracterizado pela abundância de Bacteroidetes e Firmicutes, exibindo bastante variação na proporção (Kundu, Blacher, Elinav, & Pettersson, 2017). Verificou-se também que o microbioma adolescente difere funcionalmente do adulto, sendo que o microbioma de adolescentes expressa genes relacionados ao desenvolvimento e crescimento físico do hospedeiro, enquanto o adulto parece estar mais associado a genes envolvidos na fosforilação oxidativa, biossíntese de lipopolissacarídeos, montagem flagelar e biossíntese de hormônios esteroides, vias que foram relacionadas no contexto da inflamação e obesidade (Agans et al., 2011; Hollister et al., 2015).

Estudos com gêmeos humanos monozigóticos e dizigóticos mostram que a composição da microbiota intestinal apresenta maior semelhança entre gêmeos do que quando comparados com indivíduos sem parentesco, sugerindo que pode haver influência genética sobre esta característica (J. K. Goodrich et al., 2016b). Adicionalmente, na literatura, a herdabilidade estimada para qual a genética humana poderia explicar a variação do microbioma intestinal, varia entre cerca de 1,9% (Rothschild et al., 2018) a 8,8% (J. Goodrich et al., 2016). Dessa forma, é possível supôr que variantes genéticas do hospedeiro possam ter um importante papel na modulação da diversidade e na composição do microbioma intestinal. É crescente o número de GWAS sobre o tema, o que pode auxiliar na construção de novas evidências para essas estimativas.

Apesar de o microbioma intestinal sofrer influência genética do hospedeiro, grande parte da variabilidade é explicada por fatores ambientais (Kurilshikov, Wijmenga, Fu, & Zhernakova, 2017). Fatores demográficos, socioeconômicos, comportamentais e ambientais precoces, como sexo (Mueller

et al., 2006), idade (Schmidt, Raes, & Bork, 2018), uso de antibióticos (Nicholas A et al., 2016) e nível socioeconômico (Lapidot et al., 2022) já foram associados ao microbioma intestinal. Dentre os fatores ambientais precoces, o tipo de parto (Clemente et al., 2012) e a amamentação (leite materno *versus* fórmula infantil) (Donnet-Hughes et al., 2010; Moore & Townsend, 2019) são mais descritos na literatura. Há ainda outras especulações como associação com índice de massa corporal (Riva et al., 2017), alimentação (Aya, Flórez, Perez, & Ramírez, 2021) e a prática de exercício físico (Whisner, Maldonado, Dente, Krajmalnik-Brown, & Bruening, 2018). O modelo teórico está apresentado na Figura 2. Este modelo foi pensado para elucidar as complexas condições que influenciam a composição do microbioma intestinal na adolescência ao longo do ciclo vital.

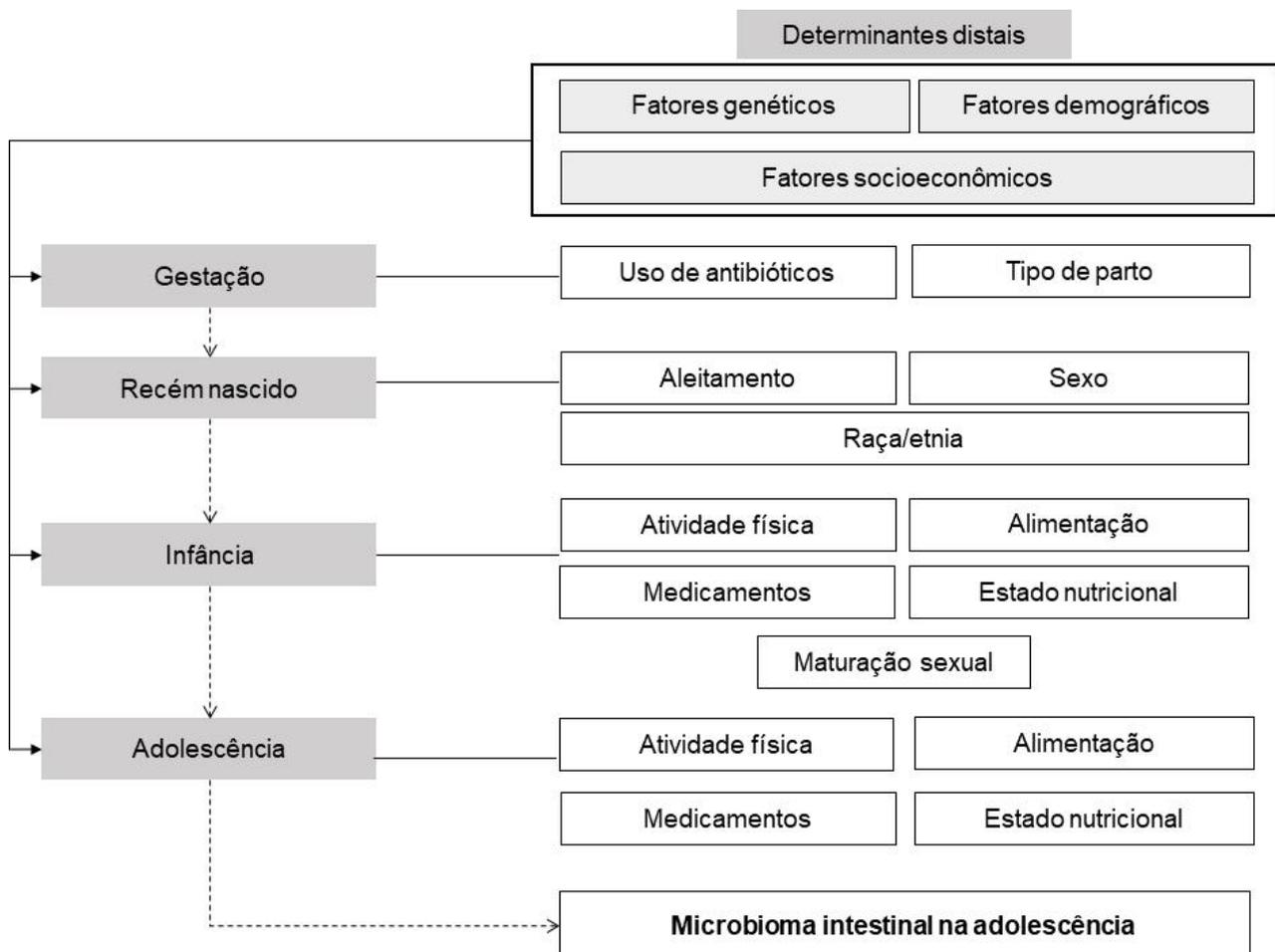


Figura 2. Modelo teórico para relação entre aspectos determinantes e o microbioma intestinal.

O sexo mostrou ser um importante determinante do microbioma intestinal (Dominianni et al., 2015; Mueller et al., 2006; Jun Wang et al., 2016). Mueller et al. (2006) observaram que mulheres adultas, com idades entre 20 a 50 anos de idade, apresentaram menor abundância de Bacteroidetes em comparação com os homens. De maneira similar, Dominianni et al. (2015), em amostra com indivíduos com idade entre 30 a 83 anos, descobriram que as mulheres apresentaram uma proporção de 5,5% de Bacteroidetes na abundância relativa de táxons específicos, enquanto os homens apresentaram 11,4%. Em vista disso, é possível que hormônios sexuais desempenhem um papel na diferença sexual da microbiota intestinal. Acredita-se no importante papel dos hormônios sexuais masculinos na formação da composição da microbiota do intestino, uma vez que as diferenças sexuais não aparecem até a puberdade (Kim, Unno, Kim, & Park, 2019).

Nesse sentido, a idade é outro fator importante. Existe evidência sobre a relação entre diferenças na composição da microbiota intestinal e a idade do hospedeiro (Schmidt et al., 2018). Do nascimento à primeira infância a transição é claramente mais definida e, após certo período a microbiota intestinal das crianças assemelha-se a de adultos e aumenta em diversidade (Falony et al., 2016). Em estudo de caracterização de perfil microbiano, Peterson e colaboradores (Peterson, Bonham, Rowland, Pattanayak, & Klepac-Ceraj, 2021), encontraram que a diversidade alfa (dentro da amostra) aumentou ao longo dos primeiros 30 meses de idade das crianças, uma vez que o microbioma passa a ser mais diversificado e complexo ao passar do tempo. Já as pessoas idosas mostram assinaturas de perda de diversidade, sendo que, conforme o envelhecimento há diminuição da estabilidade composicional temporal e mudanças composicionais, todas associadas à saúde geral, mas também a fatores de confusão, como alimentação, ambiente habitacional, estilo de vida mais restrito e uso de medicação (O'Toole & Jeffery, 2015; Ticinesi et al., 2017). Os antibióticos estão entre os medicamentos mais prescritos às crianças (Sousa Ferreira, Barbosa de Sousa, Leite Barbosa, Sousa Monteles, & Silva Gomes, 2021), apesar de a exposição aos antibióticos no início da vida estar associada a inúmeras doenças mais tarde na vida (Chong-Neto et al., 2019). Este tipo de medicamento perturba diretamente a microbiota intestinal, podendo afetar a estrutura da camada de muco e, conseqüentemente, a função da

barreira gastrointestinal do hospedeiro, podendo estar também associado a origem de doenças inflamatórias intestinais (Cavalcante, Lima, Parente, & Nogueira, 2020), levando a composição de microbiota alterada em crianças e adultos (Nicholas A et al., 2016). Essa ruptura ecológica pode ser ainda mais pronunciada quando a exposição ocorre durante a gestação, no trabalho de parto com a administração no parto cesariano ou administrado à criança após o nascimento, caracterizado pelo período crítico de desenvolvimento da microbiota (Santos, 2002). Entretanto, as consequências dessas mudanças na fisiologia do hospedeiro não são bem compreendidas, mas sabe-se que alguns medicamentos utilizados são capazes de atravessar a barreira placentária (Pacifci, 2006).

A administração de antibióticos durante o parto também está associada à diminuição da diversidade bacteriana nas primeiras fezes do recém-nascido e a uma menor abundância de lactobacilos e bifidobactérias no intestino. Em estudo com bebês nascidos no Japão, pesquisadores encontraram que o uso de antibióticos por algum período durante os primeiros dois meses de vida, mostrou uma tendência de microbiota menos diversa, o que pode ter sido causado pelo surgimento de certas bactérias devido a seleção do antibiótico (Tanaka et al., 2009). No estudo de Gschwendtner e colaboradores (2019), o uso de antibióticos resultou em maior abundância do gênero *Bifidobacterium* e variantes de sequência de amplicon relacionado a *Bifidobacterium*, sugerindo que *Bifidobacterium* são altamente vulneráveis aos antibióticos (Gschwendtner et al., 2019).

Exposições sociais e comportamentais estão notavelmente associadas a diferenças na ecologia microbiana intestinal. Em estudo com crianças árabes saudáveis de 6 a 9 anos de idade moradoras de aldeias em Israel (Lapidot et al., 2022), mostrou que a maior aglomeração domiciliar está significativamente associada ao aumento de diversidade alfa, composição bacteriana diversificada e variações de táxons em crianças dessa faixa etária. As associações mostraram aumento de *Prevotella copri*, que tem sido relacionado a condições inflamatórias (Scher et al., 2013) e redução de *Faecalibacterium prausnitzii*, (cujos mecanismos benéficos e papéis ainda não são claros) e também redução de *Bifidobacterium*.

Em estudo com 1.672 voluntários adultos britânicos mostrou uma associação

positiva entre nível socioeconômico (NSE) da área onde vivem e diversidade da microbiota intestinal, mesmo após ajuste para déficit de saúde, idade, IMC, dieta (Bowyer et al., 2019). Em outro estudo, que avaliou se o NSE da vizinhança tinha influência no microbioma intestinal em uma amostra de adultos americanos, os autores encontraram que quanto maior o NSE da vizinhança, maior era a diversidade alfa relacionada à microbiota (Miller et al., 2016), o que diverge de outros resultados. Outro achado do estudo de Miller e colaboradores foi a associação entre o NSE mais alto com maior abundância de *Bacteroides* e menor abundância de *Prevotella*, que podem refletir alimentação relativamente enriquecidas por gorduras animais e carboidratos, respectivamente.

Em estudo de coorte italiano com indivíduos obesos e de peso normal, com idade entre 6 e 16 anos (Riva et al., 2017), o índice de massa corporal (IMC) foi positivamente correlacionado com a microbiota intestinal. Os autores encontraram abundância, a nível de filo, de Firmicutes e Ruminococcaceae e redução significativa de *Bacteroides*, à nível de gênero, e as métricas de diversidade alfa não foram significativamente diferentes entre os grupos. Em um outro estudo com adultos (Dominianni et al., 2015), após análise estratificada por sexo, o IMC foi associado à composição do microbioma intestinal em mulheres, mas não em homens. Quanto a composição geral do microbioma, as mulheres desta amostra apresentavam menor abundância de *Bacteroidetes* em relação aos homens (5,5% nas mulheres e 11,4% nos homens), bactérias essas que têm capacidade de modular função imune de forma benéfica e são conhecidos como atuantes no estado saudável (Gibiino et al., 2018).

Quanto à prática de atividade física, parece não haver evidências robustas de associação. Por exemplo, em um estudo transversal com universitários (Whisner et al., 2018), não foram encontradas diferenças estatísticas nas métricas de diversidade alfa por categorias de atividade física e tempo de tela. Da mesma maneira, em uma revisão sistemática (Aya et al., 2021), foi observado que em estudos transversais conduzidos com indivíduos saudáveis e não atletas não houve diferenças na diversidade alfa e beta. Por outro lado, essa mesma revisão relatou que, em estudos com atletas, como ciclistas com mais de 2 anos participando de eventos competitivos, foi observada maior diversidade alfa, assim como maior abundância nos gêneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* e *Akkermansia*.

2.4.2. Alimentação e relação com microbioma

A microbiota intestinal pode ser modulada pela mudança nos hábitos alimentares. Os microrganismos presentes na microbiota são responsáveis pela biossíntese de vitaminas e aminoácidos essenciais, bem como a geração de importantes subprodutos metabólicos a partir de componentes dietéticos não digeridos pelo intestino delgado (Fredrik et al., 2005). Modificações na composição da microbiota intestinal podem influenciar o estado nutricional por alterar a permeabilidade intestinal, modulação e digestão dos nutrientes, bem como as respostas imunes do hospedeiro (Sheflin et al., 2017; Wolter et al., 2021).

A permeabilidade intestinal, portanto, refere-se à capacidade de permitir ou não a passagem de moléculas, por diferentes mecanismos, do lúmen para a corrente sanguínea (Travis & Menzies, 1992). O consumo de alimentos pobres em fibras, pode degradar a barreira intestinal, aumentando a vulnerabilidade a microrganismos patógenos (Singh et al., 2017).

A quantidade, o tipo e o equilíbrio dos principais macronutrientes da dieta (carboidratos, proteínas e gorduras) têm grande impacto na microbiota do intestino grosso, em termos de riqueza e diversidade bacteriana (Rinninella et al., 2019), e isto tem efeito nas respostas imunes e inflamatórias do hospedeiro (Scott, Gratz, Sheridan, Flint, & Duncan, 2013). Os carboidratos são compostos orgânicos mais abundantemente encontrados na maioria das frutas, vegetais, legumes e cereais e se dividem em dois grupos: digeríveis e não digeríveis (Russell, Hoyles, Flint, & Dumas, 2013; Singh et al., 2017). Os carboidratos digeríveis como sacarose, lactose e amido são enzimaticamente degradados no intestino delgado e rapidamente liberados como glicose na corrente sanguínea. Já os carboidratos não digeríveis, também chamados de “fibra alimentar”, são resistentes à digestão no intestino delgado e chegam ao intestino grosso, onde podem ser total ou parcialmente fermentados por microrganismos resistentes (Mudgil & Barak, 2013; Rinninella et al., 2019). As fibras afetam a motilidade e o trânsito intestinal e são substratos úteis para a microbiota intestinal, impactando sua composição e qualidade (Flint, Scott, Duncan, Louis, & Forano, 2012).

A ingestão de fontes de fibra alimentar estimula a proliferação microbiana e é capaz de modificar o ambiente intestinal. Essas fibras dietéticas sofrem

fermentações das bactérias anaeróbicas do cólon, formando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), a principal fonte de energia para os colonócitos, sendo associado neste contexto o nível de AGCC, com a mudança da composição da microbiota pela variação do pH (Simpson & Campbell, 2015). Estudos apontam que dietas ricas em carboidratos não digeríveis, como grãos integrais e farelo de trigo, aumentam consistentemente as Bifidobactérias e Lactobacilos intestinais (Carvalho-Wells et al., 2010; Costabile et al., 2008), contribuindo para melhorar a resistência à colonização e a proteção contra distúrbios gastrointestinais. Outro carboidrato não-digerível, como amido resistente, parece aumentar a abundância de Ruminococcus, *E. rectale* e *Roseburia* (Keim & Martin, 2014; Leitch, Walker, Duncan, Holtrop, & Flint, 2007).

Durante a digestão, as proteínas da dieta são primeiramente hidrolisadas em peptídeos pelas enzimas do hospedeiro e os aminoácidos livres são absorvidos no intestino delgado. Peptídeos e aminoácidos não absorvidos podem atingir o cólon, onde são fermentados por microrganismos comensais para produzir os AGCCs pelos principais filos microbianos, incluindo Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria (Rinninella et al., 2019). A degradação de proteínas pela microbiota intestinal fornece aminoácidos livres essenciais ao hospedeiro e os ácidos graxos de cadeia ramificada podem servir como fonte alternativa de energia para os colonócitos (Macfarlane, Cumming, & Allison, 1986). Os efeitos das proteínas na composição da microbiota intestinal variam de acordo com o tipo consumido. A ingestão de proteínas de origem animal (principalmente carne vermelha e laticínios) parece estimular o crescimento de bactérias patogênicas, como as Bacteroides, Alistipes e Bilophila (David et al., 2014; Hentges, Maier, Burton, Flynn, & Tsutakawa, 1977) em detrimento de bactérias benéficas, como as Bifidobacterium, levando a alterações na barreira intestinal. Por outro lado, estudos apontam que o consumo de proteínas vegetais, como a proteína de ervilha, pode aumentar Bifidobacterium e Lactobacillus comensais intestinais e reduzir *Bacteroides fragilis* patogênicos e *Clostridium perfringens* (Scott et al., 2013).

Poucos estudos investigaram o efeito do consumo de gordura dietética na microbiota intestinal. Os ácidos graxos da dieta podem ser divididos em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados de acordo com a presença de ligações duplas entre as moléculas de carbono. O consumo excessivo de

gorduras saturadas, pode conduzir a uma disbiose intestinal (estado em que o equilíbrio da microbiota normal foi perturbado) e tem sido associado ao estresse e depressão (Rinninella et al., 2019). Uma dieta rica em gordura pode levar a uma diminuição de *Eubacterium rectale* e *Blautia coccooides* (filo Firmicutes) e *Bacteroides spp.* do filo Bacteroidetes, no entanto, tais mudanças podem ser revertidas com uma dieta com baixo teor de gordura e alto teor de fibras, por exemplo (Wu et al., 2011).

2.4.3. Relação entre microbioma e saúde na adolescência

Alterações decorrentes da composição microbiana, como a disbiose, podem ser desfavoráveis e estar associadas ao desenvolvimento de uma série de doenças (Lloyd-Price et al., 2016). Essas alterações podem prejudicar o equilíbrio do ecossistema, levando a um estado caracterizado pelo aparecimento de vários fatores patológicos, como bactérias potencialmente perigosas. Nas últimas décadas, inúmeros desfechos foram relacionados a essa disbiose da microbiota intestinal e elucidam porque alguns indivíduos são mais suscetíveis que outros (Awany et al., 2019; Cong & Zhang, 2018; Neroni et al., 2021). Entretanto, essas investigações são escassas na população infantil e adolescente.

A definição do papel do microbioma nas doenças metabólicas apresenta-se como um paradoxo, embora seja intuitivo que o microbioma intestinal e o metabolismo do hospedeiro estejam interligados. Separar causa e efeito, devido ao confundimento residual, ainda é um desafio.

Os estudos que afirmam que diabetes melito e obesidade estão relacionados à permeabilidade da barreira intestinal e à composição da microbiota intestinal derivam predominantemente de estudos com camundongos (Fredrik et al., 2005). Em humanos, estudos encontraram diferenças na composição da microbiota intestinal de crianças com excesso de peso comparada com as de peso normal (Koleva, Bridgman, & Kozyrskyj, 2015). Também foi encontrado em estudo com humanos, porém com população adulta, que há menor proporção de Bacteroidetes entre os indivíduos com excesso de peso quando comparados aos eutróficos (P. J. Turnbaugh et al., 2006). Alguns estudos, também relacionam a alimentação com o desequilíbrio da microbiota

intestinal, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que induz a doenças crônicas não transmissíveis (Melo & Oliveira, 2018; Stephens, Arhire, & Covasa, 2018).

Em estudo de associação de metagenomas – análise genômica da comunidade de microrganismos ecológicos, sem a necessidade de realizar análises individuais (J. Qin et al., 2012) em adultos chineses de diferentes idades, foi identificado que o diabetes melito do tipo 2 está associado a alterações de composição na microbiota intestinal, mais aparentes nos níveis de filo e classe. Verificou-se que o consumo de fibra dietética apresenta efeitos metabólicos positivos para a saúde, uma vez que aumenta a saciedade, diminui o ganho de peso e os níveis de glicose e colesterol no sangue, diminuindo o risco de desenvolver diabetes, assim como doenças cardiovasculares (Garud & Pollard, 2020).

A manipulação da microbiota intestinal produz resultados positivos para intervenção na sintomatologia ou nas causas das doenças, com o intuito de melhorar a saúde. Essa intervenção pode ser feita por meio de prebióticos, probióticos ou simbióticos. Os prebióticos são componentes alimentares, não digeríveis, provenientes da dieta e que são fermentados pelas bactérias presentes no cólon dando origem a produtos finais como os AGCC (Karkow, Faintuch, & Karkow, 2007). Fornecem nutrientes essenciais ao epitélio entérico e estimulam o crescimento e a atividade de microrganismos benéficos, inibindo o crescimento e atividade de bactérias potencialmente prejudiciais. Estes prebióticos, incluem inulina, polissacáridos sem amido, dissacarídeos (lactulose) e polissacáridos, incluindo galactooligossacaridos e frutooligossacaridos (Barko, McMichael, Swanson, & Williams, 2018; Garud & Pollard, 2020).

Os probióticos são bactérias ou leveduras vivas que, podem colonizar temporariamente o intestino do hospedeiro (Organização Mundial da Saúde, 2002), podendo exercer efeitos benéficos através do aumento da barreira intestinal, regulação negativa da produção de citocinas inflamatórias, antagonismo de patogênicos e ainda estimulação da secreção de imunoglobulina A (Sidhu & van der Poorten, 2017). Já os simbióticos, são compostos combinados de prebióticos e probióticos, quando administrados em doses adequadas, podem beneficiar a saúde do hospedeiro (Saad, 2006).

A adolescência é uma época de crescimento rápido que representa uma oportunidade para influenciar o pico de massa óssea (Rizzoli, Bianchi, Garabédian, McKay, & Moreno, 2010). Pesquisas realizadas na última década mostram efeitos do microbioma intestinal na regulação da massa óssea e no desenvolvimento de doenças ósseas (como osteoporose) e de doenças inflamatórias articulares caracterizadas por perda óssea em adultos (Ibáñez, Rouleau, Wakkach, & Blin-Wakkach, 2019). Estudos em modelo animal mostram que camundongos sem microbioma intestinal apresentam alteração na massa óssea que pode ser revertida pela recolonização intestinal (Sjögren et al., 2012). Ainda não se tem resultados em estudos em humanos. O efeito do microbioma envolve mecanismos complexos, que incluem transporte de cálcio prejudicado, resposta de células T, inflamação sistêmica via ativação de citocinas, ativação de osteoclastos e reabsorção óssea (Sjögren et al., 2012; X. Xu et al., 2017). No entanto, ainda é necessária uma maior elucidação dos mecanismos envolvidos. Muitos transtornos psiquiátricos manifestam-se pela primeira vez na adolescência, quando os estressores frequentemente atingem o pico (Paus, Keshavan, & Giedd, 2008). A microbiota intestinal é um modulador fundamental do estresse e desempenha um papel nas condições de saúde mental e distúrbios neurodegenerativos (Yahfoufi, Matar, & Ismail, 2020). Os dados mais claros sobre o papel da microbiota intestinal são de estudos em animais, entretanto, estudos em humanos demonstram um papel modulador de distúrbios neuropsiquiátricos no eixo microbiota intestinal-cérebro como na ansiedade, depressão, estados de humor (Martins-Silva et al., 2021; Salvucci, 2019) e doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson e, principalmente, na população pediátrica, o autismo (Sampson et al., 2016; Vuong & Hsiao, 2017).

3. Revisão da literatura

3.1. Aspectos genéticos do hospedeiro e microbioma intestinal

Foi realizada uma busca sistemática da literatura com o intuito de identificar e descrever os trabalhos publicados acerca da relação entre aspectos genéticos do hospedeiro e o microbioma intestinal. A busca incluiu apenas estudos provindos de estudos de associações livres de hipótese prévia, ou seja,

estudos de associação ampla do genoma. Para isso, a busca foi realizada no catálogo de GWAS (GWAS Catalog) de fenótipos do Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano - Instituto Europeu de Bioinformática (NHGRI-EBI), que busca associar regiões do genoma com os fenótipos de interesse, a fim de identificar possíveis regiões com maior efeito sobre a característica e posterior investigação de funções biológicas (Yang, Lee, Goddard, & Visscher, 2013). Para a revisão, foi usado o seguinte critério de busca: microbioma intestinal (gut microbiome measurement; ID: EFO_0007874). EFO ou *Experimental Factor Ontology* é uma ontologia de acesso aberto que fornece uma descrição sistemática de muitas variáveis experimentais usadas em biologia molecular. Após a leitura na íntegra de todos os trabalhos identificados, estudos de GWAS não identificados na busca e citados nos trabalhos selecionados foram selecionados para inclusão na revisão.

Todas as etapas de seleção, exceto a leitura completa, foram realizadas usando o software EndNote (Thomson Reuters; <http://www.endnote.com/>), após a importação dos resultados da pesquisa das bases de dados para uma biblioteca no programa. Não foram aplicados limites para a busca. O fluxograma completo da seleção de artigos é mostrado na Figura 3.

Após a leitura dos artigos na íntegra, um protocolo foi definido para extração de dados dos textos completos para um quadro. As variáveis extraídas foram as seguintes: autor e ano de publicação, cidade e país, amostra e idade dos participantes do estudo, ancestralidade genômica, delineamento do estudo, objetivos, exposição, metodologia da exposição, desfecho, metodologia do microbioma, metodologia analítica, nível de significância, resultados, confundidores nas análises e limitações. Por fim, foram extraídos os SNPs associados respeitando a decisão de limiar de associação dos trabalhos individuais.

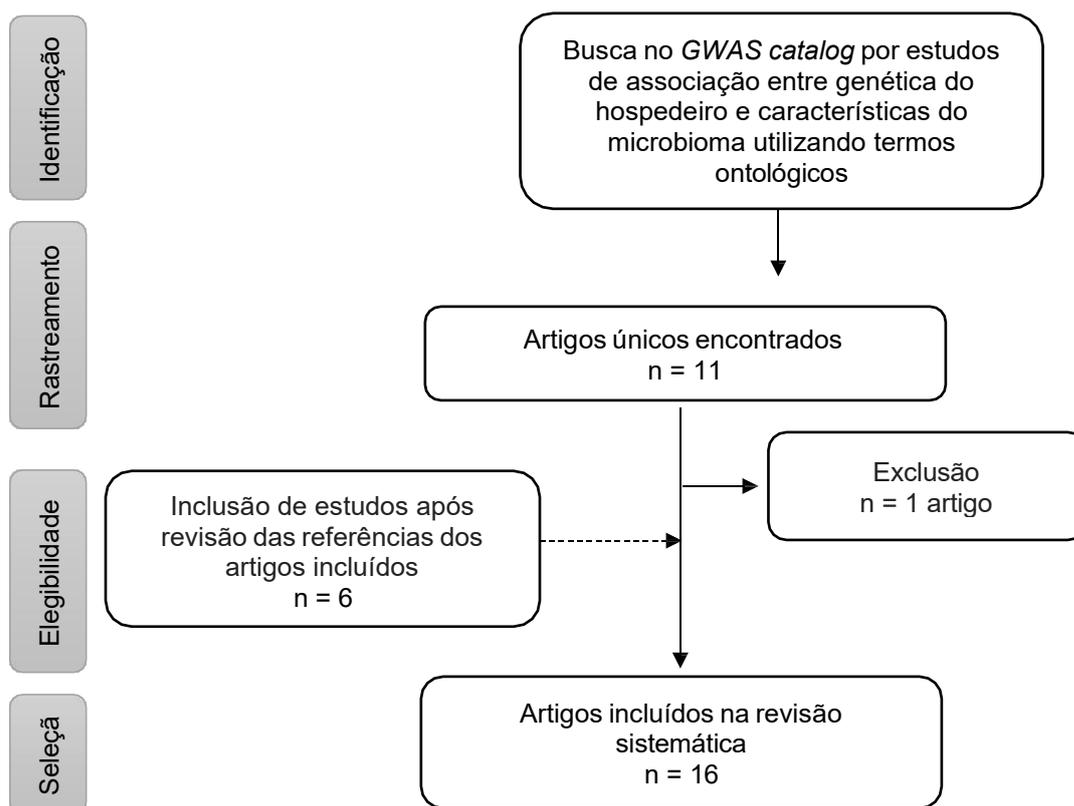


Figura 3. Fluxograma da seleção de artigos para revisão sistemática.

3.1.2. Síntese dos achados

Após a busca conduzida no dia 22/04/2022, foram identificados onze estudos únicos, que reportaram 2.308 associações entre variantes genéticas do hospedeiro e características do microbioma intestinal. Um artigo foi excluído por não conter medidas de características do microbioma. Este estudo utilizou valores preditos de tais características com base no genótipo do hospedeiro e em dados do microbioma publicados por outro estudo incluído na nossa revisão (Hughes et al., 2020). Foram incluídos na revisão, então, dez artigos e além destes, buscaram-se registros nas referências dos artigos selecionados, adicionando seis artigos à revisão. Com isso, dezesseis estudos foram incluídos na revisão e, estes, foram publicadas entre os anos de 2015 e 2022. Um resumo dos artigos encontrados está no Quadro 2.

Todos os estudos encontrados foram conduzidos com humanos, destes estão incluídos quinze artigos originais e uma meta-análise de associações genéticas em diferentes amostras. Oito estudos possuíam delineamento

transversal, com amostra proveniente de estudos de coorte (Bonder et al., 2016; Freidin et al., 2021; Julia K. Goodrich et al., 2016; Lopera-Maya et al., 2022b; Y. Qin et al., 2022; Scepanovic et al., 2019; Turpin et al., 2016; F. Xu et al., 2020), uma meta-análise baseada em genótipos e dados do microbioma de indivíduos de 24 coortes (A. A.-O. Kurilshikov et al., 2021). Também encontramos sete estudos com análise transversal (Blekhman et al., 2015; Davenport et al., 2015; Hughes et al., 2020; Ishida et al., 2020; Liu et al., 2021; Rühlemann et al., 2021; J. Wang et al., 2016).

Em relação a localização dos estudos incluídos, a maior proporção concentrou-se no Continente Europeu (seis estudos), seguido por Continente Americano (quatro estudos) e Continente Asiático (três estudos). Os países foram: Estados Unidos (Blekhman et al., 2015; Davenport et al., 2015; Julia K. Goodrich et al., 2016), Holanda (Bonder et al., 2016; Lopera-Maya et al., 2022b), Alemanha (Rühlemann et al., 2021; J. Wang et al., 2016), China (Liu et al., 2021; F. Xu et al., 2020), Reino Unido (Freidin et al., 2021), França (Scepanovic et al., 2019), Bélgica (Hughes et al., 2020), Finlândia (Y. Qin et al., 2022), Japão (Ishida et al., 2020), e Canadá (Turpin et al., 2016). Adicionalmente, a meta-análise genética (A. Kurilshikov et al., 2021) incluiu estudos conduzidos em doze países dos continentes Europeu, Americano e Asiático (Alemanha, Estados Unidos da América, Bélgica, Canadá, Países Baixos, Coreia do Sul, Finlândia, Israel, Suécia, Reino Unido e Holanda). O tamanho amostral variou de 93 indivíduos (Blekhman et al., 2015) a 167.729 indivíduos (participantes de uma coorte com um design exclusivo de três gerações) (Lopera-Maya et al., 2022a).

Com relação à faixa etária dos participantes, nos estudos de coorte, a média de idade variou entre 2,71 anos (A. A.-O. Kurilshikov et al., 2021) a 61,4 anos (Bonder et al., 2016). Nos estudos transversais, os participantes tinham entre 16 anos (Davenport et al., 2015) e 84 anos (J. Wang et al., 2016). De maneira geral, o objetivo dos estudos dos GWAS foi testar a associação dos genótipos do hospedeiro com a abundância ou presença de táxons na composição da microbiota intestinal.

O microbioma intestinal das amostras fecais foi identificado a partir do sequenciamento do gene rRNA 16S bacteriano, gene marcador mais amplamente utilizado para o perfil de comunidades bacterianas mistas e complexas (Blaut et al., 2002), em onze estudos (Davenport et al., 2015; Freidin

et al., 2021; Julia K. Goodrich et al., 2016; Hughes et al., 2020; Ishida et al., 2020; A. A.-O. Kurilshikov et al., 2021; Rühlemann et al., 2021; Scepanovic et al., 2019; Turpin et al., 2016; J. Wang et al., 2016; F. Xu et al., 2020). A amplificação destes diferentes estudos, após sequenciamento do gene 16S rRNA, variavam entre as regiões hipervariáveis V1 e V4. Cinco estudos caracterizaram o microbioma intestinal através do sequenciamento metagenômico de *shotgun* (Blekhman et al., 2015; Bonder et al., 2016; Liu et al., 2021; Lopera-Maya et al., 2022b; Y. Qin et al., 2022).

A partir desses dados, foram estimadas as variáveis de abundância relativa, diversidade alfa e diversidade beta, medidas que foram usadas como desfecho nos estudos. Alguns estudos usaram medidas de abundância relativa específicas, como o filo Bifidobacterium (Julia K. Goodrich et al., 2016) e a espécie *Coprococcus Comes* (Freidin et al., 2021). Os demais mediram a abundância relativa geral a nível de gênero ou filo, abundância a partir da estimativa de riqueza Chao1a. As diversas métricas de diversidade foram: índices de diversidade filogenética de árvore inteira, diversidade alfa (riqueza observada, diversidade de Shannon, uniformidade, índice de diversidade de Simpson e número de gêneros observados) e para diversidade beta, diferentes métodos de estimação foram aplicados: matrizes de dissimilaridade composicional Jaccard (não ponderada), Bray-Curtis (ponderado) e filogenético Unifrac (ponderado), estimação usando uma análise de escala multidimensional não métrica de dois eixos.

As variantes genéticas do hospedeiro (exposição) foram obtidas a partir de genotipagem do DNA genômico obtido de amostras de sangue na maioria dos estudos (em alguns estudos essa informação não está especificada). A genotipagem do hospedeiro incluiu diferentes microarranjos Affymetrix e Illumina, com coberturas variando de 16.753 SNPs a 8 milhões de SNPs.

Em geral, as ferramentas de análises de associação empregadas para procurar associações com SNPs e abundância relativa de táxons específicos e/ou diversidade foram: regressão logística, regressão linear, modelos lineares generalizados. O pacote estatístico utilizado pela maioria dos autores foi o software de acesso público R (R Core Team, Viena, Áustria).

As covariáveis mais utilizadas na análise multivariada foram: idade, sexo, IMC e grupos de alimentos ou dieta. Também foram incluídas como covariáveis,

as informações sobre a coleta, como: procedimento de alíquota, ano de extração, número de sequências por amostra, pessoa que realizou a amostra, pessoa que extraiu o DNA, lote de genotipagem, método de coleta (postal ou visita), dentre outros. Outro ajuste utilizado pelos autores incluídos na revisão são componentes principais (PCA) do genótipo, que variava de 2 a 10 componentes, utilizado para ajustar ancestralidade genômica e reduzir do viés de estratificação populacional.

Os valores de p para as análises de associação entre variantes genéticas e o desfecho consideram um nível de significância de 0,05, chamado valor nominal. Entretanto, algumas associações não alcançaram o limiar de significância e, portanto, os autores utilizam uma correção por múltiplos testes, e nessas situações, os valores de variaram entre $P < 1,57 \times 10^{-10}$ e $P < 1 \times 10^{-5}$. Alguns genes principais encontrados nos estudos incluídos nesta revisão, bem como suas funcionalidades, estão descritos a seguir na Tabela 1.

Variantes genéticas próximas ao gene *PLD1* (Davenport et al., 2015), associado anteriormente ao IMC em população afro-americana (Ng et al., 2012) e também à abundância de *Akkermansia muciniphila*, que demonstrou ser protetora contra o desenvolvimento de obesidade em camundongos.

O estudo de J. K. Goodrich et al. (2016b) apontou variantes genéticas do hospedeiro próximas aos genes *LCT* e *CD36*. Variantes genéticas no gene *LCT* estão relacionadas à abundância de *Bifidobacterium*. Uma vez que essas bactérias são membros do intestino grosso e metabolizam a lactose, aqueles organismos que codificam a lactase abrigam níveis mais baixos de bifidobactérias, devido à baixa disponibilidade do carboidrato, enquanto aqueles indivíduos que consomem produtos lácteos fornecem relativamente mais lactose às Bifidobactérias.

Essa associação também foi encontrada nos estudos de Lopera-Maya et al. (2022a), Y. Qin et al. (2022), Bonder et al. (2016), Blekhman et al. (2015), Rühlemann et al. (2021) e A. Kurilshikov et al. (2021). Em todos estes estudos, a associação entre o locus *LCT* e o gênero *Bifidobacterium* foi a associação mais forte. (A. Kurilshikov et al., 2021) citado demonstrou a heterogeneidade étnica e a relação da associação *LCT*-*Bifidobacterium* com a idade, sendo o efeito mais fraco encontrado em crianças e adolescentes (consistente com Coluccia et al. (2019)) e o efeito mais forte, em uma coorte hispânica composta por indivíduos

de etnia hispânica/latino-americana e revela maior prevalência de genótipo de intolerância à lactose.

Outro achado no estudo de J. K. Goodrich et al. (2016b) e que, segundo os autores, necessita de validação, é a associação entre a genética do hospedeiro (variantes genéticas do *CD36*) com a abundância de *Akkermansia*. Variante genética do *CD36* foi relatada como, possivelmente, contribuinte para a patogênese de distúrbios metabólicos, como diabetes melito e obesidade (Silverstein & Febbraio, 2010).

Ishida et al. (2020) encontraram associação entre variantes genéticas próximas ao gene *HS3ST4* e a abundância de *Faecalibacterium* em indivíduos adultos japoneses do sexo masculino, mas essa associação enfraqueceu ao ajustar a análise para algumas covariáveis (como idade, “sopa consumida com macarrão” e potássio). Além disso, o mecanismo de relação entre a variante do gene e a microbiota intestinal ainda deve ser esclarecida. A associação encontrada com outros três loci (2p16.1, 10p15.1 e 18q12.2) também permaneceu incerta. Neste estudo nenhuma variante genética foi fortemente associada a microbiota intestinal, portanto os autores propõem que a composição da microbiota intestinal japonesa é amplamente poligênica, ou seja, vários genes interagem, cada um com um efeito aditivo sobre o outro (Awany et al., 2019).

Lopera-Maya et al. (2022a) e Y. Qin et al. (2022) além de encontrarem associação com variantes genéticas do hospedeiro próximas ao gene *LCT*, assim como Goodrich e colaboradores (2016), também encontraram associação com variante genética próxima a *ABO*. Este gene codifica uma glicosiltransferase relacionada ao sistema histo-sangue. A variação neste gene é a base do grupo sanguíneo ABO, portanto, a presença de um alelo determina o grupo sanguíneo em um indivíduo. Essas associações foram: indivíduos com sangue tipo O tiveram a maior abundância das espécies de *Bifidobacterium bifidum*, enquanto a abundância de *Collinsella aerofaciens* foram observadas em indivíduos com tipo sanguíneo do tipo A. Algumas doenças infecciosas são associadas ao tipo sanguíneo do hospedeiro, como doenças infecciosas como Úlcera péptica associada ao *Helicobacter pylori*, Infecção por *Escherichia coli*, doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral isquêmico por exemplo (Mourant, Kopec, & Domaniewska-Sobczak, 1978),

doenças que também estão relacionadas a disbiose da microbiota intestinal e, portanto, merecem maior atenção para futuras explorações (Witkowski, Weeks, & Hazen, 2020). Qin e colaboradores (2022) também encontraram associação entre a genética do hospedeiro (variante genética *MED13L*), foi sugerido que este gene pode ligar-se a um oncogene para câncer colorretal, ativando a tumorigênese do cólon. No estudo de Rühlemann et al. (2021) também foram encontradas associações com a variante genética *ABO*, uma associação univariada com um sinal para abundância diferencial com OTU pertencente a *Faecalibacterium*, acompanhada da proteína 4 do locus de excesso (*SURF4*). E uma segunda associação entre o SNP rs8176632 e o aumento da prevalência de uma OTU *Bacteroides*.

No estudo de J. Wang et al. (2016) foi encontrada associação da composição da microbiota intestinal com a variante genética próxima ao gene *VDR*, que codifica o receptor de Vitamina D. Para melhor compreensão, os autores exploraram a associação em um modelo animal e descobriram que a perda de *VDR* afeta substancialmente a diversidade beta (variação de 42% na dissimilaridade de Bray-Curtis - diversidade beta - explicada neste cenário controlado) (Jin et al., 2015). J. Wang et al. (2016) também encontraram associação entre variante genética *SLC2A9* (gene importante para manter a homeostase da glicose) e a abundância de *Porphyromonadaceae* não classificada (Phay, Hussain, & Moley, 2000).

Scepanovic et al. (2019) replicaram associações anteriores encontradas no estudo de Bonder et al. (2016) e encontraram em sua amostra de indivíduos adultos, uma associação entre o SNP rs7856187 e a família *Lachnospiraceae*. Por outro lado, não encontraram associações com o SNP rs4988235, variante genética próximo ao gene *MCM6*, relatado anteriormente como fortemente associado ao microbioma intestinal (J. K. Goodrich et al., 2016b; Lopera-Maya et al., 2022a; Y. Qin et al., 2022).

F. Xu et al. (2020) não encontraram nenhuma associação significativa entre as variantes genéticas do hospedeiro com os táxons do microbiota intestinal que sobrevivessem à correção de Bonferroni estabelecida pelos autores. Foi encontrada uma associação nominal entre as variantes genéticas do gene *STPG2* com *Clostridiales*.

No estudo de Bonder et al. (2016), além da associação com variantes genéticas próximas a *LCT*, também associou-se ao microbioma intestinal o SNP rs2155219, localizado no locus C11orf30-LRRC32, que tem sido relacionado a vários fenótipos ligados ao sistema imunológico, incluindo alergias e doença inflamatória intestinal e a abundância de *C. comes*. e de Proteobactérias. Também foi encontrada associação com um SNP associado à distribuição de gordura corporal (rs2294239), que afeta a expressão de variantes genéticas próximas a *ZNRF3*. Esta variante regula negativamente a sinalização em células que atuam como supressor tumoral no câncer gástrico (Zhou et al., 2013).

No estudo de Hughes et al. (2020) foram encontradas associações significativas com duas variantes genéticas: *RAPGEF1* e *LINC01787*. Associado a *Ruminococcus*, o gene *RAPGEF1* codifica um fator proteico que provavelmente está envolvido na regulação da fisiologia do TGI. Os receptores acoplados à proteína G, que transduzem o fator proteico do gene, detectam metabólitos derivados de bactérias comensais e têm sido propostos como mediadores-chave das interações microbioma-hospedeiro (Cohen et al., 2017). A outra associação com o microbioma intestinal (abundância de *Coprococcus*) e a variantes genéticas do gene *LINC01787*, mostrou que indivíduos heterozigotos do alelo de referência eram menos propensos a ter *Coprococcus* em sua amostra.

Tabela 1. Descrição dos genes e fenótipos associados encontrados na revisão.

Genes	Nome do gene	Fenótipos associados	Funcionalidade	Estudos onde foram observados
<i>PLD1</i>	Phospholipase D1	Abundância do gênero <i>Akkermansia</i>	Papel na transdução de sinal e no tráfego subcelular	Davenport et al. (2015)
<i>OXR1</i>	Oxidation resistance 1	Abundância de espécies da família <i>Prevotellaceae</i> e <i>Prevotella</i> e correlacionado negativamente com bacteroides	Papel na ativação da atividade da oxidoreductase e na resposta ao estresse oxidativo	Liu et al. (2021)
<i>LCT</i>	Lactase	Abundância de <i>Bifidobacterium</i>	Codifica a lactase, enzima que hidrolisa a lactose no TGI superior	(Blekhman et al., 2015; Bonder et al., 2016; J. K. Goodrich et al., 2016a; Hughes et al., 2020; Alexander Kurilshikov et al., 2021; Lopera-Maya et al., 2022a; Y. Qin et al., 2022; Rühlemann et al., 2021)
<i>CD36</i>	CD36 molecule	Abundância de <i>Blautia</i>	Envolvido na detecção de gordura na língua e na promoção da absorção de ácidos graxos de cadeia longa no intestino	J. Goodrich et al. (2016)
<i>HS3ST4</i>	Heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 4	Abundância de <i>Faecalibacterium</i>	Codifica a enzima sulfato de heparan D-glucosaminil 3-O-sulfotransferase 4, esta enzima é usada como um receptor pelo vírus herpes simplex tipo 1	Ishida et al. (2020)

<i>TRAM1L1</i>	Translocation associated membrane protein 1 like 1	Abundância de <i>Coprococcus comes</i>	Envolvido na inserção de proteínas na membrana de retículo endoplasmático	Freidin et al. (2021)
<i>ABO</i>	<i>ABO</i>	Abundância de <i>Bifidobacterium bifidum</i> Abundância de <i>Collinsella aerofaciens</i>	Codifica proteínas relacionadas ao primeiro sistema de grupo sanguíneo descoberto (<i>ABO</i>)	Lopera-Maya et al. (2022a); Y. Qin et al. (2022)
<i>MED13L</i>	Mediator complex subunit 13L	Abundância de <i>Enterococcus faecalis</i>	A proteína codificada por este gene está envolvida no desenvolvimento inicial do coração e do cérebro	Y. Qin et al. (2022)
<i>VDR</i>	Vitamin D receptor	Abundância de <i>Parabacteroides</i>	Codifica o receptor de vitamina D	J. Wang et al. (2016)
<i>BLVRA</i>	Biliverdin reductase A	Abundância de <i>Barnesiella</i>	Inibição da expressão do gene toll-like receptor 4	Rühlemann et al. (2021)
<i>RAPGEF1</i>	Rap guanine nucleotide exchange factor 1	Abundância de <i>Ruminococcus</i>	Codifica um fator proteico que transduz sinais de receptores acoplados à proteína G	Hughes et al. (2020)
<i>LINC01787</i>	Long intergenic non-protein coding RNA 1787	Abundância de <i>Coprococcus</i>		Hughes et al. (2020)

<i>CNTN6</i>	Contactin 6	Abundância de <i>Faecalibacterium</i>	Proteína de membrana neuronal ancorada por glicosilfosfatidilinositol que funciona como uma molécula de adesão celular, pode desempenhar papel na formação de conexões axônicas no sistema nervoso em desenvolvimento	Turpin et al. (2016)
<i>DMRTB1</i>	DMRT like family B with proline rich C-terminal 1	Abundância de <i>Lachnospira</i>	Previsto para estar envolvido no desenvolvimento de células germinativas, regulação da transcrição pela RNA polimerase II e diferenciação sexual	Turpin et al. (2016)
<i>SALL3</i>	Spalt like transcription factor 3	Abundância de <i>Eubacterium</i>	Papel no desenvolvimento embrionário, pode ter um papel na oncogênese	Turpin et al. (2016)
Próximo gene <i>UBR3</i>	-	Abundância de <i>Rikenellaceae</i>		Turpin et al. (2016)

Para abordar a causalidade entre microbiota intestinal, alguns autores realizaram randomização mendeliana (RM). A RM é um método para estimação de efeitos causais utilizando variantes genéticas como variáveis instrumentais (Bowden, Davey Smith, & Burgess, 2015; Bowden, Davey Smith, Haycock, & Burgess, 2016). As diferentes aplicações da RM nos estudos incluídos na revisão foram: exploração da relação genética entre microbiota intestinal e hábitos alimentares, doenças autoimunes, doenças cardiometabólicas e fatores de risco relacionados (Lopera-Maya et al., 2022b); microbiota intestinal e doenças e fenótipos nutricionais (Kurilshikov et al., 2021), doença inflamatória intestinal (Rühlemann et al., 2021) e doenças humanas complexas (como diabetes melito, fibrilação atrial, doença arterial coronariana, doença renal crônica, doença de Alzheimer, câncer colorretal e câncer de próstata) (F. Xu et al., 2020).

Dois trabalhos, além de genes, exploraram o escore de risco poligênico (ERP ou PRS do inglês *polygenic risk score*). O ERP é uma estimativa do risco genético de um indivíduo para algum traço, obtido pela agregação e quantificação do efeito de muitas variantes comuns (geralmente definidas como frequência do alelo menor $\geq 1\%$) no genoma, cada um dos quais pode ter um pequeno efeito no risco genético de uma pessoa para uma determinada doença ou condição.

Avaliando 1.736 adultos (média de idade: 59 anos) da coorte TwinsUK (Freidin et al., 2021), os autores propuseram avaliar a relação causal entre bactérias de interesse (*Coprococcus comes*) e dor musculoesquelética crônica generalizada (DMC). Freidin e colaboradores observaram que o melhor ERP em termos de capacidade preditiva da bactéria *Coprococcus comes* compreendeu 895 SNPs com valor $P < 5e-03$ e $R^2 = 0,157$. Entretanto, as classes de DMC previstas não foram preditivas dos níveis de *Coprococcus comes*. Os resultados sugerem que nem *C. comes* nem DMC são provavelmente fator causal um para o outro. Noutro estudo, Xu e colaboradores (F. Xu et al., 2020) construíram um escore poligênico para investigar se existiria uma base genética do hospedeiro subjacente à diversidade alfa das espécies Clostridiaceae e Comamonadaceae, usando as variantes genéticas que mostraram significância sugestiva. O escore poligênico não foi associado estatisticamente ao índice de diversidade alfa.

Os dados provenientes dos estudos selecionados para a presente revisão não contemplam a gama multiétnica que podem estar envolvida na variabilidade dos resultados. Por exemplo, naqueles estudos que informaram a ancestralidade de seus participantes, quatro apresentavam ancestralidade europeia (Bonder et al., 2016; Scepanovic et al., 2019; Turpin et al., 2016; J. Wang et al., 2016) e dois, ancestralidade asiática (Ishida et al., 2020; Liu et al., 2021). Os demais estudos não disponibilizaram essa informação. Podemos identificar com isso, a escassez de estudos em populações diversificadas. Considerando que o Brasil é um país com população altamente miscigenada, é necessário compreender as influências genéticas em fenótipos relacionados ao microbioma intestinal na população brasileira para ajudar numa melhor e mais eficaz identificação de fatores que estão associados aos determinantes. Os estudos incluídos também apresentaram bastante variação no tamanho amostral. Este é um fator muito importante para estudos de associação e uma limitação de estudos de GWAS, pois há dificuldade para se obter um tamanho de amostra necessário para mostrar certo poder estatístico, além de ser evidente a escassez de estudos com adolescentes.

Em nossa busca encontramos apenas uma meta-análise, que compilou estudos de GWAS (A. Kurilshikov et al., 2021), porém houve grande heterogeneidade nos dados dos estudos de coortes incluídos, por terem sido utilizadas técnicas diferentes de extração de DNA e em regiões diferentes do 16sRNA, dificultando a comparação entre os trabalhos. Algumas características contribuem para as diferenças observadas. Nos estudos selecionados foram usadas como covariáveis: idade, sexo, IMC, dieta, dados sobre a extração de DNA e dados da coleta (como procedimento de alíquota, o ano de extração, o ano da alíquota, a pessoa que realizou a coleta da alíquota, a placa de preparação da biblioteca) e componentes principais (PCA) genéticos. O PCA consiste numa técnica estatística que busca reduzir um conjunto original de variáveis, independentes entre si, em uma menor quantidade de variáveis que ao final, expliquem a máxima quantidade de variação total associada ao conjunto original (Meyer, 2007).

Os resultados encontrados após esta revisão sistemática, indicam que o microbioma intestinal apresenta uma tendência a ser influenciado pela genética do hospedeiro.

Quadro 2. Resumo dos artigos selecionados para revisão entre associação de aspectos genéticos do hospedeiro humano e composição do microbioma intestinal.

Descrição Autor/Ano	Amostra/idade	Exposição	Desfecho	Metodologia analítica e covariáveis	Principais resultados	Observações
Davenport, et al. 2015 EUA	Indivíduos com idade maior que 16 anos n = 91 verão n = 93 inverno n = 57 ambas estações	A genotipagem em 1.415 indivíduos foi realizada usando o Affymetrix 500k Array Set, o Genome-Wide Human SNP Array 5.0, ou o Genome-Wide Human SNP Array 6.0. Um total de 211.319 SNPs na análise de inverno, 210.924 SNPs na análise de verão e 212.153 SNPs na análise de “estações combinadas” foram examinados.	A região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada e sequenciada a partir de amostras fecais. Todos os táxons bacterianos presentes no nível de gênero em cada amostra foram usados para calcular as métricas de diversidade alfa (riqueza, diversidade de Shannon e uniformidade).	Covariáveis: Idade, sexo, data de coleta. O GEMMA (v0.94) foi usado para realizar GWAS nos resíduos, incluindo as matrizes de relacionamento. A “Chip heritability” foi calculada para os resíduos de cada táxon usando GEMMA v0.94.	Nenhuma variante ultrapassou o limite de P em nenhuma das análises, mas apresentou associações sugestivas ou nominais. Não houve associações significativas com as métricas de diversidade alfa em nenhuma das análises. Em um valor de corte de $q < 0,05$, a abundância de gênero <i>Bifidobacterium</i> foi significativamente inversamente correlacionada com a idade nas amostras de inverno.	Aproximadamente 10-13% dos táxons bacterianos em cada estação têm estimativas de “herdabilidade de chip” diferentes de zero, sugerindo que uma porção do microbioma é hereditária.
Blekhman et al., 2015 Estados Unidos da América	93 indivíduos	O processamento dos arquivos de dados brutos por meio da etapa de genotipagem foi realizado no cluster de computação do Broad Institute	Sequenciamento <i>shotgun</i> metagenômico realizado pelo Projeto Microbioma Humano	Covariáveis: Número de sequências por amostra, lote de amostra, execução de sequenciamento, a pessoa que extraiu o DNA, o sexo, a idade e os três primeiros PCs do	Foi encontrada correlação entre a variação genética do hospedeiro em SNPs no gene <i>LCT</i> e a abundância de <i>Bifidobacterium</i> no trato GI ($P = 1,16 \times 10^{-5}$).	-

		O número final de SNPs utilizados para a análise de associação foi de 1.310.141.		Dimensionamento multidimensional		
				Foram calculadas diversidade alfa e beta (sem especificação de índice).		
Bonder, et al. 2016 Holanda Letters	1.514 participantes de 3 coortes alemãs. 636 homens e 903 mulheres, faixa etária de 18 a 84 anos	Os indivíduos foram genotipados usando o HumanCytoSNP-12 BeadChip e o ImmunoChip, um array personalizado da Illumina Infinium. No total, este estudo testou associações para 8,1 milhões de SNPs na análise do genoma.	Sequenciamento <i>shotgun</i> do metagenoma a partir de amostras fecais. O perfil da composição microbiana foi determinado usando MetaPhlan 2.2, que relatou a abundância de 1.772 taxonomias microbianas nos dados, incluindo 21 filos, 32 classes, 50 ordens, 108 famílias, 235 gêneros e 678 espécies de quatro domínios diferentes.	Covariáveis: Não especificado. Análise dos locos <i>LCT</i> : foram avaliadas especificamente o efeito recessivo do SNP funcional rs4988235 no locus <i>LCT</i> dividindo os indivíduos em um grupo deficiente em <i>LCT</i> (genótipo GG) e um grupo eficiente em <i>LCT</i> (genótipo AA ou AG). A abundância microbiana foi comparada entre os dois grupos usando o teste de correlação de Spearman. Foi calculada a correlação de Spearman entre o consumo de	58 SNPs em nove loci foram associados a táxons microbianos. A associação taxonômica mais forte foi observada para o gênero <i>Blautia</i> e a família <i>Methanobacteriaceae</i> , para os quais a herdabilidade substancial foi relatada em estudos com gêmeos. Um grande bloco associado é uma região intergênica, localizada a montante do gene <i>LINGO2</i> .	-

				produtos lácteos e a abundância de Bifidobacterium em grupos de indivíduos com deficiência e eficiência de LCT separadamente.		
Goodrich et al., 2016 Estados Unidos da América	2.731 indivíduos gêmeos da coorte TwinsUK	O número final de SNPs usados nas análises de associação do genoma foi de 1.300.091. * Para pares de gêmeos MZ com apenas um gêmeo genotipado, essa informação de genótipo foi usada para ambos os gêmeos.	Extração de DNA, amplificação da região hipervariável V4 do gene 16S rRNA a partir de amostras fecais. Foram obtidos 945 traços de microbioma, incluindo 782 OTUs, 73 gêneros, 43 famílias, 21 ordens, 17 classes e 9 filos.	Covariáveis: Número de sequências do gene 16S rRNA por amostra, idade, sexo, data de envio, método de coleta (postal ou visita), ID do técnico que realiza a extração de DNA. Foi validada a associação entre Bifidobacterium e LCT relatada por Blekhman et al. (Valor P de permutação LCT <0,001). GEMMA (v0.94) foi usado para calcular uma matriz de parentesco entre indivíduos e para realizar um GWAS nos resíduos para cada táxon, métrica de diversidade alfa e os primeiros 3 PCs de PCoA	Ao usar o conjunto de dados completo, nenhuma associação alcançou significância em todo o estudo (correção para todos os testes). O sinal GWA mais forte entre os 20 táxons hereditários usados na análise do conjunto de genes foi o "Clostridiaceae não classificado" com SNP rs10055309 no gene <i>SLIT3</i> . A análise do conjunto candidato revelou uma associação entre Bifidobacterium e um SNP dentro do gene <i>RABGAP1</i> , que está em desequilíbrio de ligação (LD) com variantes em LCT.	Foi replicada uma associação entre Bifidobacterium e o locus do gene da lactase (LCT) e identificada uma associação entre o gene hospedeiro <i>ALDH1L1</i> e a bactéria SHA-98, sugerindo uma ligação entre a produção de formato e a pressão arterial. A análise de herdabilidade revelou que 5,3% dos táxons tinham uma herdabilidade superior a 0,2 com intervalos de confiança de 95% que não se sobrepunham a zero.

				em cada uma das métricas de diversidade.		
Turpin et al., 2016 Canadá Letters	1.561 indivíduos saudáveis - parte do Projeto Genético Ambiental Microbiano (GEM) Subconjunto de 270 indivíduos relacionados (principalmente irmãos) de 123 famílias desta coorte foram usados para estimar a herdabilidade do microbioma	Genotipagem de SNP com o chip HumanCoreExome-12v1.1 (Illumina). GWAS de 3.727.707 SNPs com 166 táxons bacterianos não redundantes	Amostras de fezes foram coletadas para sequenciamento de DNA ribossômico 16S e a região V4 foi amplificada. Foram obtidos 3 filos dominantes (<i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> e <i>Actinobacteria</i>) e 127 gêneros. Identificação de polimorfismos genéticos associados à abundância relativa dos táxons hereditários. A diversidade alfa bacteriana foi estimada usando Chao1, Shannon e índices de diversidade filogenética de árvore inteira.	Covariáveis: Idade, sexo e os três principais componentes genéticos. As OTUs com prevalência <5% foram removidas da análise. Para avaliar a herdabilidade poligênica (H2r) foi usado o software Sequential Oligogenic Linkage Analysis Routines (SOLAR) 40 v 6.6.2. H2r foi ajustado para idade e sexo.	GWAS encontrou 58 associações que atingiram o limiar de significância de todo o genoma ($P < 5 \times 10^{-8}$). Quatro loci foram replicados em uma segunda coorte de 463 indivíduos: rs62171178 (gene mais próximo <i>UBR3</i>) associado a Rikenellaceae, rs1394174 (<i>CNTN6</i>) associado a <i>Faecalibacterium</i> , rs59846192 (<i>DMRTB1</i>) associado quatro loci foram replicados em uma segunda coorte de 463 indivíduos: rs62171178 (gene mais próximo <i>UBR3</i>) associado a Rikenellaceae, rs1394174 (<i>CNTN6</i>) associado a <i>Faecalibacterium</i> , rs59846192 (<i>DMRTB1</i>) associado com <i>Lachnospira</i> , e rs28473221 (<i>SALL3</i>) associado a Eubactéria.	A análise de herdabilidade da microbiota mostrou que fatores genéticos aditivos contribuíram para a abundância de 94 de 249 táxons bacterianos totais (0,25 < herdabilidade poligênica (H2r) < 0,66, $3,2 \times 10^{-6} < P < 0,05$).

<p>Wang, et al. 2016 Alemanha</p>	<p>1.812 indivíduos de duas coortes (PopGen e Food-Chain Plus; FoCus). *coortes também utilizadas no estudo de Kurilshikov et al.</p>	<p>As amostras PopGen foram digitadas nos arrays Affymetrix 6.0, Affymetrix Axiom, Illumina 550k, Illumina ImmunoChip e Illumina MetaboChip e as amostras FoCus foram digitadas no Illumina ImmunoChip personalizado e no Omni Express Exome. No total, 17.017.474 variantes de nucleotídeo único (SNVs) foram incluídas para a coorte PopGen e 17.340.550 SNVs foram incluídas para a coorte FoCus.</p>	<p>Foram gerados dados de sequência do gene 16S rRNA de alta qualidade, visando as regiões hipervariáveis V1–V2. Para cada uma das amostras, foram gerados dados de sequência do gene 16S rRNA de alta qualidade, resultando em um total de 38 e 374 filões e gêneros identificados, respectivamente. Em ambas as coortes, as medidas de diversidade beta com base na composição em nível de gênero foram geradas usando a função 'vegdist' (dissimilaridades de Bray-Curtis e Jaccard).</p>	<p>Covariáveis: Idade, sexo, IMC e tabagismo e principais componentes nutricionais ou grupos de alimentos derivados de padrões de dieta. As análises foram realizadas em ambas as coortes separadamente. Para identificar a variação genética associada à abundância, foi realizado um GLM com distribuição binomial negativa e link de log.</p>	<p>A análise mostrou 42 loci associados à diversidade beta. Desses loci, 21 puderam ser replicados com sucesso em uma coorte menor e independente composta por indivíduos obesos. As duas coortes exibiram abundância de táxons semelhantes em níveis taxonômicos alto e baixo, embora pequenas diferenças na diversidade beta (Bray-Curtis) estivessem presentes entre as coortes ($r^2 = 0,026$; $P = 1 \times 10^{-3}$) devido a diferenças de idade, IMC e razão sexual.</p>	<p>-</p>
<p>Scepanovic, et al.</p>	<p>858 adultos participantes de uma coorte com</p>	<p>Após a extração do sangue, o DNA foi</p>	<p>Sequenciamento da região V3-V4 do gene</p>	<p>Covariáveis: Variáveis não genéticas como dados demográficos,</p>	<p>Não foram encontradas associações entre número de</p>	<p>-</p>

2019	idade entre 20 e 70 anos.	genotipado em 719.665 SNPs.	16S rRNA, a partir de amostras fecais.	sociais, comportamentais e nutricionais.	polimorfismos e fenótipos de diversidade.	
França		16.753 SNPs	Com base nas OTUs, foram calculados dois tipos de indicadores de diversidade microbiana: índices de diversidade alfa (índice de diversidade de Simpson, riqueza observada, estimativa de riqueza Chao1 e ACE) e beta (matrizes de dissimilaridade composicional Jaccard (não ponderada), Bray-Curtis (pesado) e filogenético Unifrac (ponderado).	Foi realizado um GWAS usando as quatro métricas de diversidade alfa e os três índices de diversidade beta como resultados fenotípicos para testar associações com SNP. A regressão linear foi usada para procurar associações com abundância relativa de táxons específicos.	Um total de 170 associações sugestivas foram detectadas com o fenótipo abundância relativa de 53 táxons, e 65 SNPs sugestivos foram detectados com o fenótipo presença/ausência de 23 táxons. Firmicutes e Proteobacteria foram detectados em todos os indivíduos, e Bacteroidetes em todos, exceto um. Firmicutes foi o filo dominante na grande maioria dos indivíduos (91,8%).	
Hughes, et al.	2.223 indivíduos da coorte Flemish Gut Flora Project.	Um total de 2.646 indivíduos foram processados em duas matrizes diferentes - o Human Core Exome v1.0 e o Human Core Exome v1.1, que incluíram medições repetidas.	A região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada e sequenciada a partir de amostras fecais. As estatísticas de alfa diversidade usadas foram: número de contagens diferentes	Covariáveis: componentes principais derivados do genótipo 1-10, sexo previsto do genótipo, idade e covariáveis técnicas*. Associações entre variantes genéticas e traços microbianos	A associação mais forte foi entre <i>Ruminococcus</i> e rs150018970, uma variante a montante do gene <i>RAPGEF1</i> no cromossomo 9. A segunda associação foi <i>Coprococcus</i> (P/A) e rs561177583 no cromossomo 1, situado no íntron do RNA não codificador de proteínas <i>LINC01787</i> .	A herdabilidade variou de 0 a 0,47, com 13 dos 157 traços microbianos contínuos e binários testados exibindo estimativas diferentes de zero.
2020						
Bélgica	Para o GWAS, foram incluídos indivíduos adultos de 2					

	coortes alemãs (FoCus e PopGen)	499 táxons em cinco níveis da filogenia da microbiota do filo ao gênero.	de zero observadas em todos os táxons de nível de gênero, diversidade de Shannon e Chao. A diversidade beta foi estimada usando uma análise de escala multidimensional não métrica de dois eixos.	específicos foram identificadas por ajuste de regressões linear (abundância + alfa diversidade), logística (presença/ausência), multinomial (diferentes tipos de composição da comunidade) e multivariada (diversidade beta) assumindo um modelo genético aditivo e contabilização da incerteza do genótipo.		
Ishida, et al. 2020 Japão	1.068 adultos saudáveis (com idades entre 20 e 64 anos)	Os indivíduos foram genotipados no Infinium OmniExpress-24+ BeadChip ou Human OmniExpress-24+ BeadChip (Illumina).	DNA extraído de amostras fecais, sequenciamento subsequente da região V3-V4 do gene 16S rRNA bacteriano e processamento de dados das sequências. Foram usadas abundância relativa de gêneros; diversidade alfa através dos índices: Chao1 e Shannon e diversidade	Covariáveis: Sexo, idade e os dois primeiros componentes principais dos dados genotípicos do hospedeiro. Para as abundâncias relativas dos gêneros e os índices de diversidade alfa, utilizou-se um modelo de regressão linear implementado no PLINK versão 1.9 sob a suposição de efeitos aditivos dos alelos. Para o índice de diversidade beta, o pacote de	Apenas dois táxons foram considerados hereditários nas amostras japonesas (Faecalibacterium e Christensenellaceae) Nenhum loci atingiu o nível de significância do genoma de $P < 8,9 \times 10^{-8}$. Foi realizada estratificação por sexo e cinco loci apresentaram associações significativas nunca antes relatadas em GWASs europeus. A abundância de Prevotella foi associada ao locus 2p16.1 em	O locus HS3ST4 foi associado à abundância de Faecalibacterium (rs3803713, $P = 8,29 \times 10^{-8}$) em indivíduos do sexo masculino.

			<p>filogenética, além de diversidade beta com base na distância UniFrac ponderada.</p>	<p>software, microbiomeGWAS49, foi usado para testar as associações.</p> <p>A herdabilidade do SNP foi estimada pelo cálculo da porcentagem de variância explicada por SNPs de todo o genoma usando GEMMA v0.9426 em dados combinados por sexo.</p>	<p>indivíduos do sexo masculino (rs6545786). A inclusão de covariáveis reduziu ligeiramente o valor p de associação dos loci, mostrando um efeito nominalmente significativo da escala de fezes de Bristol.</p> <p>A abundância de <i>Oscillospira</i> foi associada ao locus 10p15.1 em indivíduos do sexo feminino (rs1033781) e apresentou um valor de p mais baixo sob um modelo dominante. Essa associação significativa pôde ser obtida apenas com a inclusão de covariáveis e escala de fezes de Bristol, frequência de evacuações e variáveis do café mostraram efeitos nominalmente significativos.</p>	
<p>Xu et al. 2020 China</p>	<p>1.475 participantes com idade entre 40 e 75 anos de idade.</p>	<p>O DNA foi extraído de leucócitos usando o TIANamp® Blood DNA Kit (DP348, TianGen Biotech Co, Ltd., China). A genotipagem foi realizada com matrizes Illumina ASA-750K.</p>	<p>A região V3-V4 do gene 16S rRNA foi amplificada a partir do DNA de amostras fecais.</p> <p>Para calcular a diversidade alfa foi usado os índices: índice de diversidade</p>	<p>Covariáveis: Cinco primeiros componentes genéticos principais de ancestralidade Idade Sexo</p> <p>PLINK 1.9 foi utilizado para realizar um modelo de regressão logística</p>	<p>Não foi encontrado nenhum loci significativo em todo o genoma no GWAS para possíveis associações entre a genética do hospedeiro e os enterótipos (<i>Prevotella</i> vs. <i>Bacteroides</i>). Nem houve nenhum sinal significativo da associação da genética do hospedeiro com diversidade alfa.</p> <p>Na avaliação da diversidade beta, foi descoberto que um locus no</p>	<p>Entre os táxons sugestivamente hereditários nesta coorte, <i>Paraprevotellaceae</i>, <i>Veillonellaceae</i>, <i>Desulfovibrionaceae</i>, <i>Pasteurellaceae</i>, <i>Odoribacter</i>, <i>Paraprevotella</i>, <i>Veillonella</i> e <i>Bifidobacterium</i> tiveram</p>

			<p>de Shannon, índices de diversidade Chao1 e o índice OTU observado e diversidade filogenética.</p> <p>Diversidade beta baseada na dissimilaridade Bray-Curtis.</p>	<p>para os dois enterótipos e táxons.</p> <p>Para a diversidade beta, a análise foi realizada usando o MicrobiomeGWAS. Para diversidade alfa, foi usada normalização Z-score para transformar a distribuição e realizaram análises com base em um modelo log-normal.</p> <p>Para realizar uma análise GREML, foi usada GCTA bivariada para estimar a correlação genética entre o microbioma intestinal e as características nos participantes.</p>	<p>gene <i>SMARCA2</i> (rs6475456) estava associado à diversidade beta em um nível significativo de todo o genoma ($p = 3,96 \times 10^{-9}$) - mas não foi possível replicar na coorte de replicação.</p> <p>No GWAS de descoberta, os autores encontraram 6 táxons associados a variantes genéticas do hospedeiro na coorte de descoberta ($p < 5 \times 10^{-8/n}$, onde n é o número efetivo de táxons independentes em cada nível taxonômico)</p> <p>Embora nenhuma das associações dessas variantes genéticas com taxa tenha sobrevivido à correção de Bonferroni ($p < 1 \times 10^{-4}$), descobriram que <i>STPG2</i>-rs4699323 teve uma associação nominalmente significativa ($p < 0,05$) com Clostridiales.</p>	<p>estimativas de herdabilidade nominalmente significativas na literatura anterior.</p>
<p>Freidin, et al. 2021</p> <p>Reino Unido</p>	<p>Amostra original: 1.736 Adultos pertencentes a coorte UK Adult Twin Registry (113 casos e 1623 controles)</p>	<p>Metanálise de GWAS de diferentes coortes</p> <p>4.841.651 SNPs.</p>	<p>O DNA genômico foi extraído a partir de amostras fecais, visando a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA.</p>	<p>Covariáveis: Idade, sexo, IMC, parentesco e covariáveis técnicas*.</p> <p>O GWAS foi feito usando o software GEMMA.</p>	<p>Não houve associação significativa em todo genoma nem para o metaGWAS para a bactéria nem GWAS para DMCG.</p> <p>Nove loci alcançaram um limiar de significância para <i>C. comes</i>, com o</p>	<p>Diversidade alfa foi significativamente menor nos casos de DMCG do que nos controles.</p> <p>O ASV que atingiu significância estatística</p>

	Amostra para metanálise para o GWAS (três coortes): 4.841.651 SNPs		Com base nas ASVs, foram calculadas diversidade alfa através dos índices Shannon e Simpson. Também foi avaliada a abundância do <i>Coprococcus Comes</i> (amplicons)	A análise de associação do microbioma intestinal com DMCG foi realizada usando modelos lineares no programa R. As contagens de ASV (variantes de sequência de amplificação) estabilizadas por variância foram usadas como variável de resposta em um modelo linear.	mais convincente no cromossomo 4, próximo ao gene <i>TRAM1L1</i> . Os resultados sugerem que nem <i>C. comes</i> nem DMC são provavelmente um fator causal para o outro.	após correção para testes múltiplos foi atribuído a <i>C. comes</i> , e teve uma abundância menor nos casos de CWP do que nos controles.
Kurilshikov, et al. 2021 Alemanha EUA Dinamarca Bélgica Canadá Países baixos Coreia Finlândia Israel Suécia Reino Unido Holanda	18.340 indivíduos (24 coortes, sendo 22 de adultos ou adolescentes e 2 com crianças. Vinte e duas coortes foram compostas por adultos ou adolescentes (N=16.632) e duas coortes por crianças (N=1.708))	Vinte e três das 24 coortes usaram o Michigan Imputation Server para imputação, usando o painel de referência HRC 1.0 ou 1.162. Devido a restrições na manipulação de dados, o estudo PNP empregou um pipeline interno para imputação, usando o software IMPUTE263,64 (v.2.3.2) e painel de referência 1000G com adição de genótipos de indivíduos	Perfis de sequenciamento do gene 16S rRNA a partir de amostras fecais, visando três regiões variáveis distantes (V1-V2, V3-V4 e V4). Diversidade alfa (índices de diversidade Simpson, Simpson inverso e Shannon). Para caracterizar os metadados de coorte	Covariáveis: não especificado. Correlação de Spearman entre dosagens de SNPs e métricas de diversidade alfa e para identificação de loci que afetam a abundância ajustada por covariáveis de táxons bacterianos. Para realizar a análise de mbBTL, usamos uma abordagem de dois estágios composta por triagem de correlação rápida seguida de análise de regressão	Ao verificar a diversidade alfa, não foram identificados acertos significativos no meta-GWAS ($P > 5 \times 10^{-8}$). Com os limites estritos da RM, não foi encontrada nenhuma evidência de relações causais entre os táxons do microbioma e as preferências alimentares. Foram identificadas variantes genéticas que mapearam 20 loci genéticos distintos associados à abundância de 27 táxons. Tanto no mapeamento mbQTL (níveis de abundância) quanto no mbBTL (presença/ausência), apenas um	-

		judeus pareados com população-população	para a composição do microbioma, foi usado um teste de análise de redundância baseado em distância no qual cada coorte representou uma amostra e as variáveis representaram abundâncias médias de gêneros na coorte correspondente	logística como um método robusto para características binárias GWAS. Análises bidirecionais de RM de duas amostras usando o pacote TwoSampleMR. Apenas pares suportados por três ou mais SNPs foram considerados.	dos 31 loci (LCT locus – Bifidobacterium, $P=8,63 \times 10^{-21}$) passou na correção estrita para o número de táxons testados. Sete dos nove táxons que mostraram a evidência mais forte de herdabilidade na coorte TwinsUK ($P < 0,01$) também têm mbTLs significativos em todo o genoma.	
Liu et al. 2021 China	620 indivíduos na coorte descoberta e 663 indivíduos na coorte replicada, como parte do esforço maior da coorte 4D-SZ	Sequenciamento de genoma completo (WGS) de amostras de sangue.	<i>Shotgun</i> Foram investigadas abundância relativa e associações entre variação genética e diversidade beta do microbioma, usando a ferramenta microbiomaGWAS. A diversidade foi calculada para o índice de Shannon, Bray-Curtis dissimilaridade com base na abundância relativa de taxa	Covariáveis: Gênero, idade, IMC, dieta e fatores de estilo de vida, forma de fezes, frequência de evacuação e os quatro principais PCs para contabilizar a estrutura populacional. Para detectar associações entre o microbioma intestinal e variantes genéticas específicas, primeiro foi testada associação por meio de modelo linear (logaritmo natural) ou logístico (presença/ausência)	Os cinco principais filos abundantes nesta coorte foram: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria e Actinobacteria. Foi encontrado que o alelo menor do SNP superior, rs13045408 em <i>BTBD3-LINC01722</i> , correlacionado positivamente com a abundância de Bacteroides e negativamente correlacionado com a abundância de Prevotella; por outro lado, o alelo menor do outro SNP rs1453213 em <i>OXR1</i> correlacionou-se positivamente com Prevotella e correlacionado negativamente	-

			microbiana em nível de gênero.	baseado na abundância de bactérias intestinais. A comparação da diferença de diversidade e composição da microbiota foi realizada por meio de teste não paramétrico (teste de Wilcoxon)	com Bacteroides. A análise entre beta diversidade e variação genética, foi encontrado que cinco loci com significância marginal em todo o genoma. Três SNPs, rs60689247 em <i>MAGI2</i> , rs7716962 em <i>XRCC4</i> e rs61823500 em <i>C1orf21</i> , estão localizados na região intrônica dos genes. Outros dois SNPs estão localizados em regiões intergênica dos genes <i>CDKN2AIP</i> e <i>TBC1D1</i> .	
Rühlemann et al., 2021 Alemanha Letters	8.956 indivíduos alemães de 5 coortes independentes de biobancos (PopGen, FoCus, SHIP, SHIP-TREND, KORA)	Genotipagem usando o Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 cobrindo 906.600 variantes genéticas. 44 associações significativas em todo o genoma com características microbianas e composição da comunidade envolvendo 38 loci genômicos	A amplificação de DNA do gene 16S rRNA bacteriano visando a região V1–V2 do gene. As estruturas estatísticas univariadas aplicadas tiveram como objetivo identificar associações genéticas com padrões de presença-ausência e abundância de clados microbianos.	Covariáveis: Idade, sexo, IMC e os dez primeiros componentes principais genéticos A diversidade alfa foi avaliada usando o número total de gêneros observados e o índice de diversidade de Shannon calculado no nível de gênero. A diversidade beta foi avaliada usando dissimilaridade de Bray–Curtis em nível de gênero.	A meta-análise mostra um claro pico de associação no locus <i>LCT</i> com 53 variantes exibindo valores de P inferiores ao limiar $P < 10^{-5}$ sugerido, com o menor para rs3820794.	-

				<p>Os resultados por coorte foram combinados em uma estrutura de meta-análise.</p> <p>Apesar de não atender aos critérios iniciais de inclusão, o gênero <i>Bifidobacterium</i> foi incluído na análise.</p>		
<p>Lopera-Maya, et al.</p> <p>2022</p> <p>Holanda</p>	<p>167.729 indivíduos de uma coorte (LifeLines) com um design exclusivo de três gerações.</p>	<p>A genotipagem de 38.030 participantes do LifeLines foi realizada usando a versão Infinium Global Screening Array MultiEthnic Diseases</p>	<p>Sequenciamento metagenômico de shotgun de DNA extraído de amostras de fezes.</p> <p>5 filós, 10 classes, 13 ordens, 26 famílias, 48 gêneros e 105 espécies</p>	<p>Covariáveis: Idade, sexo e matriz de relacionamento genético entre os participantes.</p> <p>Foram utilizadas abundâncias log-transformadas naturais que foram regredidas em um modelo linear misto usando SAIGE v.0.38</p> <p>Para analisar a correlação entre a herdabilidade baseada na família e o número de mbQTLs (loci de características quantitativas microbianas) sugestivos, foram usadas estimativas</p>	<p>Foram identificados 54 associações significativas envolvendo 40 loci e 22 características bacterianas.</p> <p>Das 22 características bacterianas, o maior número pertenceu a Firmicutes, seguido por Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria, em nível de filo.</p> <p>Entre as 54 associações robustas, o gene <i>SLC2A9</i> foi associado a Porphyromonadaceae não classificada (rs7656342).</p> <p>Além disso, vários RNAs não codificantes intergênicos longos estavam entre as 54 associações, incluindo a associação de <i>LINC01192</i> com Lactobacillales (rs62295801).</p>	<p>Os sete táxons associados ao locus <i>LCT</i> com significância genômica mostraram um sinal de associação mais forte quando usamos um modelo dominante.</p>

				de herdabilidade de sentido estrito para táxons e vias que representavam o compartilhamento do ambiente doméstico e derivadas anteriormente para esta coorte		
Qin, et al. 2022 Finlândia	5.959 homens e mulheres com idade entre 25 e 74 anos da coorte FINRISK	<p>A genotipagem foi realizada em matrizes SNP de todo o genoma da Illumina (o HumanCoreExome BeadChip, o Human610-Quad BeadChip e o HumanOmniExpress).</p> <p>Dados microbianos compostos por um total de 2.801 táxons, incluindo 59 filos, 95 classes, 187 ordens, 415 famílias, 922 gêneros e 1.123 espécies</p> <p>2.801 táxons microbianos e 7.967.866 variantes genéticas humanas</p>	<p>O microbioma intestinal foi caracterizado pelo sequenciamento metagenômico de <i>shotgun</i>.</p> <p>Abundância relativa de taxa.</p> <p>A diversidade alfa (índice de Shannon) e beta (distância de Bray-Curtis) foram calculadas a nível de gênero.</p>	<p>Covariáveis: Dez principais componentes genéticos principais, idade, sexo e lote de genotipagem</p> <p>No total, 213 espécies e 148 gêneros associados a pelo menos uma variante no nível de significância do genoma ($P < 1 \times 10^{-8}$) foram incluídos na RM.</p> <p>Foram usadas abundâncias relativas não transformadas, para melhor interpretabilidade.</p>	<p>Tanto no mapeamento mbQTL quanto no mbBTL, apenas um dos 31 loci (<i>LCT</i> locus – Bifidobacterium) passou na correção estrita para o número de táxons testados.</p> <p>As duas coortes exibiram abundância de táxons semelhantes em níveis taxonômicos alto e baixo, embora pequenas diferenças na diversidade beta estivessem presentes entre as coortes, devido a diferenças de idade, IMC e razão sexual.</p> <p>Indivíduos intolerantes à lactose (rs4988235:CC) que relataram uma dieta regular de laticínios tiveram um aumento significativo na abundância de <i>Bifidobacterium</i></p>	Indivíduos intolerantes à lactose (rs4988235:CC) que relataram uma dieta regular de laticínios tiveram um aumento significativo na abundância de <i>Bifidobacterium</i> .

3.2. Consumo de ultraprocessados e microbioma intestinal

A busca bibliográfica foi realizada em bases de dados eletrônicas (PubMed e Web of Science). A estratégia de busca baseou-se em descritores relacionados ao efeito do consumo de alimentos ultraprocessados (AUP) na microbiota intestinal humana. A seguinte chave de termos foi utilizada para a busca dos artigos: *((gastrointestinal microbiome) OR (gut microbiome) OR (gut microbiota)) AND ((diet) OR (industrialized food) OR (ultra-processed food*) OR (ready to eat meals) OR (fast food*))*. Não foram utilizados limites de data de publicação. Para serem elegíveis na seleção, os artigos deveriam avaliar a dieta em humanos, sem restrição de idade, sua relação com a microbiota intestinal.

Os critérios de exclusão foram:

- Capítulos de livros;
- Artigos do tipo editorial e/ou cartas ao editor, comentário de pesquisa;
- Estudos que realizassem análise dos alimentos com base nos seus componentes (macronutrientes, açúcar, densidade energética);
- Estudos com animais;
- Estudos *in vitro* e *in vivo*;
- Estudos em que o foco era exclusivamente, a descrição da composição da microbiota intestinal, sem considerar fatores que possam estar associados;
- Estudos com amostra de indivíduos com alguma condição de saúde (uso de antibióticos, cirurgia bariátrica, obesidade, atividade física, imunidade, função cognitiva) ou doença (diabete melito, síndrome metabólica, autismo, doença de Alzheimer, depressão, ansiedade, síndrome do intestino irritável...);
- Estudos com lactentes;
- Estudos com dietas específicas (cetogênica, dieta com alto ou baixo teor de gordura, dieta com alto ou baixo teor de proteínas, dieta sem glúten...);
- Estudos com atletas.

A seleção dos artigos foi feita a partir da leitura dos títulos e resumos encontrados na busca bibliográfica, segundo os critérios de elegibilidade. Após, foram selecionados os artigos que seriam lidos na íntegra para uma análise aprofundada. O fluxograma da seleção dos estudos está representado na Figura 4 e um resumo dos artigos selecionados para a revisão encontra-se no Quadro 3.

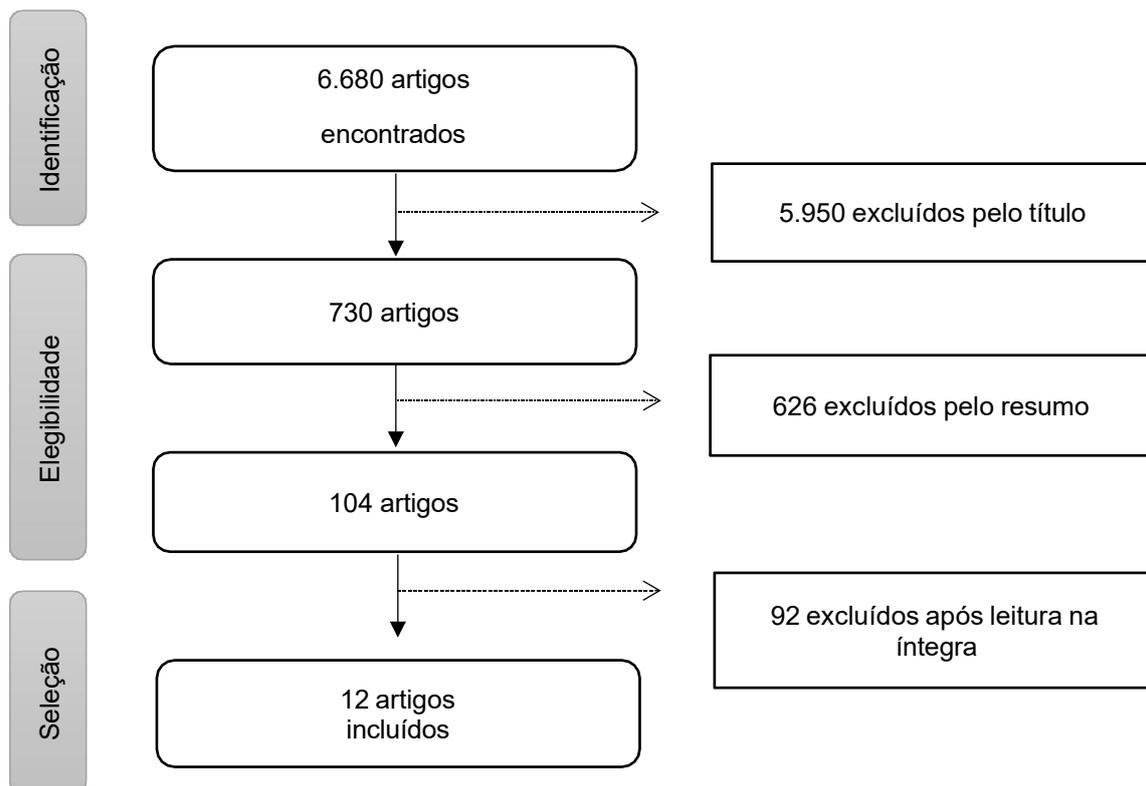


Figura 4. Fluxograma de seleção de artigos a partir da revisão bibliográfica da literatura.

3.2.1. Síntese dos achados

Dos 12 estudos incluídos, a maioria eram de delineamento transversal (Bolte et al., 2021; Cuevas-Sierra, Milagro, Aranaz, Martínez, & Riezu-Boj, 2021; Estrada-Velasco et al., 2014; Figge et al., 2021; Mitsou et al., 2017; Noh et al., 2021; Shikany et al., 2019), seguido de estudos de coorte (García-Vega Á, Corrales-Agudelo, Reyes, & Escobar, 2020; Park et al., 2021; Partula et al.,

2019). Além disso, foi encontrado um estudo experimental (O'Keefe et al., 2015), e um estudo do tipo ensaio clínico randomizado (Shin et al., 2019). O tamanho amostral variou entre 25 e 1.596 indivíduos, mediana de 359. Sete estudos possuíam amostra menor que 400 indivíduos.

Em relação a localização geográfica dos estudos incluídos na revisão, cinco estudos foram realizados no Continente Europeu, quatro estudos no Continente Americano, quatro no Continente Asiático, quatro no Continente Oceânico e um no Continente Africano. Quanto aos países, dois estudos foram realizados na Coreia (Noh et al., 2021; Shin, Sim, Lee, & Shin, 2016), um estudo foi realizado nos Estados Unidos da América (EUA) (Shikany et al., 2019), um no México (Estrada-Velasco et al., 2014), um na Grécia (Mitsou et al., 2017), um na França (Partula et al., 2019), um na Colômbia (Garcia-Ribera et al., 2020), um na Holanda (Bolte et al., 2021), um na Espanha (Cuevas-Sierra et al., 2021), um na Alemanha (Figge et al., 2021), um no Japão (Park et al., 2021) e por fim, um estudo foi realizado com população dos EUA e da África do Sul (O'Keefe et al., 2015). Os artigos selecionados foram publicados entre 2019 e 2021.

Com relação a faixa etária, apenas um estudo foi realizado com crianças e adolescentes e onze estudos foram realizados com adultos e idosos. Nos estudos com análises longitudinais (estudos de coorte e de experimentais), as idades variaram entre 18 e 80 anos (Park et al., 2021). Já nos estudos transversais, a idade mínima foi de 6 anos (Estrada-Velasco et al., 2014) e máxima, de 65 (Shikany et al., 2019).

A investigação do consumo alimentar foi realizada a partir de diferentes instrumentos: questionário de frequência alimentar (QFA) (Bolte et al., 2021; Cuevas-Sierra et al., 2021; Estrada-Velasco et al., 2014; Mitsou et al., 2017; Noh et al., 2021; Partula et al., 2019; Shikany et al., 2019), recordatório alimentares de 24 horas (García-Vega Á et al., 2020) e Questionário Breve de História da Dieta (Park et al., 2021). Para o estudo de intervenção (O'Keefe et al., 2015), os participantes consumiram uma dieta da intervenção por duas semanas (dieta ocidental, com alto teor de gordura e baixo teor de fibras) e, em outras duas semanas, consumiram uma dieta característica da região (com alto teor de fibras e baixo teor de gordura). Já no ensaio clínico randomizado (Shin et al., 2019), os participantes consumiram três diferentes tipos de dietas (dieta típica coreana, dieta americana típica e dieta americana recomendada), ao longo de 4 semanas

com período de *washout* de 2 semanas.

Foram encontrados dois métodos distintos para sequenciamento genético a partir de amostras fecais (ver seção 2.2). Três estudos realizaram sequenciamento de regiões hiper variáveis V3/V4 do gene 16sRNA (Cuevas-Sierra et al., 2021; Noh et al., 2021; Park et al., 2021), um visou a região hiper variável V4 (García-Vega Á et al., 2020), outro estudo realizou sequenciamento nas regiões V3/V5 (Partula et al., 2019), e ainda outro sequenciou a região hiper variável V1-V2 (Shin et al., 2019). No estudo de Noh e colaboradores (Noh et al., 2021) foram realizadas extrações de DNA e sequenciamento *shotgun*. Quatro estudos não especificaram a região amplificada (Figge et al., 2021; Mitsou et al., 2017; O'Keefe et al., 2015; Shikany et al., 2019).

A composição da microbiota intestinal foi analisada sob diversos parâmetros e níveis taxonômicos e, por essa razão, não houve homogeneidade quanto aos desfechos de interesse. Sete estudos avaliaram a abundância relativa de taxa (Bolte et al., 2021; Cuevas-Sierra et al., 2021; Estrada-Velasco et al., 2014; O'Keefe et al., 2015; Partula et al., 2019; Shikany et al., 2019). Entre os diferentes métodos utilizados, estavam: cálculo a partir das contagens totais, proporção (%) de OTU, riqueza observada, estimativa de riqueza Chao1, índice de Bray-curtis, fração média do sinal HITChip total (como proxy para abundância relativa) e uma fórmula: $2^{-\Delta Ct}$, onde UAR= Unidades de Abundância Relativa e $\Delta Ct = Ct \text{ primer específico} - Ct \text{ primer universal}$.

Quanto à diversidade alfa, foram analisados os parâmetros: Riqueza observada, Chao1 para estimar a riqueza (Chao, 1984), Diversidade de Pielou, número de OTUs observados, Índice de Shannon, Índice de Simpson ou Índice Inverso de Simpson) e Diversidade de Calypso. A diversidade beta foi calculada a partir dos índices: Distâncias UniFrac (leva em conta a distância filogenética entre as OTUs) e Distância de Jaccard.

A maior parte dos estudos encontrou uma associação negativa do consumo de ultraprocessados com diversidade bacteriana e a composição bacteriana da microbiota intestinal, ou seja, o consumo de ultraprocessados resultou numa aparente redução na diversidade bacteriana e abundância relativa de táxons. A maioria dos estudos não realizou análise estratificada por sexo, e os que realizaram, encontraram resultados distintos.

Considerando os estudos transversais (Bolte et al., 2021; Cuevas-Sierra

et al., 2021; Estrada-Velasco et al., 2014; Mitsou et al., 2017; Noh et al., 2021;

Shikany et al., 2019), o estudo em que os participantes consumiram uma refeição de *fast food* (fornecidos por duas grandes franquias internacionais, bem como por uma pizzaria local), por um período de duas horas ou até que estivessem totalmente satisfeitos (Figge et al., 2021) não observou diferenças nas comunidades bacterianas fecais entre os participantes, independente do sexo, e tampouco foram observados efeitos na composição microbiana. Já no estudo de Estrada-Velasco et al. (2014), que avaliou consumo alimentar de crianças e a obesidade infantil, foi observada alta abundância relativa de Firmicutes (Odds ratio (OR) = 2,00, IC95% 1,23;3,26) e baixa abundância relativa de Bacteroidetes (OR= 0,45, IC95% 0,28; 0,71) entre aqueles participantes incluídos no padrão de consumo considerado “não saudável” (snacks mexicanos, *fast food* e alimentos ricos em gordura saturada), associado a um risco aumentado de obesidade.

Shikany et al. (2019) investigaram indivíduos adultos americanos (N= 517). Neste estudo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre a diversidade alfa e os dois padrões alimentares estabelecidos pelos autores ($P > 0,05$) (padrão 1: carnes processadas, grãos refinados, batatas, ovos, doces e salgadinhos e padrão 2: frutas, verduras, nozes, peixes e frango e peru sem pele), mesmo após ajuste. O padrão alimentar 2 associou-se à diversidade beta, calculada pela distância UniFrac não ponderado e ponderado ($P = 0,005$ e $P = 0,001$, respectivamente). Quanto ao estudo com adultos gregos (Mitsou et al., 2017), o consumo de lanches e *junky food* correlacionou-se negativamente com a adesão à dieta mediterrânea e teve correlação foi negativa com: Firmicutes, *C. coccoides*, grupo *Clostridium leptum*, *F. prausnitzii*, com o grupo Lactobacillus, Bacteroides e as bifidobactérias: *E. coli*. Além disso, o consumo desses alimentos associou-se positivamente com a participação relativa de coliformes (contagens de *E. coli* após ajuste).

Em estudo com indivíduos adultos classificados como com sobrepeso segundo IMC (Cuevas-Sierra et al., 2021) (N= 359), a amostra foi dividida em dois grupos de acordo com o consumo de AUPs: menos de 3 porções por dia e mais de 5 porções por dia. Os participantes que apresentavam o maior consumo de AUP por dia apresentaram abundância significativamente maior dos gêneros Gemmiger, Granulicatella, Parabacteroides, Shigella, Bifidobacterium,

Anaerofilum, cc_115, Oxalobacter e Collinsella. A análise do perfil da microbiota intestinal estratificada por sexo mostrou resultados distintos entre os grupos, como por exemplo, maior abundância de Acidaminococcus, Butyrivibrio, Gemmiger, Shigella, Anaerofilum, Parabacteroides e Bifidobacterium nas mulheres, enquanto os homens apresentaram maior abundância nos gêneros Granulicatella e Blautia, mas uma diminuição nos gêneros Anaerostipes.

No estudo de Bolte et al. (2021), com duas coortes de adultos com doenças intestinais, foram encontradas associações positivas significativas entre o consumo de *fast food* (*cluster* composto de carnes, batatas fritas, maionese e refrigerantes) e a abundância de bactérias Blautia, Lachnospiraceae e *Clostridium bolteae* que aumentam a captação de energia da dieta e estão implicados na obesidade e doenças inflamatórias imunomediadas. Já no estudo de Noh et al. (2021), com amostra de adultos coreanos, o consumo de AUP da dieta habitual desta população (bolos/doces, salgados de pacote) não se associou com os principais filos da microbiota intestinal (Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria) nem em relação a Firmicutes/Bacteroidetes.

Considerando os estudos do tipo coorte (García-Vega Á et al., 2020; Partula et al., 2019), no estudo de Partula et al. (2019) a microbiota intestinal dos indivíduos adultos apresentou associação inversa e significativa dos produtos fritos, refrigerantes e/ou bebidas açucaradas com os 3 índices de diversidade alfa. No estudo de García-Vega Á et al. (2020), a comunidade pareada com dietas de baixa qualidade e alta ingestão de AUP abrange OTUs de Bilophila sp. e patógenos oportunistas como Escherichia coli, Bacteroides fragilis e Prevotella melaninogenica. Também abrange as bactérias produtoras de AGCC, como *Subdoligranulum variabile*, *Oscillospira sp.*, *Bifidobacterium teenis*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus sp.* e *Ruminococcus lactaris*. No estudo de Park et al. (2021), formado por duas coortes japonesas, não foram encontradas associações significativas entre a composição da microbiota intestinal e o consumo de AUP.

No estudo de intervenção de O'Keefe et al. (2015), afro-americanos e africanos rurais participaram de uma mudança na dieta. Os participantes do estudo passaram duas semanas alimentando-se com suas refeições tradicionais ("padrão ocidental" ou padrão africano rural) e inverteram as dietas por 2

semanas. A intervenção dietética rica em fibras e com baixo teor de gordura em afro-americanos foi associada a uma diminuição significativa de *Biophila wadsworthia*, enquanto a intervenção com baixo teor de fibras e alto teor de gordura em africanos foi associada a um aumento de *Fusobacterium nucleatum*. No estudo de Shin et al. (2019), em que os participantes consumiram três diferentes tipos de dietas (dieta coreana típica, dieta americana saudável recomendada e dieta americana típica), os autores observaram que após consumo da dieta típica americana (caracterizada por altos níveis de carne processada, açúcares adicionados, gordura saturada e baixa ingestão de vegetais, fibras e frutas) houve um aumento significativo de *Anaerostipes*, *Oscillospira*, *Gemella*, *Synergistes*, *Lautropia*, *Citrobacter* e *Treponema* e redução substancial de *Carboxydocella*, *Pyramidobacter*, *Allistipes*, *Fusobacterium*, *Lachnospira*, *Porphyromonas* e *Bacillus*.

As principais variáveis utilizadas nos ajustes das análises foram: sexo, faixa etária/idade, IMC, atividade física, ingestão energética e tabagismo. Considerando que a microbiota intestinal é formada quase que totalmente até a infância, são necessários ajustes relacionados a variáveis de comportamento e sociodemográficas. A revisão da literatura mostrou apenas um artigo que realizou o ajuste para consumo energético residual. Três estudos não realizaram análise ajustada (Figge et al., 2021; Park et al., 2021; Shin et al., 2019). Considerando que o consumo de AUP contribui substancialmente para o aporte energético, controlar para o consumo energético residual parece controverso, pois pode atenuar o efeito do consumo de AUP sob o microbioma intestinal. Em nenhum estudo foram utilizadas variáveis relacionadas ao período perinatal, principalmente no estudo com crianças e adolescentes.

Os resultados da revisão sugerem que o consumo de AUP tem um impacto na colonização bacteriana da microbiota intestinal. Observa-se um aumento de bactérias que podem auxiliar no efeito deletério desse tipo de alimento no estado inflamatório e oxidativo sistêmico, como o aumento de bactérias do filo Firmicutes, como *Clostridium* e *Shigella*, e do filo Proteobacteria (*Escherichia coli*), por exemplo.

Algumas limitações que os autores citam são: o uso de sequenciamento de rRNA 16s pode estar associado a erros de medição, incluindo resolução limitada e menor sensibilidade em comparação com dados de sequenciamento

metagenômico *shotgun*; número reduzido de indivíduos na amostra, que poderia atenuar a generalização dos achados; o período de ingestão dos alimentos, que impulsiona a composição da microbiota intestinal; o desenho transversal, que pode impossibilitar a determinação de causalidade; o uso do questionário de frequência alimentar que pode limitar a capacidade de detectar associações e que pode estar sujeito a viés de relato e erros de medição – além disso, alguns QFAs utilizados não foram exatamente projetados para coletar dados sobre AUP, portanto alguns itens podem não ser incluídos; dificuldade de extrapolação dos resultados, uma vez que os perfis de microbioma estão intimamente relacionados a grupos étnicos e localizações geográficas de residência e por fim, a falta de referências na literatura sobre microbiota intestinal e consumo de AUP, que pode dificultar a escolha de um ponto de corte adequado.

Podemos observar que há uma escassez na literatura de estudos sobre a associação entre consumo de AUP e a microbiota intestinal com o grupo de crianças/adolescentes, dificultando a comparabilidade com o público alvo desse projeto (crianças com idade entre 6 e 12 anos de idade). Em estudo realizado no Brasil (Pires et al., 2019), com amostra de participantes que vivem na Amazônia e participantes que vivem no Rio de Janeiro, encontrou-se diferenças na abundância relativa de táxons de *Prevotella* e *Bacteroides* para algumas OTUs ao comparar o microbioma intestinal destes indivíduos, o que pode sugerir o papel da dieta no microbioma intestinal, entretanto, o referido estudo não realizou uma análise dos padrões alimentares dos participantes que confirmaria essa suposição. O processo de urbanização e mudanças nos estilos de vida elucidam os aspectos que influenciam as composições microbianas intestinais e dão força para ampliar as investigações a respeito do consumo alimentar e a composição bacteriana (Schaan et al., 2021).

Os resultados encontrados indicam uma ampla variabilidade dentre as comunidades bacterianas presentes e relacionadas ao consumo alimentar dos indivíduos. Diante do exposto, há necessidade de investigar a associação, principalmente levando em consideração o papel do sexo, para fomentar a promoção do consumo de alimentos considerados saudáveis, a fim de desencadear um efeito positivo na microbiota intestinal.

Quadro 3. Resumo dos artigos selecionados para a revisão sobre a associação entre consumo de alimentos de ultraprocessados e características quantitativas relacionadas ao microbioma intestinal.

Autor/ Ano	Amostra/ idade	Exposição	Desfecho	Confundidores nas análises	Metodologia analítica	Resultados
Estrada- Velasco et al. 2014 México	1.042 crianças de 6 a 14 anos de idade	QFA com 107 questões.	DNA genômico extraído a partir de amostras fecais, visando o gene 16S rRNA. Foi calculada a quantificação das unidades de abundância relativa de Firmicutes e Bacteroidetes.	Sexo Idade Histórico familiar de obesidade Atividade física	Para avaliar a associação entre a abundância relativa da microbiota e o risco de sobrepeso/obesidade, a abundância foi categorizada em baixa abundância (abaixo da média) ou alta abundância (acima da média) e um modelo de regressão logística foi realizado usando como grupo de referência crianças de peso normal.	A abundância relativa de Bacteroidetes foi maior em crianças com peso normal e a abundância relativa de Firmicutes maior em crianças com sobrepeso/obesidade. Foi observado que crianças com alta abundância relativa de Bacteroidetes e alto consumo do padrão não saudável apresentaram 51% menos chance de ter sobrepeso/obesidade (OR=0,49, p=0,004), ao contrário, crianças com alta abundância relativa de Firmicutes e alto consumo do padrão não saudável têm 2 vezes mais chances de ter sobrepeso/obesidade (OR=1,98, p=0,006).
García-Vega, Á. S., Corrales- Agudelo, V., Reyes, A., & Escobar, J. S. 2020 Colômbia	441 indivíduos com idade entre 18 e 62 anos	Os dados dietéticos foram coletados por meio de recordatórios alimentares de 24 horas	DNA genômico extraído a partir de amostras fecais, visando a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA. O índice de diversidade de Shannon, o número de OTUs observados e um índice de equidade de Shannon (Jevness) foram calculados como	Cinco cidades de origem dos participantes Sexo Faixa etária (18–40 e 41–62 anos) IMC Nível socioeconômico	Diferenças nos componentes da dieta por variáveis controladas pelo desenho foram testadas com ANOVA. As diferenças na diversidade alfa da microbiota intestinal entre os níveis de variáveis dependentes foram testadas com ANOVA, enquanto a	A comunidade pareada com dietas de baixa qualidade e alta ingestão de alimentos ultraprocessados incluiu OTUs de <i>Bilophila</i> sp. e patógenos oportunistas como <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> e <i>Prevotella melaninogenica</i> . Não foi encontrada associação entre nenhum dos três índices de qualidade empregados e a diversidade alfa da microbiota intestinal, nem associações significativas entre qualidade da dieta e diversidade beta.

			<p>estimativas de diversidade alfa.</p> <p>Distâncias UniFrac baseadas em árvores foram usadas como estimativas da diversidade beta.</p>		<p>PERMANOVA foi realizada para testar as diferenças na diversidade beta.</p> <p>A informação dietética e a diversidade alfa da microbiota intestinal foram pareadas usando regressões lineares ajustadas multivariáveis.</p> <p>A direção das associações entre a abundância de OTU e a variável da dieta foi determinada usando coeficientes de correlação de Spearman.</p>	
<p>Park et al, 2021</p> <p>Japão</p>	<p>1.596 participantes</p> <p>Coorte NIBIOHN MORINAGA com idades entre 20 e 80 anos</p>	<p>Brief Self-Administrated Diet History Questionnaire, para estimar a quantidade de ingestão de 58 itens de alimentos e bebidas consumidos no mês anterior.</p>	<p>DNA genômico extraído a partir de amostras fecais, visando as regiões hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA.</p> <p>Índice de diversidade alfa (Shannon e Simpson) e diversidade beta (distância de Bray-Curtis)</p> <p>Para análise do enterótipo, foi usada a divergência de Jensen-Shannon (JSD)</p>	-	<p>Os índices de alfa e beta diversidade foram calculados no pacote R por funções específicas.</p> <p>Foi usado o teste de soma de postos de Wilcoxon (no pacote R) e a análise de correlação de Spearman (no pacote R) para comparação e análise de correlação, respectivamente.</p>	<p>Não foram encontradas associações significativas entre a composição da microbiota intestinal e o consumo de alimentos ultraprocessados.</p>
<p>Partula et al, 2019</p>	<p>862 indivíduos adultos saudáveis com</p>	<p>QFA administrado que compreendeu</p>	<p>DNA genômico extraído a partir de amostras fecais, visando a região</p>	<p>Idade</p> <p>Sexo</p> <p>IMC</p>	<p>As associações entre variáveis dietéticas e índices de diversidade</p>	<p>Produtos fritos e refrigerantes ou bebidas açucaradas foram inversamente associados aos 3 índices de diversidade</p>

França	idade entre 20 a 69 anos	19 grupos de alimentos.	hipervariável V3-V5 do gene 16S rRNA. Diversidade alfa: Índice de Simpson. Abundância: Riqueza observada e Estimativa de riqueza de Chao1	Tabagismo Atividade física Profundidade de sequenciamento	alfa e beta e abundância relativa de táxons foram testadas usando correlações de Spearman, ANOVAs permutacionais e análises multivariadas com modelos lineares, respectivamente. Associações entre variáveis dietéticas e diferenças de beta diversidade foram testadas usando ANOVA permutacional (PERMANOVA), já associações entre variáveis dietéticas e abundâncias relativas de filos, gêneros e espécies foram testadas usando associações multivariadas com modelos lineares.	alfa. Foram identificadas associações negativas específicas do índice: produtos doces gordurosos, carnes, pratos prontos, sobremesas e carnes processadas foram associados a 1 ou 2 índices (intervalo p: -0,125; -0,069). Com relação à beta diversidade, a matriz de Jaccard foi associada a queijo, refeições prontas, frutas cozidas, produtos fritos e frutas cruas — juntos explicando 0,77% da variação total na composição da microbiota, medida pelo valor parcial de R ² .
Shin et al, 2019 Coréia	54 adultos com idade entre 25 a 65 anos de idade e IMC maior ou igual a 23 kg/m ²	Três dieta diferentes foram consumidas pelos participantes (coreana típica, dieta americana saudável recomendada e dieta americana típicas (TAD) em três refeições e um	DNA genômico extraído a partir de amostras fecais, visando a região hipervariável V1-V2 do gene 16S rRNA.	-	A significância estatística foi avaliada usando o teste Wilcoxon Signed-Rank, Mann-Whitney U-test, análise de correlação de Spearman.	Após a intervenção do TAD, houve aumento significativo de Anaerostipes, Oscillospira, Gemella, Synergistes, Lautropia, Citrobacter e Treponema. A ingestão de TAD resultou em uma redução substancial de Carboxydocella, Pyramidobacter, Allistipes, Fusobacterium, Lachnospira, Porphyromonas e Bacillus.

		lanche por dia, por 4 semanas.				
O'Keefe et al, 2015 EUA e África do Sul	20 afro-americanos saudáveis de meia-idade e 20 africanos rurais adultos com idade entre 50 e 65 anos	Os participantes passaram 2 semanas em seu próprio ambiente doméstico, comendo sua comida habitual e, em seguida, consumiram a dieta de intervenção por 2 semanas.	DNA genômico extraído a partir de amostras fecais, visando a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA. Amostras fecais foram coletadas em três intervalos durante o estudo de ambiente doméstico e novamente três vezes após a mudança de dieta	País (Afro-americanos e africanos nativos) Intervenção dietética	Dados complexos de microbiota e metabonome foram analisados por várias ordenações multivariadas (análises de componentes principais e escala multidimensional não métrica), testes independentes de Kruskal-Wallis e ANOVA multivariada com correção de Bonferroni.	Foram observados padrões de coocorrência mais fortes entre os táxons em nível de gênero em africanos que consomem sua dieta usual rica em fibras, que incluiu potenciais produtores de butirato, por exemplo, <i>E. rectale</i> et rel. e <i>Clostridium symbiosum</i> et rel., e bactérias associadas à utilização de carboidratos complexos, por exemplo, <i>Oscillospira guillermontii</i> et rel. A redução no consumo de fibra levou a associações opostas. A intervenção com baixo teor de fibras e alto teor de gordura em africanos foi associada a um aumento de <i>Fusobacterium nucleatum</i> .
Figge et al, 2021 Alemanha	25 adultos voluntários saudáveis	Os indivíduos receberam uma refeição <i>fast food</i> altamente calórica, como pizza e refrigerantes.	Sequenciamento 16s RNA a partir de amostras fecais coletadas no dia 0 e dia 1. Abundância: Cálculo da riqueza Diversidade alfa/beta: diversidade de Pielou, índices de Shannon e Simpson	-	A significância estatística foi determinada usando um teste de postos sinalizados de pares pareados de Wilcoxon, a normalidade dos dados foi testada com o teste de Shapiro-Wilk. Para análise de correlação, foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Rank de Spearman. A análise de regressão logística univariada foi utilizada	As comunidades bacterianas fecais basais não diferiram entre homens e mulheres e entre antes e depois da compulsão de fast-food com base na análise PERMANOVA. Não foram observadas diferenças significativas na composição da microbiota entre indivíduos com um aumento alto vs. baixo na abundância em relação à diversidade e riqueza, bem como em níveis de taxonomia de classificação mais alta.

					para identificar o valor preditivo de um parâmetro.	
Mitsou et. al 2017 Grécia	100 homens e mulheres de 18 a 65 anos	A ingestão alimentar foi avaliada por meio de QFA semiquantitativo validado.	DNA genômico extraído a partir de amostras fecais, visando a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA. A parcela relativa (%) de cada grupo bacteriano foi calculada a partir das contagens totais.	Sexo Idade IMC	O qui quadrado foi aplicado para verificar a dependência entre variáveis categóricas; enquanto os coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman foram usados para avaliar as relações lineares entre variáveis contínuas. Análise de regressão linear múltipla e análise de regressão logística foram realizadas para avaliar o MedDietScore ou grupos de alimentos específicos em relação às características fecais, microbiota intestinal e gastrointestinais dos participantes.	O consumo de lanches e <i>junk food</i> correlacionou-se negativamente com Firmicutes (-0,195), o grupo <i>C. coccoides</i> (-0,225), o grupo <i>Clostridium leptum</i> (-0,306), <i>F. prausnitzii</i> (-0,501), o grupo Lactobacillus (qPCR; -0,759), <i>Bacteroides</i> (qPCR; -0,246). O consumo de refrigerantes correlacionou-se negativamente com os níveis fecais de <i>A. muciniphila</i> (-3·717, P=0·026).
Shikany et al, 2019 EUA	517 homens com 65 anos ou mais	Breve QFA perguntou sobre a ingestão de 69 itens alimentares. Foram nomeados padrões com base nas cargas fatoriais que mais contribuíram para	DNA genômico extraído a partir de amostras fecais, visando a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA. Diversidade alfa (tanto pelo índice de Shannon quanto pelo índice inverso de Simpson) e beta (UniFrac	Idade Raça Centro clínico Ingestão energética IMC Tamanho da biblioteca	A associação entre a diversidade alfa bacteriana e os fenótipos dos indivíduos foi avaliada com modelos de regressão linear (com medidas microbianas como variáveis dependentes).	Não houve associações estatisticamente significativas entre qualquer índice de diversidade alfa para qualquer padrão nos modelos ajustados. A abundância relativa desses 4 filós dominantes não diferiu significativamente entre os 2 padrões alimentares. Em análises multivariáveis, tanto os padrões ocidentais quanto os prudentes foram significativamente associados a

		<p>cada padrão. O fator 1 foi designado como padrão “ocidental”. O fator 2 foi designado como padrão “prudente”.</p>	<p>não ponderado e ponderado).</p>		<p>A análise de variância permutacional multivariada (PERMANOVA) forneceu testes estatísticos para associações de diversidade beta e fenótipos de dieta</p>	<p>medidas UniFrac ponderadas e não ponderadas de diversidade beta. Em todos participantes, os filos dominantes foram Bacteroidetes (46,9%) e Firmicutes (41,7%), com contribuições menores de Proteobacteria (6,5%) e Verrucomicrobia (3,3%).</p>
<p>Cuevas-Sierra et al, 2021</p> <p>Espanha</p>	<p>359 indivíduos adultos com índice de massa corporal (IMC) de 25 a 36 kg/m² do estudo Obekit, também foram incluídos 63 indivíduos com peso normal (IMC de 18 a 24,9 kg/m²)</p> <p>(n=422)</p>	<p>A ingestão alimentar coletada com um QFA validado na Espanha que incluiu 137 itens alimentares.</p>	<p>DNA genômico extraído a partir de amostras fecais, visando as regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rRNA.</p> <p>A riqueza foi calculada com o número baseado em contagens de OTU. Diversidade alfa foi calculada através dos índices Chao1 e Shannon, analisados usando um teste não paramétrico pareado. Diversidade beta foi calculada pelo índice de Bray-Curtis e PERMANOVA.</p>	<p>IMC</p> <p>Idade</p> <p>Ingestão energética na linha de base pelos métodos residuais</p>	<p>As diferenças estatísticas nas abundâncias da microbiota entre os grupos de consumo de UPFs ajustados foram testadas pelo EdgeR (no pacote R) previamente normalizado usando média aparada de normalização de valores e taxa de falsa descoberta para correção (considerada estatisticamente significativa quando FDR < 0,05).</p> <p>A associação entre microbiota e categorias de AUP foi avaliada pela correlação de Spearman usando Stata 16.0 separadamente em mulheres e homens e corrigida por FDR (significativo quando FDR > 0,05).</p>	<p>Os participantes que consumiram mais de 5 porções/dia apresentaram abundância significativamente maior dos gêneros Gemmiger, Granulicatella, Parabacteroides, Shigella, Bifidobacterium, Anaerofilum, cc_115, Oxalobacter e Collinsella. As mulheres que consumiram mais de 5 por/d de AUPs apresentaram aumento significativo de Acidaminococcus, Butyrivibrio, Gemmiger, Shigella, Anaerofilum, Parabacteroides e Bifidobacterium.</p>

					As diferenças na abundância bacteriana de acordo com o consumo de UPFs ajustados foram avaliadas usando tercís de consumo para mulheres e comparando os tercís 1 e 3 pelo teste de Mann-Whitney.	
Bolte et al, 2021 Holanda	1.425 indivíduos adultos da população geral e pacientes com doenças intestinais, usando duas coortes independentes do norte da Holanda.	A ingestão alimentar foi avaliada por meio de um QFA semiquantitativo referente ao mês anterior em uma escala de 7 itens.	Sequenciamento de DNA <i>shotgun</i> a partir de amostras fecais. A abundância medida através do Distância de Bray-Curtis.	Idade Sexo Profundidade de leitura de sequenciamento	Os dados das duas coortes foram combinados em uma estrutura de meta-análise para explorar as relações dieta-microbioma que foram significativas e consistentes. O método de variância inversa foi usado para calcular os meta z-scores combinados e os metap valores correspondentes.	Foram observadas associações positivas significativas entre o consumo de <i>fast food</i> e salgadinhos e a abundância de bactérias <i>Blautia</i> , <i>Lachnospiraceae</i> e <i>Clostridium bolteae</i> . Um cluster de <i>fast food</i> composto por carnes, batatas fritas, maionese e refrigerantes mostrou uma associação positiva com um cluster de bactérias <i>Clostridium bolteae</i> , <i>Coprobacillus</i> e <i>Lachnospiraceae</i> . Além disso, refeições de <i>fast food</i> e lanches salgados foram positivamente associados a <i>Parabacteroides johnsonii</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lachnospiraceae</i> bactéria 1_1_57FAA e <i>Ruminococcus</i> gênero em todas as coortes.
Noh et al, 2021 Coreia	222 adultos com idade entre 18 a 60 anos	O QFA incluiu 106 itens, incluindo nove pratos básicos coreanos, 25 sopas e ensopados, 54 acompanhamentos, nove bebidas não	DNA genômico extraído a partir de amostras fecais, visando a regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rRNA. Abundância relativa (proporção (%)) de OTU	Sexo Idade IMC Ingestão de suplementos alimentares Atividade física Tabagismo	Associações de diversidade alfa e beta diversidade da microbiota intestinal com características das populações do estudo foram examinadas por modelos lineares gerais e	O consumo de alimentos ultraprocessados não se mostrou associado aos principais filos da microbiota intestinal (Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria) nem à relação Firmicutes/Bacteroidetes.

		alcoólicas e nove frutas.	Índices de diversidade alfa: Chao1, Shannon e Faith PD Diversidade beta: Bray-Curtis, UniFrac ponderada e não ponderada.	Lote de amostra	análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), respectivamente.	
--	--	---------------------------	--	-----------------	---	--

4. JUSTIFICATIVA

A revisão da literatura realizada neste projeto esteve centrada em características genéticas do hospedeiro humano e no consumo de AUP, assim foi possível demonstrar as importantes lacunas a serem preenchidas sobre o tema.

Para o período da adolescência, não há consenso sobre o conjunto de táxons que habitam a microbiota intestinal, entretanto, sabe-se que é um período de desenvolvimento relevante de contribuição para a estrutura da comunidade do microbioma intestinal e o fornecimento de metabólitos durante o crescimento (Agans et al., 2011). Poucos estudos são focados em avaliar a diversidade e a abundância bacteriana intestinal nessa etapa da vida, apesar de haver sugestões de que a microbiota muda conforme envelhecemos (O'Toole & Jeffery, 2015). Avaliar os determinantes precoces e modificáveis do microbioma intestinal adiciona informações quanto ao seu desenvolvimento e atividades. A microbiota intestinal é considerada um mediador entre esses determinantes e a manutenção da saúde na vida adulta. Assim, também surge a necessidade de melhor compreensão da relação entre a microbiota intestinal nessa etapa da vida e seus determinantes.

A relação entre o consumo de AUP e microbioma intestinal também tem sido explorada em menor escala em adolescentes. O consumo de AUP em longo prazo representa uma parte importante e crescente da oferta de alimentos mundialmente. Estudos recentes mostram que o consumo destes alimentos, ricos em açúcares simples e gorduras, está diretamente relacionado a prevalência de obesidade e doenças crônicas não transmissíveis em muitos países (Lawrence & Baker, 2019). O consumo de AUP pode contribuir para disbiose, induzir à inflamação e distúrbios metabólicos, além de alterar a composição da microbiota intestinal. Estudos recentes mostram a perda na diversidade da microbiota, além de perda permanente de bactérias, o que impacta na abundância microbiana.

A revisão também mostrou que a literatura é limitada quanto a avaliação do consumo de AUP e a microbiota intestinal em adolescentes, sobretudo em estudos longitudinais. A relação entre dieta e a composição da microbiota intestinal tem sido evidenciada na literatura (David et al., 2014; Gentile & Weir,

2018). Entretanto, há uma lacuna que necessita ser preenchida acerca da relação do consumo de AUP, visto os efeitos deletérios que esse tipo de alimento apresenta para a saúde (Cuevas-Sierra et al., 2021; Rinninella et al., 2019) e as mudanças nos padrões alimentares nas últimas décadas.

O uso de dados genéticos pode servir para entender fatores biológicos intrínsecos do hospedeiro que modulam a microbiota. É importante compreender os mecanismos biológicos da simbiose. Entretanto, há escassez de estudos que realizam análise genética em população brasileira de zona urbana (Pires et al., 2019; Schaan et al., 2021), além disso, não há estudos de revisão para compilar essa informação. A identificação de fatores genéticos podem ser úteis para estudos envolvendo causalidade, empregando essas variantes como variáveis instrumentais do microbioma em abordagem de randomização mendeliana. A maior parte dos estudos é feita em outras populações. Testar a transposição dos escores e variantes genéticas em países de baixa e média renda podem fornecer importante informação para robustez dos dados.

Adicionalmente, este projeto representa um conjunto de dados robusto, capaz de sumarizar dados para população brasileira adolescente e pode servir como um recurso exclusivo para metanálises multiétnicas em larga escala de GWAS de microbioma no futuro, fornecendo importante contribuição científica para o entendimento da relação hospedeiro-microbioma intestinal.

5. OBJETIVOS

O objetivo principal do presente projeto consiste em investigar a associação entre fatores genéticos e alimentares, especificamente o consumo de ultraprocessados, e parâmetros de composição e diversidade do microbioma intestinal em uma subamostra de participantes da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004.

(1) Revisar sistematicamente a literatura para compreender e compilar as informações a respeito da relação entre aspectos genéticos do hospedeiro e o microbioma intestinal em humanos.

(2) Testar a associação de fatores genéticos do hospedeiro com diversidade e composição do microbioma intestinal em uma subamostra de participantes da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004.

(3) Avaliar o papel do consumo de alimentos ultraprocessados (aos 6, 11 e 12 anos de idade) na composição do microbioma intestinal dos participantes do estudo.

6. HIPÓTESES

I. Diversos fatores genéticos (polimorfismos, genes e escores de risco poligênico) do hospedeiro participam da modulação da diversidade e composição do microbioma intestinal em humanos.

II. A associação dos principais marcadores genéticos do hospedeiro reportados na literatura estarão associados à composição e diversidade do microbioma intestinal na subamostra de participantes da coorte de 2004.

III. Indivíduos com alto consumo de alimentos ultraprocessados nos três pontos apresentarão maior abundância de bactérias relacionadas ao estado inflamatório e oxidativo sistêmico e menor diversidade

microbiana.

7. METODOLOGIA

A seguir serão apresentadas as metodologias dos três estudos planejados dividida em três itens. No primeiro item (7.1), será descrita a metodologia do estudo de revisão sistemática (Artigo 1: *Aspectos genéticos do hospedeiro associados ao microbioma intestinal: uma revisão sistemática*). Na seção seguinte (7.2), será descrito o estudo original e observacional que será conduzido com dados de uma subamostra da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004 (Artigo 2: *O papel de aspectos genéticos do hospedeiro na composição do microbioma intestinal na adolescência em participantes da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004*). No terceiro item (7.3) será apresentada a metodologia sugerida para a elaboração do artigo 3 (*Consumo de alimentos ultraprocessados e sua relação com o microbioma intestinal: análise longitudinal aos 6, 11 e 12 anos em uma subamostra da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004*).

7.1 Metodologia artigo 1

7.1.1. Estratégia de busca

A busca será realizada no catálogo de GWAS (*GWAS Catalog*) do Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano - Instituto Europeu de Bioinformática (NHGRI-EBI), que compila estimativas de associação entre variantes do genoma humano com os fenótipos de interesse, a fim de identificar possíveis regiões com maior efeito sobre a característica e posterior investigação de funções biológicas (Yang et al., 2013). Para a revisão, será usado o seguinte termo da EFO como critério de busca: microbioma intestinal (gut microbiome measurement; ID: EFO_0007874). Um termo EFO, ou ontologia fatorial experimental, é uma iniciativa de bioinformática usada para unificar a representação do gene e atributos genéticos em todas as espécies (Jupp, Gibson, Malone, & Stevens, 2012; Malone et al., 2010). Não serão aplicados limites para a busca. Além disso, como recurso adicional, iremos

buscar registros nas referências dos artigos selecionados.

7.1.2. Seleção dos estudos

Após levantamento dos estudos de GWAS publicados, a seleção dos trabalhos será conduzida de acordo com os critérios de elegibilidade, em pares e em duas etapas. Na primeira etapa serão selecionados artigos de interesse com base na leitura de títulos e resumos. Na segunda etapa, serão lidos os artigos selecionados na primeira etapa e serão mantidos aqueles que cumpram a proposta de estudar a relação entre os aspectos genéticos e a composição do microbioma intestinal. As variáveis que serão extraídas dos artigos selecionados são: autor e ano de publicação, cidade e país, amostra e idade dos participantes do estudo, ancestralidade genômica, delineamento do estudo, objetivos, exposição, metodologia usada para definição da exposição, desfecho, metodologia usada para definição do microbioma, metodologia analítica, nível de significância, resultados, covariáveis nas análises e limitações. Por fim, serão extraídos os SNPs associados respeitando a decisão de limiar de associação dos trabalhos individuais.

7.3. Registro da revisão sistemática

Será realizada uma busca sistemática da literatura, em pares, com o intuito de identificar e descrever os trabalhos publicados acerca da relação entre aspectos genéticos do hospedeiro e o microbioma intestinal. A busca terá por objetivo selecionar trabalhos provindos de estudos de associação livres de hipótese prévia, ou seja, estudos de associação ampla do genoma (GWAS). Posteriormente, a partir das diretrizes do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA), protocolo que define os principais itens que devem ser relatados em revisões sistemáticas e metanálises (Moher, Liberati, Tetzlaff, & Altman, 2009), a proposta será registrada no depósito de protocolos de revisão sistemática, PROSPERO (*International Prospective Register of Systematic Reviews*).

7.2. Metodologia artigo 2

Artigo original: O papel de aspectos genéticos do hospedeiro na composição do microbioma intestinal na adolescência em participantes da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004.

Objetivo: Identificar regiões genômicas que influenciam as características quantitativas relacionadas ao microbioma intestinal (abundância e diversidade bacteriana) em humanos.

7.2.1. Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas

Para este estudo serão utilizados dados da Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas. A Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas é um estudo longitudinal, de base populacional e natureza prospectiva. Incluiu todos os nascimentos de 1º de janeiro a 31 de dezembro de 2004 identificados através de visitas diárias às cinco maternidades da cidade. As mães elegíveis para o estudo, aquelas que moravam na zona urbana ou no bairro Jardim América do município vizinho, Capão do Leão, foram entrevistadas nas primeiras 24 horas depois do parto (abordagem perinatal). O estudo recrutou 4.231 participantes no nascimento. Foram realizados nove acompanhamentos até o presente momento, começando no perinatal e sendo o mais recente aos 18 anos de idade (2022), ainda em curso. Os detalhes dos acompanhamentos são descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos números relativos a cada acompanhamento realizado na Coorte de Nascimentos de 2004. Pelotas, RS.

Acompanhamento	Perinatal	3 meses	Anos					
			1	2	4	6	11	15
Entrevistas realizadas	4.231	3.985	3.907	9.869	3.799	3.722	3.566	2.029
Óbitos	-	66	82*	88*	94*	95*	98*	102*
Recusas (%)	0,8	0,6	0,6	0,9	1,2	0,6	1,6	1,8
Perdas (%)	-	3,6	5,1	5,5	6,8	9,2	11,8	47,8**
Perdas e recusas (%)	0,8	4,3	5,7	6,4	8,0	9,8	13,4	49,6
Taxa de acompanhamento	99,2	95,7	93,5	93,5	92,0	90,2	86,6	50,4

* Número cumulativo

** Acompanhamento interrompido por causa da pandemia de COVID-19

Neste projeto serão utilizados dados dos participantes que coletaram amostra de saliva aos 6 anos (N=3472) e que tiveram a amostra de fezes coletada no subestudo do microbioma (N=366). Este subestudo foi realizado em colaboração com pesquisadores da Universidade de Toronto.

7.2.2. Seleção de subamostra

Entre setembro de 2009 e janeiro de 2010 foi realizado o primeiro acompanhamento de saúde bucal com uma subamostra da Coorte de Nascimentos de 2004, repetido com os mesmos participantes de abril a outubro de 2017. Em 2017, os participantes foram convidados a participar do subestudo do microbioma intestinal que tinha como objetivo primário a coleta material fecal. Tais amostras seriam utilizadas posteriormente para avaliar o padrão da microbiota intestinal. Para isso, um sorteio foi realizado a partir da amostra pré-selecionada para o subestudo de saúde bucal (N = 1.303), para que fosse possível manter a representatividade da amostra na alocação dos participantes, foi realizada seleção aleatória a partir dos estratos de escore-z de IMC para idade. Foram excluídos da subamostra aqueles adolescentes com comprometimento cognitivo, que inviabilizaria a coleta de fezes ou aplicação do

questionário, gestantes e adolescentes que tivessem dado à luz nos seis meses anteriores a entrevista. Dos 1303 adolescentes, 409 foram sorteados para participar do estudo de caracterização de microbioma por meio da coleta de amostras de fezes. O fluxograma apresentado na Figura 5 detalha a distribuição da amostra total do subestudo do Microbioma. O total de perdas e recusas foi de 22,5% na amostra original (N = 92) e 26,7% considerando a amostra total (N = 133).

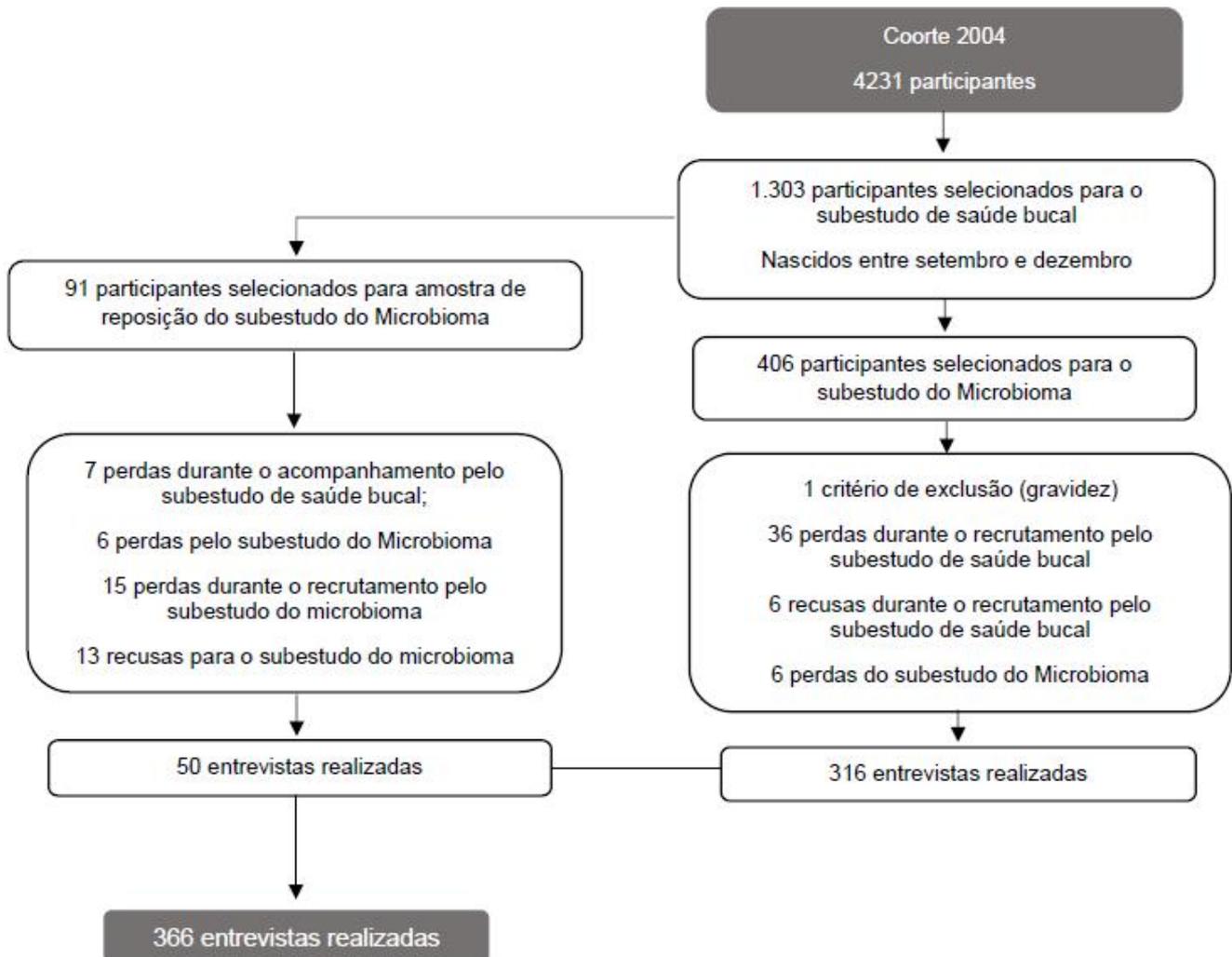


Figura 5. Fluxograma do subestudo do

7.2.3. Logística

No acompanhamento da subamostra foi utilizado um questionário elaborado pelas doutorandas responsáveis, sob orientação da supervisora de campo e da coordenação. Os questionários foram aplicados por entrevistadoras treinadas com uso de *tablets*, através do programa REDCap® (Research Electronic Data Capture) (Harris et al., 2009). O questionário, que foi aplicado nos domicílios dos participantes, foi dividido em oito blocos: Identificação; presença de animais domésticos; estilo de vida; coleta de fezes (informações da folha de coleta); coleta de fezes (Informações perguntadas); medicamentos e doenças crônicas; puberdade; questionário de frequência alimentar (QFA) e medidas antropométricas. O questionário está no Anexo 1.

Para a coleta de amostra fecal, foi entregue um kit de coleta de fezes aos participantes. O kit consistia de: coletor de Ácido Nucleico Fecal e Tubo plástico Norgen Biotek®, par de luvas de Nitrilo, papel coletor de fezes Fe-Col®, lenços umedecidos com álcool, etiquetas, uma pequena bolsa plástica (com fecho de zip), envelope de papel pardo, instruções impressas para a coleta (Anexo 2) e ficha de coleta de fezes (Anexo 3). As amostras foram recolhidas por pessoal designado para este fim e posteriormente entregues no Centro de Pesquisas em envelopes e recipiente hermeticamente fechados pelos participantes. No laboratório foram recodificadas para manter o sigilo dos participantes. As amostras foram armazenadas de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente foram enviadas em gelo seco ao “*Centre for the Analysis of Genome Evolution & Function*” da Universidade de Toronto, Canadá.

7.2.4. Análise dos dados

7.2.4.1. Exposição

Neste artigo, a exposição serão variantes genéticas do hospedeiro, previamente associadas a desfechos do microbioma intestinal conforme reportado por GWAS encontrados na revisão sistemática. A escolha das variantes genéticas do hospedeiro será guiada pela revisão da literatura. Serão selecionadas as variantes genéticas com associações mais fortes, baseada em

SNPs mais consistentes com os achados. Além disso, serão utilizados escores de risco poligênico que se associam com determinadas abundâncias.

Para o DNA dos participantes da coorte de 2004, foram coletadas amostras de saliva no acompanhamento aos 6 anos de idade (no ano de 2010). A partir das amostras, o DNA genômico foi extraído. A genotipagem ocorreu usando Global Screening Array v.2.

7.2.4.2. Desfecho

Para o artigo proposto, os seguintes desfechos serão considerados: táxons bacterianos presentes a nível de filo e gênero em cada amostra, usados para calcular abundâncias relativas e métricas de diversidade alfa (riqueza, diversidade de Shannon e uniformidade). Para tal, o procedimento de genotipagem, sequenciamento e análise microbiana é explicado a seguir:

Genotipagem e processamento de DNA a partir das amostras fecais

Extração de DNA

O DNA microbiano foi extraído a partir das amostras de fezes usando o kit ZymoBIOMICS® DNA Miniprep, número do produto D4300 (Zymo Research). As amostras foram lisadas usando um Mini BeadBeater (Biospecs Products INC), executado por 2 minutos. Após, o DNA extraído foi armazenado a -20°C até processamento adicional.

Sequenciamento

Para todas as amostras, as regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rRNA foram amplificadas usando iniciadores de sequenciamento 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') e reverso 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2012; Kozich, Westcott, Baxter, Highlander, & Schloss, 2013). A biblioteca foi então purificada usando esferas Ampure XP e carregada no Illumina MiSeq para sequenciamento, de acordo com as instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA). O

sequenciamento foi realizado usando a química V2 (300bp x 2).

Análise do microbioma bacteriano

O pipeline UNOISE, disponível através do USEARCH v11.0.667 e vsearch v2.10.4, foi usado para análise de sequência (R.C. Edgar, 2010, 2013; Robert C. Edgar, 2016; Rognes, Flouri, Nichols, Quince, & Mahé, 2016). Os dados foram então processados seguindo o pipeline do UNOISE. A atribuição de taxonomia foi executada usando SINTAX, disponível através do USEARCH, e o banco de dados *Ribosomal Database Project* (RDP) versão 16 compatível com UNOISE, com um ponto de corte de confiança mínimo de 0,8 (Wang et al., 2007). As sequências OTU foram alinhadas usando align_seqs.py v.1.9.1 a QIIME1 (Caporaso et al., 2010). As sequências que não se alinharam foram removidas do conjunto de dados e uma árvore filogenética dos dados filtrados da sequência alinhada foi feita usando FastTree (Price, Dehal, & Arkin, 2009). O número de cópias 16S foi estimado com o algoritmo SINAPS, acessado por meio do USEARCH.

7.2.5. Covariáveis e modificadores de efeito

Serão considerados como possíveis modificadores de efeito entre variantes genéticas e a composição do microbioma intestinal, segundo literatura encontrada na revisão sistemática, as seguintes variáveis coletadas no acompanhamento de perinatal: paridade, IMC pré-gestacional, consumo de fumo/álcool durante a gestação, idade gestacional, peso ao nascer, sexo, cor da pele e duração da amamentação (Quadro 4). Ainda, a ancestralidade genômica pode ser considerada como um possível confundidor na associação entre diferentes frequências de variantes genéticas e diferenças na composição do microbioma intestinal, esse confundimento é chamado de estratificação populacional (Figura 6). Sexo e idade, representados pelos balões azuis no DAG, foram incluídos no modelo apesar de não serem confundidores por definição, mas por serem determinantes do desfecho.

Quadro 4. Apresentação das variáveis que serão usadas no artigo 2.

Variável	Tipo de variável	Descrição
Perinatal		
Paridade	Numérica discreta	Número de partos, incluindo o da criança do estudo e o de recém-nascidos vivos ou mortos
IMC pré-gestacional	Numérica contínua	Valor obtido a partir do peso no início da gestação e altura, expresso por kg/m ² .
Tabagismo na gestação	Categórica nominal	Sim/Não
Consumo de álcool na gestação	Categórica nominal	Sim/Não
Idade gestacional	Numérica discreta	Em semanas
Peso ao nascer	Numérica contínua	Peso em gramas
Sexo da/o adolescente	Categórica dicotômica	Feminino/masculino
Cor da pele	Categórica nominal	Branca, preta, parda, amarela/indígena
Outras características		
Duração da amamentação	Categórica nominal	Em meses e dias

Será utilizado também ajuste para ponderação pelos pesos da amostragem, introduzindo pesos amostrais nos cálculos das estimativas. Essa ponderação é calculada pelo inverso da probabilidade de ser selecionado devido a amostragem estratificada a partir dos estratos de escore-z de IMC para idade. Esse procedimento é necessário para estimar corretamente estimativas de frequência e, em alguns casos, estimativas de associação.

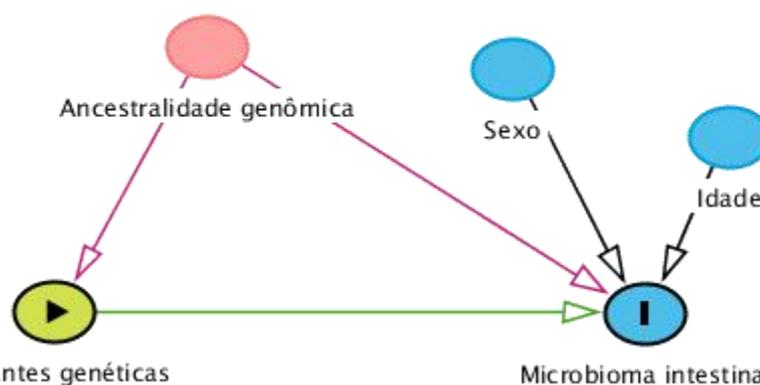


Figura 6 Variantes genéticas Microbioma intestinal Gráfico acíclico direcionado (DAG) representando os efeitos das variáveis sob o microbioma intestinal. A seta verde representa o caminho causal entre as variantes genéticas e microbioma intestinal. As setas vermelhas representam os possíveis caminhos enviesantes da relação.

Plano de análise de dados

Com base nas OTUs, será calculado o índice de diversidade alfa, em nível de gênero e filo, através de: índice de diversidade de Simpson, riqueza observada e estimativa de riqueza Chao1, no *software* Qiime. As diferenças estatísticas entre a diversidade alfa da população serão testadas usando One-way ANOVA e Kruskal-Wallis H e as comparações aos pares serão calculadas usando o teste T e o teste de soma de classificação de Wilcoxon (Mann-Whitney U) no pacote estatístico Stata 14.0 (Stata Corporation, CollegeStation, USA).

Para todas as outras análises, as contagens taxonômicas de amostras diferentes de zero serão transformadas em logaritmo natural e ajustadas para potenciais efeitos de covariáveis usando regressão logística. As análises serão realizadas através do pacote estatístico Stata 14.0 (Stata Corporation, CollegeStation, USA). Serão consideradas associadas ao desfecho aquelas variáveis com valor $p < 0,05$. Para corrigir a aplicação de múltiplos testes, uma correção de Bonferroni será utilizada.

7.3. Metodologia do artigo 3

Para este manuscrito, será utilizada a mesma subamostra da Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas descrita no artigo 2.

O objetivo será investigar a relação entre o consumo de alimentos ultraprocessados e as características quantitativas (diversidade alfa e abundância relativa) do microbioma intestinal.

7.3.1 Delineamento

Estudo observacional de delineamento longitudinal prospectivo, conduzido a partir de dados de acompanhamento dos participantes seguido de avaliação de exposições ocorridas anteriormente ao desfecho de interesse (microbioma intestinal). Isso permite contemplar a temporalidade, um dos principais critérios de Bradford Hill (Hill, 2015) para inferência de causalidade entre uma exposição e um desfecho.

7.3.2. Critérios de elegibilidade para o atual estudo

Para serem incluídos no estudo, os indivíduos deverão ser participantes da Coorte de Nascimento de 2004, terem participado do estudo perinatal e dos acompanhamentos subsequentes aos seis, onze e doze anos de idade; ter informações sobre consumo alimentar aos seis, onze e doze anos; não ser gemelar; ter participado do subestudo do Microbioma.

7.3.3. Instrumentos de coleta de dados

7.3.3.1. *Instrumento para coleta da exposição*

A exposição será o consumo de alimentos ultraprocessados aos 6, 11 e 12 anos de idade. Para avaliação do consumo de alimentos ultraprocessados serão utilizados os dados provenientes de QFA. O QFA tem sido considerado o método de escolha em estudos epidemiológicos por permitir avaliar o consumo habitual dos indivíduos (Willett, 2012). O QFA das coortes de Pelotas é um

questionário que busca captar a frequência de consumo dos últimos 12 meses anteriores a entrevista (Schneider et al., 2016; Vaz et al., 2021). O participante é apresentado a uma lista de alimentos e solicitado a responder com que frequência cada item foi usualmente consumido (vezes por dia, semanas, mês, ou nunca/quase nunca) e indicar se o consumo foi igual, menor ou maior em relação a uma referência de porção média apresentada para cada item alimentar.

O QFA do acompanhamento aos seis anos foi aplicado por entrevistadora ao responsável pelo participante em entrevista realizada na Clínica Médica no Centro de Pesquisas Amílcar Gigante (I. S. Santos et al., 2010) e continha 54 itens alimentares. Este QFA foi validado com base em três recordatórios alimentares de 24 horas, sendo a correlação de Pearson de 0,50 ou mais para macronutrientes, cálcio, ferro, sódio, vitamina C, colesterol e gordura saturada (resultados não publicados). No acompanhamento aos onze anos de idade, o QFA aplicado continha 89 itens alimentares e foi autoaplicado pela mãe ou responsável pelo adolescente no Centro de Pesquisas Amílcar Gigante, com apoio do pessoal de campo (Vaz et al., 2021). Já o QFA utilizado no subestudo do microbioma intestinal, aos 12 anos, continha 89 itens e foi aplicado no domicílio em versão eletrônica ao adolescente, sendo aplicado pela entrevistadora ao participante, que acompanhava as perguntas com fotos das porções médias dos alimentos.

7.3.4. Análise dos dados

7.3.4.1 Operacionalização da exposição

Será calculada a proporção de calorias proveniente do grupo de alimentos ultraprocessados aos 6, 11 e 12 anos de idades. Além disso, será calculada a quantidade de gramas de cada alimento, a partir da frequência diária de consumo e da porção média, o valor energético proveniente destes alimentos será obtido a partir da multiplicação da quantidade em gramas de carboidratos e proteínas por quatro quilocalorias, e de lipídeos por nove quilocalorias. O consumo de alimentos ultraprocessados será, então, operacionalizado com base na classificação NOVA (BRASIL, 2014).

7.3.4.2. Operacionalização do desfecho

O processo de extração de DNA e sequenciamento do microbioma bacteriano estão descritos na seção 7.2.4.2.

A composição do microbioma intestinal será medida através da abundância, índices de diversidade alfa e diversidade beta. Também será investigada a proporção de filos Bacteroidetes:Firmicutes (B:F), previamente descrita na literatura.

7.3.4.3. Operacionalização dos confundidores

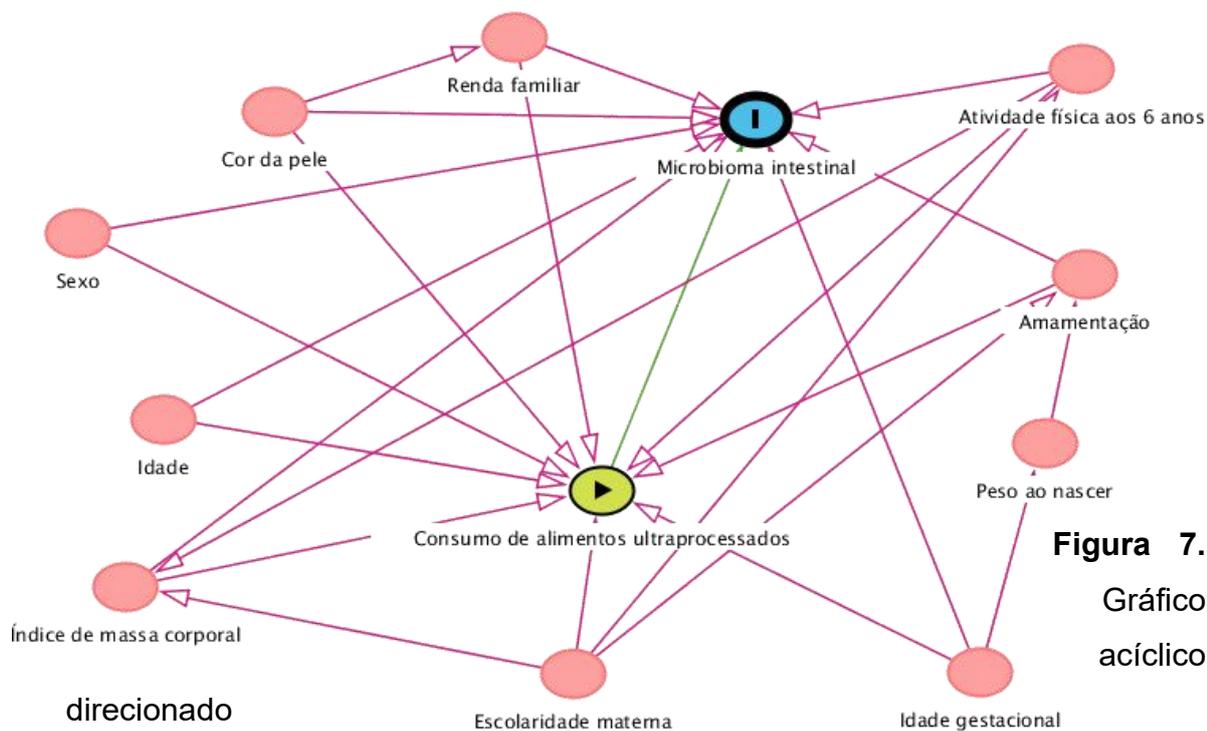
Quadro 5. Apresentação das variáveis que serão usadas no artigo 3.

Variável	Tipo de variável	Descrição
Variável do adolescente		
Sexo	Categórica nominal	Branca, preta, parda, amarela/indígena
Idade	Numérica discreta	Idade em anos
IMC	Numérica contínua	Peso e comprimento do adolescente expresso em kg/m ²
Atividade física	Numérica contínua	Valores contínuos expressos em unidades de aceleração (g), coletado por acelerômetros aos 6-7 anos
Ingestão energética proveniente de AUP	Numérica contínua	Expresso em quilocalorias
Ingestão energética dos demais alimentos	Numérica contínua	Expresso em quilocalorias
%VET* proveniente de ultraprocessados	Numérica contínua	Percentual de contribuição energética do consumo de AUP
Nível socioeconômico (Índice econômico Nacional – IEN)	Categórica ordinal	Quintis de pontuação

Características do parto e pós parto		
Tipo de parto	Categórica nominal	Parto normal ou cesariana
Peso ao nascer	Numérica contínua	Peso em gramas
Idade gestacional	Numérica discreta	Em semanas
Duração da amamentação	Categórica nominal	Em meses e dias
Idade de introdução de alimentos	Numérica discreta	Em meses e dias

*VET = valor energético total

Além do ajuste para variáveis do perinatal e de características do adolescente relatados como confundidores em estudos anteriormente (Quadro 5), será utilizado ajuste para ponderação pelos pesos da amostragem, conforme descrito anteriormente, na seção 7.2.5. Destacamos que as relações causais entre as variáveis do estudo são apresentadas no DAG (Figura 7). Foram incluídas no modelo também variáveis coletadas no acompanhamento do perinatal e variáveis comportamentais, como atividade física, pois se mostram associadas a exposição (consumo de alimentos ultraprocessados) em estudos prévios (Askari, Heshmati, Shahinfar, Tripathi, & Daneshzad, 2020; Ruíz-Roso et al., 2020).



representando os efeitos das variáveis sob o microbioma intestinal. A seta verde indica o caminho causal entre exposição e desfecho. As setas vermelhas representam os possíveis caminhos enviesantes da relação entre o consumo de AUP e composição do microbioma intestinal.

7.3.5. Plano de análise

Uma trajetória de consumo de AUP entre 6 e 12 anos será criada a partir da variável de %VET de ultraprocessados, obtida do QFA em três pontos do tempo (acompanhamentos). Para elaborar as trajetórias os dados serão analisados em dois estágios. Primeiro, com modelagem semi paramétrica para identificar as diferentes trajetórias de acordo com o QFA aos 6, 11 e 12 anos da criança, estimados com o comando “*traj*” do *software* STATA® (StataCorp). A escolha do número e das trajetórias será realizada de acordo com a sua interpretabilidade, além de considerar o melhor ajuste de modelo (critério máximo de informação *bayesiana* – BIC). Para verificar se os grupos foram adequadamente traçados, será avaliada a contribuição das covariáveis de ajuste

aos grupos formados. No segundo estágio será avaliada a contribuição das características maternas e dos participantes aos grupos de consumo de AUP. Os grupos poderão ser comparados de acordo com essas características usando análise de variância (para variáveis contínuas) e teste qui-quadrado (variáveis categóricas). Modelos de regressão logística serão utilizados para obter medida de associação para as trajetórias geradas e os desfechos de microbioma intestinal aos 12 anos. Para o modelo multivariável, pretende-se controlar para os possíveis confundidores: sexo, idade, peso ao nascer, cor da pele, idade gestacional, tipo de parto, aleitamento materno, renda familiar, escolaridade materna, atividade física aos 6 anos e IMC (apresentadas na Figura 7). Todas as análises serão realizadas no *software* STATA, assumindo um nível de significância de 5%.

8. Aspectos éticos

O estudo perinatal e os acompanhamentos da Coorte de 2004 que serão utilizados neste projeto foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), sob os seguintes ofícios: 4.06.01.116 no perinatal, 35/10 no acompanhamento aos seis anos e 889.753 no acompanhamento aos dez anos de idade). Mães e responsáveis dos participantes concordaram em participar de cada acompanhamento, assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em cada uma das visitas. Aos 11 anos, os adolescentes também consentiram em participar do estudo firmando o Termo de Assentimento.

Ademais, no acompanhamento do subestudo do microbioma, um projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMED - UFPeL sob os números de protocolos 1.896.438 e 2.266.020. Para que fosse possível o envio das amostras de fezes para análise no Canadá, foi necessária aprovação pelo Conselho Nacional de Saúde (CONEP) sob registros 2.306.259 e 2.372.760 e coleta de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido específicos.

9. Orçamento/Financiamento

O acompanhamento dos seis anos da Coorte de Nascimentos de 2004 foi financiado pela *Wellcome Trust* e o acompanhamento dos onze anos, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Fases anteriores do estudo foram financiadas pela Organização Mundial de Saúde, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Saúde e Pastoral da Criança (I. S. Santos et al., 2010; I. S. Santos et al., 2014). O acompanhamento do subestudo do microbioma foi financiado pelo "Microbiome and Nutrition Collaborative Grant".

A doutoranda Etienne Dias Alves recebe bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

10. Cronograma

Ano	Trimestre	2021				2022				2023				2024			
		1º	2º	3º	4º												
	Definição do tema																
	Revisão bibliográfica																
	Submissão do plano de trabalho																
	Elaboração do projeto																
	Qualificação do projeto																
	Redação do artigo 1																
	Submissão do artigo 1																
	Análise dos dados dos demais artigos																
	Redação dos demais artigos																
	Finalização da tese																
	Defesa da tese																
	Divulgação dos resultados																

11. Divulgação dos Resultados

Os resultados serão divulgados na forma de artigos científicos em revistas nacionais e/ou internacionais, devidamente indexadas, desde que o periódico seja adequado ao tema e ao público que queremos atingir. Além disso, um comunicado à imprensa será enviado, com texto em linguagem acessível, permitindo a divulgação dos resultados a nível local.

REFERÊNCIAS

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*, 6(1946-6242 (Electronic)), 237rs265-237ra265. doi:10.1126/scitranslmed.3008599
- Agans, R., Rigsbee, L., Kenche, H., Michail, S., Khamis, H. J., & Paliy, O. (2011). Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *FEMS Microbiol Ecol.*, 77(1574-6941 (Electronic)), 404-412. doi:10.1126/scitranslmed.3008599
- Askari, M., Heshmati, J., Shahinfar, H., Tripathi, N., & Daneshzad, E. (2020). Ultra-processed food and the risk of overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *International Journal of Obesity*, 44(10), 2080-2091. doi:10.1038/s41366-020-00650-z
- Awany, D., Allali, I., Dalvie, S., Hemmings, S., Mwaikono, K. S., Thomford, N. E., . . . Chimusa, E. R. (2019). Host and Microbiome Genome-Wide Association Studies: Current State and Challenges. 9, 9, 637. doi:10.3389/fgene.2018.00637
- Aya, V., Flórez, A., Perez, L., & Ramírez, J. A.-O. (2021). Association between physical activity and changes in intestinal microbiota composition: A systematic review. *PLoS One*, 16(1932-6203 (Electronic)), e0247039.
- Barko, P. C., McMichael, M. A.-O., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med*, 32(1939-1676 (Electronic)), 9-25.
- Bergström, A., Simpson, J., Salinas, F., Barré, B., Parts, L., Zia, A., . . . Liti, G. (2014). A high-definition view of functional genetic variation from natural yeast genomes. *Molecular biology and evolution*, 31(1537-1719 (Electronic)), 872-888.
- Blaut, M., Collins, M., Welling, G. W., Doré, J., van Loo, J., & de Vos, W. (2002). Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. (0007-1145 (Print)).
- Blekhman, R., Goodrich, J. K., Huang, K., Sun, Q., Bukowski, R., Bell, J. T., . . . Clark, A. G. (2015). Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology*, 16(1), 191. doi:10.1186/s13059-015-0759-1
- Bolte, L. A., Vich Vila, A., Imhann, F., Collij, V., Gacesa, R., Peters, V., . . . Weersma, R. K. (2021). Long-term dietary patterns are associated with pro-inflammatory and anti-inflammatory features of the gut microbiome. *Gut*, 70(7), 1287-1298. doi:10.1136/gutjnl-2020-322670
- Bonder, M. J., Kurilshikov, A., Tigchelaar, E. F., Mujagic, Z., Imhann, F., Vila, A. V., . . . Zhernakova, A. (2016). The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nature Genetics*, 48(11), 1407-1412. doi:10.1038/ng.3663

- Booth, B. D., Murphy, S. D., & Swanton, C. J. (2003). *Weed Ecology in Natural and Agricultural Systems*.
- Bowden, J., Davey Smith, G., & Burgess, S. (2015). Mendelian randomization with invalid instruments: effect estimation and bias detection through Egger regression. *Int J Epidemiol.*(1464-3685 (Electronic)).
- Bowden, J., Davey Smith, G., Haycock, P. C., & Burgess, S. (2016). Consistent Estimation in Mendelian Randomization with Some Invalid Instruments Using a Weighted Median Estimator. *Genet Epidemiol.*(1098-2272 (Electronic)).
- Bowyer, R. C. E., Jackson, M. A., Le Roy, C. I., Ni Lochlainn, M., Spector, T. D., Dowd, J., & Steves, C. (2019). Socioeconomic Status and the Gut Microbiome: A TwinsUK Cohort Study. LID - 10.3390/microorganisms7010017 [doi] LID - 17. (2076-2607 (Print)).
- BRASIL. (2014). *Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira*. Brasília - DF
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. doi:10.1038/nmeth.3869
- Cani, P. A.-O. (2018). Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut.*, 67(1468-3288 (Electronic)). doi:10.1136/gutjnl-2018-316723
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., . . . Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 7(1548-7105 (Electronic)).
- Caporaso, J. G., Lauber Cl Fau - Walters, W. A., Walters Wa Fau - Berg-Lyons, D., Berg-Lyons D Fau - Huntley, J., Huntley J Fau - Fierer, N., Fierer N Fau - Owens, S. M., . . . Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.*, 6(1751-7370 (Electronic)).
- Carvalho-Wells, A. L., Helmolz, K., Nodet, C., Molzer, C., Leonard, C., McKeivith, B., . . . Tuohy, K. M. (2010). Determination of the in vivo prebiotic potential of a maize-based whole grain breakfast cereal: a human feeding study. *British Journal of Nutrition*, 104(9 (Electronic)), 1353-1356. doi:10.1017/S0007114510002084
- Cavalcante, R. M. S., Lima, M. M., Parente, J. M. L., & Nogueira, N. d. N. (2020). O papel da microbiota na etiologia das doenças inflamatórias intestinais. *RBONE - Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, 14(86), 498-510.
- Chao, A. (1984). Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scand J Statist*, 11, 265-270.
- Checa-Ros, A., Jeréz-Calero, A., Molina-Carballo, A., Campoy, C., & Muñoz-Hoyos, A. (2021).

Current Evidence on the Role of the Gut Microbiome in ADHD Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Nutrients*(2072-6643 (Electronic)).

Chong-Neto, H. J., Pastorino, A. C., Melo, A., Medeiros, D., Kuschnir, F. C., Alonso, M. L. O., . . . Barreto, B. A. P. (2019). A microbiota intestinal e sua interface com o sistema imunológico. *Brazilian Journal of Allergy and Immunology*, 3(4), 406. doi:10.5935/2526-5393.20190055

Clemente, J. C., Ursell, L., Parfrey, L., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(1097-4172 (Electronic)). doi:10.1016/j.cell.2012.01.035

Cohen, L. J., Esterhazy, D., Kim, S. H., Lemetre, C., Aguilar, R. R., Gordon, E. A., . . . Brady, S. F. (2017). Commensal bacteria make GPCR ligands that mimic human signalling molecules. (1476-4687 (Electronic)).

Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., & Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*, 6(1), 23129. doi:10.1038/srep23129

Coluccia, E., Iardino, P., Pappalardo, D., Brigida, A. L., Formicola, V., De Felice, B., . . . De Magistris, L. (2019). Congruency of Genetic Predisposition to Lactase Persistence and Lactose Breath Test. LID - 10.3390/nu11061383 [doi] LID - 1383. (2072-6643 (Electronic)).

Cong, J., & Zhang, X. (2018). How human microbiome talks to health and disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(1435-4373 (Electronic)), 1595- 1601. doi:10.1007/s10096-018-3263-1

Costabile, A., Klinder, A., Fava, F., Napolitano, A., Fogliano, V., Leonard, C., . . . Tuohy, K. M. (2008). Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. (0007-1145 (Print)).

Cuevas-Sierra, A., Milagro, F. I., Aranaz, P., Martínez, J. A., & Riezu-Boj, J. I. (2021). Gut Microbiota Differences According to Ultra-Processed Food Consumption in a Spanish Population. *Nutrients*, 13(8). doi:10.3390/nu13082710

Davenport, E. R., Cusanovich, D. A., Michelini, K., Barreiro, L. B., Ober, C., & Gilad, Y. (2015). Genome-Wide Association Studies of the Human Gut Microbiota. (1932-6203 (Electronic)).

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., . . .

Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 23(1476-4687 (Electronic)). doi:10.1038/nature12820

De Filippo, C., Di Paola, M., Giani, T., Tirelli, F., & Cimaz, R. (2019). Gut microbiota in children and altered profiles in juvenile idiopathic arthritis. *J Autoimmun.*(1095-9157 (Electronic)).

del Castillo, M. C. M., Valladares-García, J., & Halabe-Cherem, J. (2018). Human Microbiome. *Revista de la Facultad de Medicina UANM*, 61(6), 7-19.

doi:10.22201.fm.24484865e.2018.61.6.02

- Dobbler, P. T., Procianoy, R. S., Mai, V., Silveira, R. C., Corso, A. L., Rojas, B. S., & Roesch, L. F. W. (2017). Low Microbial Diversity and Abnormal Microbial Succession Is Associated with Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *Front. Microbiol.*(1664-302X (Print)).
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*(1091- 6490 (Electronic)).
- Dominianni, C., Sinha, R., Goedert, J. J., Pei, Z., Yang, L., Hayes, R. B., & Ahn, J. (2015). Sex, body mass index, and dietary fiber intake influence the human gut microbiome. *PLoS One.*(1932-6203 (Electronic)).
- Donnet-Hughes, A., Perez, P., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., . . . Schiffrin, E. J. (2010). Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proc Nutr Soc*, 69(1475-2719 (Electronic)).
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*(1367-4811 (Electronic)).
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods*(1548-7105 (Electronic)).
- Edgar, R. C. (2016). UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *bioRxiv*, 081257. doi:10.1101/081257
- Estrada-Velasco, B. I., Cruz, M., Garcia-Mena, J., Valladares Salgado, A., Peralta Romero, J., Guna Serrano Mde, L., . . . Burguete-García, A. I. (2014). [Childhood obesity is associated to the interaction between firmicutes and high energy food consumption]. *Nutr Hosp*, 31(3), 1074-1081. doi:10.3305/nh.2015.31.3.8302
- Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., . . . Raes, J. (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. *352*(6285), 560-564. doi:doi:10.1126/science.aad3503
- Figge, A., Sydor, S., Wenning, C., Manka, P., Assmuth, S., Vilchez-Vargas, R., . . . Bechmann, L. P. (2021). Gender and gut microbiota composition determine hepatic bile acid, metabolic and inflammatory response to a single fast-food meal in healthy adults. *Clin Nutr*, 40(5), 2609-2619. doi:10.1016/j.clnu.2021.04.008
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes.*, 3(1949-0984 (Electronic)).
- Fredrik, B., Ruth E, L., Justin L., S., Daniel A., P., & Jeffrey I., G. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(1095-9203 (Electronic)), 1915-1920. doi:10.1126/science.1104816

- Freidin, M. A.-O., Stalteri, M. A., Wells, P. M., Lachance, G., Baleanu, A. F., Bowyer, R. C. E., . . . Williams, F. M. K. (2021). An association between chronic widespread pain and the gut microbiome. (1462-0332 (Electronic)).
- Gao, B., Chi, L., Zhu, Y., Shi, X., Tu, P., Li, B., . . . Schnabl, B. (2021). An Introduction to Next Generation Sequencing Bioinformatic Analysis in Gut Microbiome Studies. *Biomolecules*, *11*(4). doi:10.3390/biom11040530
- Garcia-Ribera, S., Amat-Bou, M., Climent, E., Llobet, M., Chenoll, E., Corripio, R., . . . Lerin, C. (2020). Specific Dietary Components and Gut Microbiota Composition are Associated with Obesity in Children and Adolescents with Prader-Willi Syndrome. *Nutrients*, *12*(4). doi:10.3390/nu12041063
- García-Vega, Á., Corrales-Agudelo, V., Reyes, A., & Escobar, J. S. (2020). Diet Quality, Food Groups and Nutrients Associated with the Gut Microbiota in a Nonwestern Population. *Nutrients*, *12*(10). doi:10.3390/nu12102938
- García-Vega Á, S., Corrales-Agudelo, V., Reyes, A., & Escobar, J. S. (2020). Diet Quality, Food Groups and Nutrients Associated with the Gut Microbiota in a Nonwestern Population. *Nutrients*, *12*(10). doi:10.3390/nu12102938
- Garud, N. R., & Pollard, K. S. (2020). Population Genetics in the Human Microbiome. *Trends Genet.*, *36*(0168-9525 (Print)).
- Gentile, C. A.-O., & Weir, T. L. (2018). The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*, *362*(1095-9203 (Electronic)), 776-780. doi:10.1126/science.aau5812
- Gibiino, G., Lopetuso, L. R., Scaldaferrì, F., Rizzatti, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2018). Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. *Digestive and Liver Disease*, *50*(7), 635-639. doi:[10.1016/j.dld.2018.03.016](https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.03.016)
- Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, *113*(12), 2019-2040. doi:10.1007/s10482-020-01474-7
- Goodrich, J., Davenport, E. R., Beaumont, M., Jackson, M. A., Knight, R., Ober, C., . . . Ley, R. E. (2016). Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. (1934-6069 (Electronic)).
- Goodrich, Julia K., Davenport, Emily R., Beaumont, M., Jackson, Matthew A., Knight, R., Ober, C., . . . Ley, Ruth E. (2016). Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell Host & Microbe*, *19*(5), 731-743. doi:[10.1016/j.chom.2016.04.017](https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.017)
- Goodrich, J. K., Davenport, E. R., Beaumont, M., Jackson, M. A., Knight, R., Ober, C., . . . Ley, R. E. (2016a). Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. (1934-6069 (Electronic)).
- Goodrich, J. K., Davenport, E. R., Beaumont, M., Jackson, M. A., Knight, R., Ober, C., . . . Ley, R. E. (2016b). Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell host & microbe*, *19*(1934-6069 (Electronic)), 731-743. doi:10.1016/j.chom.2016.04.017

- Greiner, T., & Bäckhed, F. (2011). Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.*, 22(1879-3061 (Electronic)), 117-123. doi:10.1016/j.tem.2011.01.002
- Gschwendtner, S., Kang, H., Thiering, E., Kublik, S., Fösel, B., Schulz, H., . . . Standl, M. (2019). Early life determinants induce sustainable changes in the gut microbiome of six-year-old children. *Scientific Reports*, 9(1), 12675. doi:10.1038/s41598-019-49160-7
- Hamady, M., & Knight, R. (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res.*, 19(1088-9051 (Print)).
- Handelsman, J., Rondon, M., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, 5(1074-5521 (Print)), R245-R249. doi:10.1016/S1074-5521(98)90108-9
- Harris, P. A., Taylor, R., Thielke, R., Payne, J., Gonzalez, N., & Conde, J. G. (2009). Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*(1532-0480 (Electronic)).
- Hentges, D. J., Maier, B. R., Burton, G. C., Flynn, M. A., & Tsutakawa, R. K. (1977). Effect of a high-beef diet on the fecal bacterial flora of humans. *Cancer research*, 37(2), 568-571.
- Hill, A. B. (2015). THE ENVIRONMENT AND DISEASE: ASSOCIATION OR CAUSATION? *Emerg Themes Epidemiol*, 12(0035-9157 (Print)).
- Hollister, E. B., Riehle, K., Luna, R. A., Weidler, E. M., Rubio-Gonzales, M., Mistretta, T.-A., . . . Muzny, D. M. J. M. (2015). Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome*, 3(1), 1-13. doi:10.1186/s40168-015-0101-x
- Hopkins, M., Sharp, R., & Macfarlane, G. (2002). Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Disease*(1590-8658 (Print)).
- Hughes, D. A.-O., Bacigalupe, R., Wang, J., Rühlemann, M. A.-O., Tito, R. Y., Falony, G. A.-O., . . . Raes, J. A.-O. X. (2020). Genome-wide associations of human gut microbiome variation and implications for causal inference analyses. (2058-5276 (Electronic)).
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., . . . The Human Microbiome Project, C. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214. doi:10.1038/nature11234
- Ibáñez, L., Rouleau, M., Wakkach, A., & Blin-Wakkach, C. (2019). Gut microbiome and bone. *J Joint Bone Spine*, 86(1), 43-47.
- Ihekweazu, F. D., & Versalovic, J. (2018). Development of the Pediatric Gut Microbiome: Impact on Health and Disease. *American journal of the medical sciences*, 356(1538- 2990 (Electronic)), 413-423. doi:10.1016/j.amjms.2018.08.005

- Ishida, S., Kato, K., Tanaka, M. A.-O., Odamaki, T., Kubo, R., Mitsuyama, E., . . . Miyano, S. (2020). Genome-wide association studies and heritability analysis reveal the involvement of host genetics in the Japanese gut microbiota. (2399-3642 (Electronic)).
- Jethwani, P., & Grover, K. (2019). Gut Microbiota in Health and Diseases – A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9, 1586-1599. doi:[10.20546/ijcmas.2019.808.187](https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.808.187)
- Jin, D., Wu, S., Zhang, Y. G., Lu, R., Xia, Y., Dong, H., & Sun, J. (2015). Lack of Vitamin D Receptor Causes Dysbiosis and Changes the Functions of the Murine Intestinal Microbiome. (1879-114X (Electronic)).
- Jupp, S., Gibson, A., Malone, J., & Stevens, R. (2012). *Taking a view on bio-ontologies*. Paper presented at the ICBO.
- Karkow, F. J. A., Faintuch, J., & Karkow, A. G. M. (2007). Probióticos: perspectivas médicas. *Rev. AMRIGS*, 38-48.
- Keim, N. L., & Martin, R. (2014). Dietary whole grain–microbiota interactions: insights into mechanisms for human health. *Advances in Nutrition*, 5(5), 556-557.
- Kim, Y. S., Unno, T., Kim, B.-Y., & Park, M.-S. (2019). Sex Differences in Gut Microbiota. *wjmh*, 38(1), 48-60. doi:10.5534/wjmh.190009
- Koleva, P. T., Bridgman, S. L., & Kozyrskyj, A. L. (2015). The infant gut microbiome: evidence for obesity risk and dietary intervention. *Nutrients*(2072-6643 (Electronic)).
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*, 79(17), 5112-5120. doi:10.1128/AEM.01043-13
- Kundu, P., Blacher, E., Elinav, E., & Pettersson, S. (2017). Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. *Cell*, 171(7), 1481-1493. doi:[10.1016/j.cell.2017.11.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.024)
- Kurilshikov, A., Medina-Gomez, C., Bacigalupe, R., Radjabzadeh, D., Wang, J., Demirkan, A., . . . Zhernakova, A. (2021). Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition. *Nat Genet*, 53(2), 156-165. doi:10.1038/s41588-020-00763-1
- Kurilshikov, A., Medina-Gomez, C., Bacigalupe, R., Radjabzadeh, D., Wang, J., Demirkan, A., . . . Zhernakova, A. (2021). Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition. (1546-1718 (Electronic)).
- Kurilshikov, A., Wijmenga, C., Fu, J., & Zhernakova, A. (2017). Host Genetics and Gut Microbiome: Challenges and Perspectives. *Trends Immunol.*, 38(1471-4981 (Electronic)).
- Kurilshikov, A. A.-O., Medina-Gomez, C. A.-O., Bacigalupe, R. A.-O. X., Radjabzadeh, D., Wang, J., Demirkan, A., . . . Zhernakova, A. A.-O. (2021). Large-scale association analyses identify host

- factors influencing human gut microbiome composition. (1546-1718 (Electronic)).
- Lapidot, Y., Reshef, L., Maya, M., Cohen, D., Gophna, U., & Muhsen, K. (2022). Socioeconomic disparities and household crowding in association with the fecal microbiome of school- age children. *npj Biofilms and Microbiomes*, *8*(1), 10. doi:10.1038/s41522-022-00271-6
- Lawrence, M. A., & Baker, P. I. (2019). Ultra-processed food and adverse health outcomes. *BMJ*, *365*, l2289. doi:10.1136/bmj.l2289
- Lederberg, J., & McCray, A. (2001). Ome SweetOmics--A genealogical treasury of words. *The scientist*, *15*(7), 8-8.
- Leitch, E. C. M., Walker, A. W., Duncan, S. H., Holtrop, G., & Flint, H. (2007). Selective colonization of insoluble substrates by human faecal bacteria. *Environmental microbiology*, *9*(3), 667-679.
- Li, F., Yan, Y., Zhang, J., Zhang, Q., & Niu, J. (2021). Taxonomic, functional, and phylogenetic beta diversity in the Inner Mongolia grassland. *Global Ecology and Conservation*, *28*, e01634. doi:[10.1016/j.gecco.2021.e01634](https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01634)
- Liang, D., Leung, R. K.-K., Guan, W., & Au, W. W. (2018). Involvement of gut microbiome in human health and disease: brief overview, knowledge gaps and research opportunities. *Gut Pathogens*, *10*(1), 1-9. doi:10.1186/s13099-018-0230-4
- Liu, X., Tang, S., Zhong, H., Tong, X., Jie, Z., Ding, Q., . . . Zhang, T. (2021). A genome-wide association study for gut metagenome in Chinese adults illuminates complex diseases. *Cell Discovery*, *7*(1), 9. doi:10.1038/s41421-020-00239-w
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, *8*(1), 51. doi:10.1186/s13073-016-0307-y
- Lopera-Maya, E. A., Kurilshikov, A. A.-O., van der Graaf, A. A.-O., Hu, S., Andreu-Sánchez, S. A.-O., Chen, L. A.-O., . . . Sanna, S. A.-O. (2022a). Effect of host genetics on the gut microbiome in 7,738 participants of the Dutch Microbiome Project. *Nat. Genet.*(1546- 1718 (Electronic)).
- Lopera-Maya, E. A., Kurilshikov, A. A.-O., van der Graaf, A. A.-O., Hu, S., Andreu-Sánchez, S. A.-O., Chen, L. A.-O., . . . Sanna, S. A.-O. (2022b). Effect of host genetics on the gut microbiome in 7,738 participants of the Dutch Microbiome Project. (1546-1718 (Electronic)).
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, *489*(7415), 220-230. doi:10.1038/nature11550
- Macfarlane, G. T., Cumming, J. H., & Allison, C. (1986). Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol.*, *132*(0022-1287 (Print)).
- Makino, H., Kushiro, A., Ishikawa, E., Kubota, H., Gawad, A., Sakai, T., . . . Tanaka, R. (2013). Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early

- development of vaginally delivered infant's microbiota. *PLoS One*(1932-6203 (Electronic)).
- Malone, J., Holloway, E., Adamusiak, T., Kapushesky, M., Zheng, J., Kolesnikov, N., . . . Parkinson, H. (2010). Modeling sample variables with an Experimental Factor Ontology. *Bioinformatics*(1367-4811 (Electronic)).
- Martins-Silva, T., Salatino-Oliveira, A., Genro, J. P., Meyer, F. D. T., Li, Y., Rohde, L. A., . . . Tovo-Rodrigues, L. (2021). Host genetics influences the relationship between the gut microbiome and psychiatric disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *106*, 110153. doi:[10.1016/j.pnpbp.2020.110153](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110153)
- Matsuyama, M., Morrison, M., Cao, K.-A. L., Pruihl, S., Davies, P. S. W., Wall, C., . . . Hill, R. J. (2019). Dietary intake influences gut microbiota development of healthy Australian children from the age of one to two years. *Scientific Reports*, *9*(1), 12476. doi:10.1038/s41598-019-48658-4
- Melo, B. R. C. d., & Oliveira, R. S. B. d. (2018). Prevalência de disbiose intestinal e sua relação com doenças crônicas não transmissíveis em estudantes de uma Instituição de Ensino Superior de Fortaleza-CE. *RBONE - Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, *12*(74), 767-775.
- Meyer, K. (2007). Multivariate analyses of carcass traits for Angus cattle fitting reduced rank and factor analytic models. (0931-2668 (Print)).
- Miller, G. E., Engen, P. A., Gillevet, P. M., Shaikh, M., Sikaroodi, M., Forsyth, C. B., . . .
- Keshavarzian, A. (2016). Lower Neighborhood Socioeconomic Status Associated with Reduced Diversity of the Colonic Microbiota in Healthy Adults. *PLoS One*, *11*(2), e0148952. doi:10.1371/journal.pone.0148952
- Mills, S., Stanton, C., Lane, J. A., Smith, G. J., & Ross, R. P. (2019). Precision Nutrition and the Microbiome, Part I: Current State of the Science. *Nutrients*, *11*(2072-6643 (Electronic)). doi:10.3390/nu11040923
- Mitsou, E. K., Kakali, A., Antonopoulou, S., Mountzouris, K. C., Yannakoulia, M., Panagiotakos, D. B., & Kyriacou, A. (2017). Adherence to the Mediterranean diet is associated with the gut microbiota pattern and gastrointestinal characteristics in an adult population. *Br J Nutr*, *117*(12), 1645-1655. doi:10.1017/s0007114517001593
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., & Altman, D. G. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med*, *151*(1539-3704 (Electronic)).
- Moore, R. E., & Townsend, S. D. (2019). Temporal development of the infant gut microbiome. *Open Biology*, *9*(9), 190128. doi:10.1098/rsob.190128
- Moran-Ramos, S., Lopez-Contreras, B. E., Villarruel-Vazquez, R., Ocampo-Medina, E., Macias-

- Kauffer, L., Martinez-Medina, J. N., . . . Ibarra-Gonzalez, I. (2020). Environmental and intrinsic factors shaping gut microbiota composition and diversity and its relation to metabolic health in children and early adolescents: A population-based study. *Gut Microbes.*, *11*(4), 900-917.
- Morgan, X. C., Segata, N., & Huttenhower, C. (2014). Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends in Genetics*, *29*(0168-9525 (Print)), 51-58. doi:10.1016/j.tig.2012.09.005
- Mourant, A., Kopeć, A., & Domaniewska-Sobczak, K. (1978). Blood Groups and Diseases, A Study of Associations of Diseases with Blood Groups and Other Polymorphisms, By A.E. Mourant, A.C. Kopeć and K. Domaniewska-Sobczak (London, U.K.). Oxford University Press, Oxford 1978. Hard cover with jacket, 28.5 × 22.5 cm, IX + 328 pp. Price: £ 25. *Acta geneticae medicae et gemellologiae*, *27*, 115-115. doi:10.1017/S0001566000009582
- Mudgil, D., & Barak, S. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: a review. *Int J Biol Macromol.*, *61*(1879-0003 (Electronic)).
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., . . . Blaut, M. (2006). Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. (0099-2240 (Print)).
- Neroni, B., Evangelisti, M., Radocchia, G., Di Nardo, G., Pantanella, F., Villa, M. P., & Schippa, S. (2021). Relationship between sleep disorders and gut dysbiosis: what affects what? *Sleep Medicine*, *87*, 1-7. doi:[10.1016/j.sleep.2021.08.003](https://doi.org/10.1016/j.sleep.2021.08.003)
- Ng, M. C., Hester, J. M., Wing, M. R., Li, J., Xu, J., Hicks, P. J., . . . Bowden, D. W. (2012). Genome-wide association of BMI in African Americans. (1930-739X (Electronic)).
- Nicholas A, B., Jennifer, C., Thomas, B., Nora, H., Melanie, J., Huilin, L., . . . Martin J, B. (2016). Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Science translational medicine*, *8*(1946-6242 (Electronic)), 343ra382-343ra382.
- Noh, H., Jang, H. H., Kim, G., Zouiouich, S., Cho, S. Y., Kim, H. J., . . . Freisling, H. (2021). Taxonomic Composition and Diversity of the Gut Microbiota in Relation to Habitual Dietary Intake in Korean Adults. *Nutrients*, *13*(2). doi:10.3390/nu13020366
- O'Keefe, S. J., Li, J. V., Lahti, L., Ou, J., Carbonero, F., Mohammed, K., . . . Zoetendal, E. G. (2015). Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nat Commun*, *6*, 6342. doi:10.1038/ncomms7342
- O'Toole, P. W., & Jeffery, I. B. (2015). Gut microbiota and aging. *Science*, *350*(1095-9203 (Electronic)), 1214-1215. doi:10.1126/science.aac8469
- Odum, E. P. (1988). *Ecologia*. Rio de Janeiro: Ed. In: Guanabara Koogan.
- Pacifici, G. M. (2006). Placental transfer of antibiotics administered to the mother: a review. *Int*

J Clin Pharmacol Ther, 44(0946-1965 (Print)).

Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *5*(7), e177.

Pannaraj, P. S., Li, F., Cerini, C., Bender, J. M., Yang, S., Rollie, A., . . . Aldrovandi, G. M. (2017). Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatr*, 171(2168-6211 (Electronic)).

Park, J., Kato, K., Murakami, H., Hosomi, K., Tanisawa, K., Nakagata, T., . . . Miyachi, M. (2021). Comprehensive analysis of gut microbiota of a healthy population and covariates affecting microbial variation in two large Japanese cohorts. *BMC Microbiol*, 21(1), 151. doi:10.1186/s12866-021-02215-0

Partula, V., Mondot, S., Torres, M. J., Kesse-Guyot, E., Deschasaux, M., Assmann, K., . . . Touvier, M. (2019). Associations between usual diet and gut microbiota composition: results from the Milieu Intérieur cross-sectional study. *Am J Clin Nutr*, 109(5), 1472- 1483. doi:10.1093/ajcn/nqz029

Paus, T., Keshavan, M., & Giedd, J. N. (2008). Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nature Reviews Neuroscience*, 9(12), 947-957. doi:10.1038/nrn2513

Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M.-C., Ramer-Tait, A. E., & Walter, J. (2017). A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, 5(1), 48-48. doi:10.1186/s40168-017-0268-4

Peterson, D., Bonham, K. S., Rowland, S., Pattanayak, C. W., & Klepac-Ceraj, V. (2021). Comparative Analysis of 16S rRNA Gene and Metagenome Sequencing in Pediatric Gut Microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 12. doi:10.3389/fmicb.2021.670336

Phay, J. E., Hussain, H., & Moley, J. F. (2000). Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). (0888-7543 (Print)).

Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of theoretical biology*, 13, 131-144.

Pires, E. S., Hardoim, C. C. P., Miranda, K. R., Secco, D. A., Lobo, L. A., de Carvalho, D. P., . . . Antunes, L. C. M. (2019). The Gut Microbiome and Metabolome of Two Riparian Communities in the Amazon. *10*. doi:10.3389/fmicb.2019.02003

Price, M. N., Dehal, P., & Arkin, A. P. (2009). FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol*, 26(1537-1719 (Electronic)).

Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., . . . Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), 55-60. doi:10.1038/nature11450

Qin, Y., Havulinna, A. S., Liu, Y., Jousilahti, P., Ritchie, S. C., Tokolyi, A., . . . Méric, G. (2022).

- Combined effects of host genetics and diet on human gut microbiota and incident disease in a single population cohort. *Nature Genetics*, 54(2), 134-142. doi:10.1038/s41588-021-00991-z
- Rinninella, E., Cintoni, M., Raoul, P., Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Pulcini, G., . . . Mele, M. C. (2019). Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. *Nutrients*, 11(2072-6643 (Electronic)), 2393. doi:10.3390/nu11102393
- Riva, A., Borgo, F., Lassandro, C., Verduci, E., Morace, G., Borghi, E., & Berry, D. (2017). Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environ Microbiol.*(1462-2920 (Electronic)).
- Rizzoli, R., Bianchi, M. L., Garabédian, M., McKay, H. A., & Moreno, L. A. (2010). Maximizing bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly. *Bone*, 46(1873-2763 (Electronic)), 294-305.
- Robertson, R. C., Manges, A. R., Finlay, B. B., & Prendergast, A. J. (2019a). The Human Microbiome and Child Growth - First 1000 Days and Beyond. *Trends Microbiol.*, 27(1878-4380 (Electronic)).
- Robertson, R. C., Manges, A. R., Finlay, B. B., & Prendergast, A. J. (2019b). The Human Microbiome and Child Growth - First 1000 Days and Beyond. *Trends Microbiol.*(1878- 4380 (Electronic)).
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *Peer J.*(2167-8359 (Print)).
- Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., . . . Segal, E. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, 555(1476-4687 (Electronic)), 201-215. doi:10.1038/nature25973
- Rühlemann, M. C., Hermes, B. M., Bang, C., Doms, S., Moitinho-Silva, L., Thingholm, L. B., . . . Franke, A. (2021). Genome-wide association study in 8,956 German individuals identifies influence of ABO histo-blood groups on gut microbiome. *Nature Genetics*, 53(2), 147-155. doi:10.1038/s41588-020-00747-1
- Ruíz-Roso, M. A.-O., de Carvalho Padilha, P., Matilla-Escalante, D. C., Brun, P. A.-O., Ulloa, N., Acevedo-Correa, D., . . . Dávalos, A. (2020). Changes of Physical Activity and Ultra- Processed Food Consumption in Adolescents from Different Countries during Covid-19 Pandemic: An Observational Study. LID - 10.3390/nu12082289 [doi] LID - 2289. *Nutrients*(2072-6643 (Electronic)).
- Russell, W. R., Hoyles, L., Flint, H. J., & Dumas, M.-E. (2013). Colonic bacterial metabolites and human health. *Current Opinion in Microbiology*, 16(3), 246-254. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.002>
- Saad, S. (2006). Probiotics and prebiotics: the state of the art. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 42(1), 1-

16.

Salvucci, E. (2019). The human-microbiome superorganism and its modulation to restore health. *International journal of food sciences and nutrition*, 70(7 (Electronic)), 781-795. doi:<https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1580682>

Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., . . . Mazmanian, S. K. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. (1097-4172 (Electronic)).

Santos. (2002). *O uso indiscriminado de antibióticos e a ecologia das bactérias-antibiótico-resistentes associadas à problemática da infecção hospitalar: conhecimento e prática de profissionais de saúde, à luz da ética da responsabilidade de Hans Jonas.*

Santos, I. S., Barros, A. J., Matijasevich, A., Domingues, M. R., Barros, F. C., & Victora, C. G. (2010). Cohort Profile: The 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *International Journal of Epidemiology*, 40(6), 1461-1468. doi:10.1093/ije/dyq130 %J International Journal of Epidemiology

Santos, I. S., Barros, A. J., Matijasevich, A., Zanini, R., Chrestani Cesar, M. A., Camargo-Figuera, F. A., . . . Victora, C. G. (2014). Cohort Profile Update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. Body composition, mental health and genetic assessment at the 6 years follow-up. *International Journal of Epidemiology*, 43(5), 1437-1437f. doi:10.1093/ije/dyu144 %J International Journal of Epidemiology

Scepanovic, P., Hodel, F., Mondot, S., Partula, V., Byrd, A., Hammer, C., . . . Fellay, J. A.-O. X. (2019). A comprehensive assessment of demographic, environmental, and host genetic associations with gut microbiome diversity in healthy individuals. (2049-2618 (Electronic)).

Schaan, A. P., Sarquis, D., Cavalcante, G. C., Magalhães, L., Sacuena, E. R. P., Costa, J., . . .

Ribeiro-dos-Santos, Â. (2021). The structure of Brazilian Amazonian gut microbiomes in the process of urbanisation. *npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 65. doi:10.1038/s41522-021-00237-0

Scher, J. U., Sczesnak, A., Longman, R. S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., . . . Littman, D. R. (2013). Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*, 2(2050-084X (Print)).

Schmidt, T. S. B., Raes, J., & Bork, P. (2018). The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. (1097-4172 (Electronic)).

Schneider, B. C., Motta, J. V. d. S., Muniz, L. C., Bielemann, R. M., Madruga, S. W., Orlandi, S. P., . . . Assunção, M. C. F. (2016). Design of a digital and self-reported food frequency questionnaire to estimate food consumption in adolescents and young adults: birth cohorts at Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Epidemiologia [Online]*, 19, 419-432.

- Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., . . .
- Robbertse, B. J. D. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020.
- Scholtens, P. A. M. J., Oozeer, R., Martin, R., Ben Amor, K., & Knol, J. (2012). The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annual review of food science and technology*, 3(1941-1413 (Print)), 425-447. doi:10.1146/annurev-food-022811-101120
- Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*, 69(1), 52-60. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*, 14(8), e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533
- Sheehan, D., & Shanahan, F. (2017). The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am.*, 46(1558-1942 (Electronic)), P143-154. doi:10.1016/j.gtc.2016.09.011
- Sheflin, A. M., Borresen, E. C., Kirkwood, J. S., Boot, C. M., Whitney, A. K., Lu, S., . . . Weir, T. L. (2017). Dietary supplementation with rice bran or navy bean alters gut bacterial metabolism in colorectal cancer survivors. . *Mol Nutr Food Res*, 61(1613-4133 (Electronic)).
- Shikany, J. M., Demmer, R. T., Johnson, A. J., Fino, N. F., Meyer, K., Ensrud, K. E., . . .
- Langsetmo, L. (2019). Association of dietary patterns with the gut microbiota in older, community-dwelling men. *Am J Clin Nutr*, 110(4), 1003-1014. doi:10.1093/ajcn/nqz174
- Shin, J. H., Jung, S., Kim, S. A., Kang, M. S., Kim, M. S., Joung, H., . . . Shin, D. M. (2019). Differential Effects of Typical Korean Versus American-Style Diets on Gut Microbial Composition and Metabolic Profile in Healthy Overweight Koreans: A Randomized Crossover Trial. *Nutrients*, 11(10). doi:10.3390/nu11102450
- Shin, J. H., Sim, M., Lee, J. Y., & Shin, D. M. (2016). Lifestyle and geographic insights into the distinct gut microbiota in elderly women from two different geographic locations. *J Physiol Anthropol*, 35(1), 31. doi:10.1186/s40101-016-0121-7
- Sidhu, M., & van der Poorten, D. (2017). The gut microbiome. *Aust Fam Physician*, 46(0300-8495 (Print)).
- Silverstein, R. L., & Febbraio, M. (2010). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. (1937-9145 (Electronic)).
- Simpson, H. L., & Campbell, B. J. (2015). Review article: dietary fibre-microbiota interactions. *Aliment Pharmacol Ther.*, 42(1365-2036 (Electronic)).
- Singh, R. K., Chang, H.-W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., . . . Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of*

Translational Medicine, 15(1), 73. doi:10.1186/s12967-017-1175-y

Sjögren, K., Engdahl, C., Henning, P., Lerner, U. H., Tremaroli, V., Lagerquist, M. K., . . . Ohlsson, C. (2012). The gut microbiota regulates bone mass in mice. *J Bone Miner Res.*, 27(1523- 4681 (Electronic)), 1357-1367.

Sonnenburg, J. L., & Bäckhed, F. (2016). Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, 535(7610), 56-64. doi:10.1038/nature18846

Sousa Ferreira, E. M., Barbosa de Sousa, G., Leite Barbosa, K., Sousa Monteles, K., & Silva Gomes, B. (2021). OS RISCOS QUE O USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICOS PODE OCASIONAR EM CRIANÇAS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. 2021, 2(11), e211901- e211901.

Stephens, R. W., Arhire, L., & Covasa, M. A.-O. (2018). Gut Microbiota: From Microorganisms to Metabolic Organ Influencing Obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*(1930-739X (Electronic)).

Tanaka, S., Kobayashi, T., Songjinda, P., Tateyama, A., Tsubouchi, M., Kiyohara, C., . . .

Nakayama, J. (2009). Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. (1574-695X (Electronic)).

Ticinesi, A., Lauretani, F., Milani, C., Nouvenne, A. A.-O., Tana, C., Del Rio, D. A.-O., . . . Meschi, T. (2017). Aging Gut Microbiota at the Cross-Road between Nutrition, Physical Frailty, and Sarcopenia: Is There a Gut-Muscle Axis? *Nutrients*, 30(2072-6643 (Electronic)).

Tiihonen, K., Ouwehand, A. C., & Rautonen, N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*, 9(1872-9649 (Electronic)), 107-116. doi:10.1016/j.arr.2009.10.004

Tissier, R., Carre, G., & Naud, C. (1900). Recherches sur la Flore Intestinale des Nourrissons (e'tat Normal et Pathologique).

Travis, S., & Menzies, I. (1992). Intestinal permeability: functional assessment and significance. *Clin Sci (Lond)*(0143-5221 (Print)).

Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., . . . Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(1476-4687 (Electronic)), 480-484. doi:10.1038/nature07540

Turnbaugh, P. J., Ley Re Fau - Mahowald, M. A., Mahowald Ma Fau - Magrini, V., Magrini V Fau - Mardis, E. R., Mardis Er Fau - Gordon, J. I., & Gordon, J. I. (2006). An obesity- associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(1476-4687 (Electronic)).

Turpin, W., Espin-Garcia, O., Xu, W., Silverberg, M. S., Kevans, D., Smith, M. I., . . . Consortium, G. E. M. P. R. (2016). Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nature Genetics*, 48(11), 1413-1417. doi:10.1038/ng.3693

Vaz, J. S., Buffarini, R., Schneider, B. C., Bielemann, R. M., Gonçalves, H., & Assunção, M. C. F. (2021). Relative validity of a computer-based semi-quantitative FFQ for use in the Pelotas

- (Brazil) Birth Cohort Studies. *Public Health Nutrition*, 24(1475-2727 (Electronic)).
- Vuong, H. E., & Hsiao, E. Y. (2017). Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. (1873-2402 (Electronic)).
- Wang, J., Thingholm, L. B., Skiecevičienė, J., Rausch, P., Kummen, M., Hov, J. R., . . . Franke, A. (2016). Genome-wide association analysis identifies variation in vitamin D receptor and other host factors influencing the gut microbiota. *Nature Genetics*, 48(11), 1396- 1406. doi:10.1038/ng.3695
- Wang, J., Thingholm, L. B., Skiecevičienė, J., Rausch, P., Kummen, M., Hov, J. R., . . . Franke, A. (2016). Genome-wide association analysis identifies variation in vitamin D receptor and other host factors influencing the gut microbiota. (1546-1718 (Electronic)).
- Weinstock, G. M. (2012). Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*, 489(1476-4687 (Electronic)), 250-256. doi:10.1038/nature11553
- Whisner, C. M., Maldonado, J., Dente, B., Krajmalnik-Brown, R., & Bruening, M. (2018). Diet, physical activity and screen time but not body mass index are associated with the gut microbiome of a diverse cohort of college students living in university housing: a cross-sectional study. *BMC microbiology*, 18(1), 210-210. doi:10.1186/s12866-018-1362-x
- Willett, W. (2012). *Nutritional epidemiology*: Oxford university press.
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, alpha diversity, and statistics. *J Frontiers in microbiology*, 10, 2407.
- Witkowski, M., Weeks, T. L., & Hazen, S. L. (2020). Gut Microbiota and Cardiovascular Disease. *AHA/ASA Journals logo*, 127(4), 553-570. doi:doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316242
- Wolter, M., Grant, E. T., Boudaud, M., Steimle, A., Pereira, G. V., Martens, E. C., & Desai, M. S. (2021). Leveraging diet to engineer the gut microbiome. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(12), 885-902. doi:10.1038/s41575-021-00512-7
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., . . . Lewis, J. D. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*, 334(6052), 105-108. doi:10.1126/science.1208344
- Xu, F., Fu, Y., Sun, T. Y., Jiang, Z., Miao, Z., Shuai, M., . . . Zheng, J. A.-O. (2020). The interplay between host genetics and the gut microbiome reveals common and distinct microbiome features for complex human diseases. (2049-2618 (Electronic)).
- Xu, X., Jia, X., Mo, L., Liu, C., Zheng, L., Yuan, Q., & Zhou, X. (2017). Intestinal microbiota: a potential target for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Bone Research*, 5(1), 17046. doi:10.1038/boneres.2017.46
- Yahfoufi, N., Matar, C., & Ismail, N. (2020). Adolescence and Aging: Impact of Adolescence Inflammatory Stress and Microbiota Alterations on Brain Development, Aging, and

Neurodegeneration. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 75(7), 1251-1257. doi:10.1093/gerona/glaa006

Yang, J., Lee, S. H., Goddard, M. E., & Visscher, P. M. (2013). Genome-wide complex trait analysis (GCTA): methods, data analyses, and interpretations. (1940-6029 (Electronic)).

Yatsunenkov, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., . . . Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222-227. doi:10.1038/nature11053

Zhou, Y., Lan, J., Wang, W., Shi, Q., Lan, Y., Cheng, Z., & Guan, H. (2013). ZNRF3 acts as a tumour suppressor by the Wnt signalling pathway in human gastric adenocarcinoma. (1567-2387 (Electronic)).

Anexos

Anexo 1

	<p>Universidade Federal de Pelotas Centro de Pesquisas Epidemiológicas Coortes de Nascimentos de 2004 SUBESTUDO AOS 12 ANOS <i>QUESTIONÁRIO GERAL</i></p>	
--	--	---

Apêndice 1 – Questionário completo aplicado aos adolescentes

Sou da Faculdade de Medicina e faço parte do mesmo estudo que você participou desde o nascimento. A última visita foi aos 11 anos de idade e, agora que você está com 12 anos, gostaria de conversar com você sobre sua saúde. Podemos conversar?

BLOCO A – IDENTIFICAÇÃO

0. Número de identificação do adolescente	_____
1. Nome da entrevistadora: _____	2. Código da entrevistadora: _____
3. Data da entrevista	____/____/____
4. Horário de início da entrevista	____:____
5. Como você se classifica em termos de cor da pele ou raça? <i>(Ler opções)</i>	<p>(1) Branca (2) Preta (3) Parda (4) Amarela (5) Indígena (9) IGN</p>
6. Sexo <i>(apenas observar e anotar a opção correspondente)</i>	
<p>(1) Masculino (2) Feminino</p>	
BLOCO B – ANIMAIS DOMÉSTICOS	

7. Na sua casa, você tem cachorro? (0) Não (1) Sim	7.a. Quantos? (1) 1 (2) 2	7.b. Quantas horas o(s) cachorro(s) fica(m) dentro de casa?
(9) IGN SE NÃO OU IGN 8	(3) 3 (4) 4+ (9) IGN	hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN
8. Na sua casa, você tem gato? (0) Não (1) Sim (9) IGN	8.a. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	8.b. Quantas horas o(s) gatos(s) fica(m) dentro de casa? hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN
9. Na sua casa, você tem coelho? (0) Não (1) Sim (9) IGN	9.a. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	9.b. Quantas horas o(s) coelho(s) fica(m) dentro de casa? hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN
10. Na sua casa, você tem peixe? (0) Não (1) Sim (9) IGN <i>SE NÃO OU IGN → 11</i>	10.a. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	
11. Na sua casa, você tem pássaro? (0) Não (1) Sim (9) IGN	11.a. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	11.b. Quantas horas o(s) pássaro(s) fica(m) dentro de casa? _____ hrs (00) Não entra em casa (99) IGN
12. Na sua casa, você tem algum outro animal de estimação? (0) Não (1) Sim (9) IGN <i>SE NÃO OU IGN → 13</i>		
12.a. Qual? _____ _____	12.b. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN	12.c. Quantas horas esse(s) <ANIMALDOMÉSTICO> fica(m) dentro de casa? _____ hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN
12.1. Na sua casa, você tem algum outro animal de estimação? (0) Não (1) Sim (9) IGN		

SE NÃO OU IGN → 13		
<p>12.1.a. Qual? _____</p> <p>_____</p>	<p>12.1.b. Quantos?</p> <p>(1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN</p>	<p>12.1.c. Quantas horas esse(s) <ANIMAL DOMÉSTICO> fica(m) dentro de casa?</p> <p>_____ hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN</p>
<p>12.2. Na sua casa, você tem algum outro animal de estimação?</p> <p>(0) Não (1) Sim (9) IGN</p> <p>SE NÃO OU IGN → 13</p>		
<p>12.2.a. Qual? _____</p> <p>_____</p>	<p>12.2.b. Quantos?</p> <p>(1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN</p>	<p>12.2.c. Quantas horas esse(s) <ANIMAL DOMÉSTICO> fica(m) dentro de casa?</p> <p>_____ hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN</p>
<p>12.3. Na sua casa, você tem algum outro animal de estimação?</p> <p>(0) Não (1) Sim (9) IGN</p> <p>SE NÃO OU IGN → 13</p>		
<p>12.3.a. Qual? _____</p> <p>_____</p>	<p>12.3.b. Quantos?</p> <p>(1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4+ (9) IGN</p>	<p>12.3.c. Quantas horas esse(s) <ANIMAL DOMÉSTICO> fica(m) dentro de casa?</p> <p>_____ hrs (00) Não entra em casa (77) Entra e sai a hora que quer (99) IGN</p>
BLOCO C – ESTILO DE VIDA		

Agora eu vou lhe fazer algumas perguntas sobre seu estilo de vida e alimentação.

<p>13. No último ano, você mudou a quantidade ou intensidade em que faz exercícios físicos? (0) Não (1) Sim (9) IGN</p>	<p>13.a. Você passou a fazer menos ou mais exercícios físicos? (1) Menos (2) Mais (9) IGN</p>
<p><i>SE NÃO OU IGN → 14</i></p>	
<p>14. Desde <DIA DA SEMANA>passada, em quantos dias você comeu feijão? __ (número de 0-7) (9) IGN SE 0 OU IGN → 15</p>	<p>14.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você comeu feijão? ____ (número de 1-10) (99) IGN</p>
<p>15. Desde <DIA DA SEMANA>passada, em quantos dias você comeu salada de alface e tomate ou salada de qualquer outra verdura ou legume CRU? __ (número de 0-7) (9) IGN SE 0 OU IGN → 16</p>	<p>15.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você comeu salada de alface e tomate ou salada de qualquer outra verdura ou legume CRU? ____ (número de 1-10) (99) IGN</p>
<p>16. Desde <DIA DA SEMANA>passada, em quantos dias você comeu verdura ou legume COZIDO com a comida ou na sopa, como por exemplo, couve, cenoura, chuchu, berinjela, abobrinha, sem contar batata, mandioca ou inhame? __ (número de 0-7) (9) IGN SE 0 OU IGN → 17</p>	<p>16.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você comeu verdura ou legume COZIDO com a comida ou na sopa, como por exemplo, couve, cenoura, chuchu, berinjela, abobrinha, sem contar batata, mandioca ou inhame? ____ (número de 1-10) (99) IGN</p>
<p>17. Desde <DIA DA SEMANA>passada, em quantos dias você comeu frutas, como por exemplo, laranja, maçã, banana? __ (número de 0-7) (9) IGN SE 0 OU IGN → 18</p>	<p>17.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você comeu frutas, como por exemplo, laranja, maçã, banana? ____ (número de 1-10) (99) IGN</p>

<p>18. Desde <DIA DA SEMANA>passada, em quantos dias você tomou refrigerante?</p> <p>__(número de 0-7) (9) IGN</p> <p>SE 0 OU IGN → 19</p>	<p>18.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você tomou refrigerante?</p> <p>__(número de 1-10) (99) IGN</p>
<p>18.b. Pensando nesse(s) dia(s) em que você tomou refrigerante, de que tipo era? (<i>Ler opções</i>)</p> <p>(1) normal (2) diet/light/zero (3) ambos</p>	
<p>(9) IGN</p>	
<p>19. Desde <DIA DA SEMANA>passada, em quantos dias você tomou suco artificial em pó ou de caixinha?</p> <p>__(número de 0-7) (9) IGN</p> <p>SE 0 OU IGN → 20</p>	<p>19.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você tomou suco artificial em pó ou de caixinha?</p> <p>__(número de 1-10) (99) IGN</p>
<p>19.b. Pensando nesse(s) dia(s) em que você tomou suco artificial, de que tipo era? (<i>Ler opções</i>)</p> <p>(1) normal (2) diet/light/zero (3) ambos (9) IGN</p>	
<p>20. Desde <DIA DA SEMANA>passada, em quantos dias você tomou iogurte ou leite fermentado (tipo Yakult)?</p> <p>__(número de 0-7) (9) IGN</p> <p>SE 0 OU IGN → 21</p>	<p>20.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você tomou iogurte ou leite fermentado (tipo Yakult)?</p> <p>__(número de 1-10) (99) IGN</p>
<p>21. Desde <DIA DA SEMANA>passada, em quantos dias você comeu alimentos doces, tais como: sorvetes, chocolates, bolos, biscoitos ou doces?</p> <p>__(número de 0-7) (9) IGN</p> <p>SE 0 OU IGN → 22</p>	<p>21.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você comeu alimentos doces, tais como: sorvetes, chocolates, bolos, biscoitos ou doces?</p> <p>__(número de 1-10) (99) IGN</p>
<p>22. Desde <DIA DA SEMANA>passada, em quantos dias você comeu salgados, pizza, batata frita, cachorro quente, ou outros tipos de lanches?</p> <p>__(número de 0-7) (9) IGN</p> <p>SE 0 OU IGN → 23</p>	<p>22.a. Pensando neste(s) dia(s), quantas vezes por dia você comeu salgados, pizza, batata frita, cachorro quente, ou outros tipos de lanches?</p> <p>__(número de 1-10) (99) IGN</p>

<p>23. Você faz dieta sem lactose?</p> <p>(0) Não (1) Sim (9) IGN SE NÃO OU IGN → 24</p>	<p>23.a. Restrição total de lactose é não consumir nada de leite ou derivados. Você faz restrição total?</p> <p>(0) Não (1) Sim (9) IGN</p>
<p>23.b. Quais alimentos você evita? _____ _____</p>	<p>23.c. Qual o motivo? _____ _____</p>
<p>24. Você faz dieta sem glúten?</p> <p>(0) Não</p>	<p>24.a. Restrição total de glúten é não consumir nada de alimentos com glúten. Você faz restrição total?</p>
<p>(1) Sim (9) IGN SE NÃO OU IGN → 25</p>	<p>(0) Não (1) Sim (9) IGN</p>
<p>24.b. Quais alimentos você evita? _____ _____</p>	<p>24.c. Qual o motivo? _____ _____</p>
<p>25. Vegetariano é quem não consome nenhum tipo de carne, incluindo carne de rês, frango, porco ou peixe. Você é vegetariano?</p> <p>(0) Não (1) Sim (9) IGN</p>	<p>26. Vegano é quem não consome nenhum tipo de produto de origem animal, como carnes, ovos, leite e mel. Você é vegano?</p> <p>(0) Não (1) Sim (9) IGN</p>

ATENÇÃO ENTREVISTADORA:

Não há necessidade de perguntar isso ao adolescente, pois ele(a) já terá preenchido essas informações antes da entrevista. Você deve aproveitar esse momento para revisar essas informações com o adolescente e entrar os dados no sistema. Questões não preenchidas na ficha deverão ser perguntadas.

BLOCO D1- COLETA DE FEZES (INFORMAÇÕES FOLHA DE COLETA)

<p>27. Dia em que coletou as fezes</p>	<p>____/____/____</p>
<p>28. Horário em que coletou as fezes</p>	<p>____ : ____ (99:99)</p>
<p>29. Observar e anotar. Qual o número do tubo utilizado?</p>	<p>1 0 0 0 _____</p>

<p>30. Você tomou algum tipo de antibiótico no dia anterior à coleta de fezes?</p> <p>(0) Não (1) Sim (9) IGN</p>	<p>31. Você tomou algum tipo de laxante no dia anterior à coleta de fezes?</p> <p>(0) Não (1) Sim (9) IGN</p>
<p>32. Você tomou algum tipo de probiótico no dia anterior à coleta de fezes? Como por exemplo: Probiotil, Probiatop, Simfort, Vitlplex, Leiba, Prolive, Lactipan, Lacteol, Lactofilus</p> <p>(0) Não (1) Sim (9) IGN</p>	<p>33. Você tomou algum outro tipo de remédio no dia anterior à coleta de fezes?</p> <p>(0) Não (1) Sim (9) IGN</p> <p>SE NÃO OU IGN → 34</p> <p>33.a. Qual? _____</p>

Nos 15 dias anteriores à coleta de fezes, você teve...

34. Febre	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
35. Dor na barriga (sem contar cólica menstrual)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
36. Diarréia	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
37. Intestino preso	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
38. Tosse	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
39. Peito encatarrado	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
40. Dor de garganta	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
41. Nariz escorrendo	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
42. Vômitos	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN

43. Você teve alguma dificuldade ao coletar as fezes?

- (0) Não
(1) Sim
(9) IGN

SE NÃO OU IGN → 44

43.I. Qual foi a dificuldade?

43.a. Teve problemas para entender as instruções?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.b. Achou difícil coletar a amostra de fezes?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.c. Teve dificuldade em evacuar?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.d. Não tinha vaso sanitário?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.e. O papel rasgou?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.f. Deixou o xixi entrar em contato com as fezes?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.g. Precisou usar o Kit alternativo (saco plástico azul)?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN
43.h. Outro?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN

43.i.
Qual? _____

44. Como estava a aparência das fezes no momento da coleta?

- (0) normal
- (1) dura
- (2) mole
- (3) líquida
- (4) Outro
- (9) IGN

SE OUTRO → 44.a

44.a. Qual? _____

BLOCO D2 – COLETA DE FEZES (INFORMAÇÕES PERGUNTADAS)

45. Você deixou o tubo em algum local protegido do sol?

- (0) Não
- (1) Sim
- (9) IGN

SE SIM → 46

45.a. Onde deixou? _____

46. Você deixou o tubo em local refrigerado (por exemplo, na geladeira ou freezer)?

- (0) Não
- (1) Sim
- (9) IGN

SE SIM → 47

46.a. Onde deixou? _____

47. Dia no qual o(a) adolescente entregou o tubo com as fezes para a equipe de pesquisa: ____/____/____
(99/99/9999)

48. Em uma semana normal, quantos dias por semana você costuma fazer cocô?

____ (número de 0-7)

- (9) IGN

49. Em um dia normal, quantas vezes você costuma fazer cocô?

- (0) 0
- (1) 1 vez
- (2) 2 vezes
- (3) 3 vezes ou mais
- (9) IGN**

BLOCO E – MEDICAMENTOS E DOENÇAS CRÔNICAS

**Agora vou lhe fazer algumas perguntas sobre a sua saúde.
Vou pedir que você responda com a ajuda da sua mãe, pai ou outro adulto.**

<p>50. Você tem algum problema crônico no intestino? (0) Não (1) Sim (9) IGN</p> <p>SE NÃO OU IGN → 51</p>	<p>50.a. Qual(is)? _____ _____</p>
<p>51. Você tem alguma outra doença crônica? (0) Não (1) Sim (9) IGN</p> <p>SE NÃO OU IGN → 52</p>	<p>51.a. Qual(is)? _____ _____</p>

Agora vou lhe fazer algumas perguntas sobre remédios que você tomou ultimamente.

<p>52. Você tomou algum tipo de antibiótico nos últimos <u>6 meses</u>? (0) Não (1) Sim (9) IGN</p> <p>SE NÃO OU IGN → 54</p>
<p>52.1. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4 (5) 5</p>

**Agora você pode me falar o(s) nome(s) do(s) antibiótico(s) que você tomou nos últimos 6 meses?
Você poderia me mostrar as caixas e receitas?**

Nome do remédio (LETRAS MAIÚSCULAS E SEM ACENTO)

52.1.a.
52.1.b.
52.1.c.
52.1.d.
52.1.e.

52.2. Apresentação da embalagem ou receita. (0) Não (1) Sim	52.3. Por qual motivo <NOME ANTIBIÓTICO> foi usado?	52.4. Quem indicou este remédio? (<i>Ler opções</i>) (1) médico (2) outro prof saúde (3) mãe (4) familiar/amigo (5) outro (9) IGN	52.5. Quantos tratamentos com <NOME ANTIBIÓTICO> você fez nos últimos 6 meses?	52.6. Quando foi a última vez que você tomou <NOME ANTIBIÓTICO>? (<i>não pode ser superior a 180 dias</i>)
--	---	---	--	--

Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 1>

a	—	_____	—	(99) IGN	____ dia(s) (999) IGN
---	---	-------	---	----------	--------------------------

Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 2>

b	—	_____	—	(99) IGN	____ dia(s) (999) IGN
---	---	-------	---	----------	--------------------------

Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 3>

c	—	_____	—	(99) IGN	____ dia(s) (999) IGN
---	---	-------	---	----------	--------------------------

Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 4>

d	—	_____	—	(99) IGN	____ dia(s) (999) IGN
---	---	-------	---	----------	--------------------------

Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 5>

e	—	_____	—	(99) IGN	____ dia(s) (999) IGN
---	---	-------	---	----------	--------------------------

53. Você tomou algum tipo de laxante nos últimos 6 meses?
(0) Não

(1) Sim
(9) IGN

SE NÃO OU IGN → 54

53.1 Quantos?

(1) 1
(2) 2
(3) 3
(4) 4
(5) 5

**Agora você pode me falar o(s) nome(s) do(s) laxante(s) que você tomou nos últimos 6 meses?
Você poderia me mostrar às caixas e receitas?**

Nome do remédio (LETRAS MAIÚSCULAS E SEM ACENTO)

53.1.a.
53.1.b.
53.1.c.
53.1.d.
53.1.e.

53.2. Apresentação da embalagem ou receita. (0) Não (1) Sim	53.3. Por qual motivo <NOME LAXANTE> foi usado?	53.4. Quem indicou este laxante? <i>(Ler opções)</i> (1) médico (2) outro prof saúde (3) mãe (4) familiar/amigo (5) outro (9) IGN	53.5. Com qual frequência você usou <NOME LAXANTE> nos últimos 6 meses?	53.6. Quando foi a última vez que você tomou <NOME LAXANTE>? <i>(nã o pode ser superior a 180 dias)</i>
Agora vamos falar sobre o <NOME LAXANTE 1>				
a	—	_____	_____ vez(es)/semana _____ vez(es)/mês (77) <1 vez/mês (99) IGN	_____ dia(s) (999) IGN
Agora vamos falar sobre o <NOME LAXANTE 2>				
b	—	_____	_____ vez(es)/semana _____ vez(es)/mês (77) <1 vez/mês (99) IGN	_____ dia(s) (999) IGN
Agora vamos falar sobre o <NOME LAXANTE 3>				
c	—	_____	_____ vez(es)/semana _____ vez(es)/mês (77) <1 vez/mês (99) IGN	_____ dia(s) (999) IGN
Agora vamos falar sobre o <NOME LAXANTE 4>				
d	—	_____	_____ vez(es)/semana _____ vez(es)/mês (77) <1 vez/mês (99) IGN	_____ dia(s) (999) IGN
			(99) IGN	
Agora vamos falar sobre o <NOME LAXANTE 5>				
e	—	_____	_____ vez(es)/semana _____ vez(es)/mês (77) <1 vez/mês (99) IGN	_____ dia(s) (999) IGN
54. Você tomou algum tipo de probiótico, ou seja, algum produto com microorganismos vivos para melhorar a flora intestinal, nos últimos <u>6 meses</u> ? Como por exemplo: Probiotil; Probiatop; Simfort; Vitlplex; Leiba; Prolive; Lactipan; Lacteol; Lactofilus. (0) Não (1) Sim (9) IGN				
SE NÃO OU IGN → 55				
54.1. Quantos? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4 (5) 5				

**Agora você pode me falar o(s) nome(s) do(s) probiótico(s) que você tomou que você tomou nos últimos 6 meses?
Você poderia me mostrar as caixas e receitas?**

Nome do remédio (LETRAS MAIUSCULAS E SEM ACENTO)

54.1.a.

54.1.b.

54.1.c.

54.1.d.

54.1.e.

<p>54.2. Apresentação da embalagem ou receita. (0) Não (1) Sim</p>	<p>54.3. Por qual motivo <NOME DO PROBIÓTICO> foi usado?</p>	<p>54.4. Quem indicou este probiótico? <i>(Ler opções)</i> (1) médico (2) outro prof saúde (3) mãe (4) familiar/amigo (5) outro (9) IGN</p>	<p>54.5. Com qual frequência você usou <NOME PROBIÓTICO> nos últimos 6 meses?</p>	<p>54.6. Quando foi a última vez que você tomou <NOME PROBIÓTICO>? <i>(não pode ser superior a 180 dias)</i></p>
---	--	--	---	--

Agora vamos falar sobre o <NOME PROBIÓTICO 1>

a	—	_____	—	_____ vez(es)/semana _____ vez(es)/mês (77) <1 vez/mês (99) IGN	_____ dia(s) 999 (IGN)
---	---	-------	---	--	---------------------------

Agora vamos falar sobre o <NOME PROBIÓTICO 2>

b	—	_____	—	_____ vez(es)/semana _____ vez(es)/mês (77) <1 vez/mês (99) IGN	_____ dia(s) 999 (IGN)
---	---	-------	---	--	---------------------------

Agora vamos falar sobre o <NOME PROBIÓTICO 3>

c	—	_____	—	_____ vez(es)/semana _____ vez(es)/mês (77) <1 vez/mês (99) IGN	_____ dia(s) 999 (IGN)
---	---	-------	---	--	---------------------------

Agora vamos falar sobre o <NOME PROBIÓTICO 4>

d	—	_____	—	_____ vez(es)/semana _____ vez(es)/mês (77) <1 vez/mês (99) IGN	_____ dia(s) 999 (IGN)
---	---	-------	---	--	---------------------------

Agora vamos falar sobre o <NOME PROBIÓTICO 5>

e	—	_____	—	_____ vez(es)/semana _____ vez(es)/mês (77) <1 vez/mês (99) IGN	_____ dia(s) 999 (IGN)
---	---	-------	---	--	---------------------------

55. Você tomou algum outro tipo de remédio nos últimos 15 dias?

- (0) Não
(1) Sim
(9) IGN

SE NÃO OU IGN → 56

55.1. Quantos?					
(1) 1					
(2) 2					
(3) 3					
(4) 4					
(5) 5					
Agora você pode me falar o(s) nome(s) desse(s) outro(s) remédio(s) que você tomou que você tomou nos últimos <u>15 dias</u>?					
Você poderia me mostrar as caixas e receitas?					
<i>Nome do remédio (LETRAS MAIÚSCULAS E SEM ACENTO)</i>					
55.1.a.					
55.1.b.					
55.1.c.					
55.1.d.					
55.1.e.					
55.2. <i>Apresentação da embalagem ou receita.</i> (0) Não (1) Sim	55.3. Por qual motivo <NOME REMÉDIO> foi usado?	55.4. Quem indicou este remédio? <i>(Ler opções)</i> (1) médico (2) outro prof saúde (3) mãe (4) familiar/amigo (5) outro (9) IGN	55.5. Quantos dias você fez uso desse remédio nos últimos 15 dias? <i>(não pode ser superior a 15)</i>	55.6. Quando foi a última vez que você tomou <NOME REMÉDIO>? <i>(não pode ser superior a 15 dias)</i>	
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 1>					
a	—	_____	—	____ dia(s) (99) IGN	____ dia(s) 99 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 2>					
b	—	_____	—	____ dia(s) (99) IGN	____ dia(s) 99 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 3>					
c	—	_____	—	____ dia(s) (99) IGN	____ dia(s) 99 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 4>					
d	—	_____	—	____ dia(s) (99) IGN	____ dia(s) 99 (IGN)
Agora vamos falar sobre o <NOME REMÉDIO 5>					
e	—	_____	—	____ dia(s) (99) IGN	____ dia(s) 99 (IGN)

BLOCO F – PUBERDADE (*PARA MENINAS*)

Agora vamos a falar sobre puberdade

56. Você já menstruou?

- (0) Não
(1) Sim
(9) IGN

SE NÃO OU IGN → 58

57. Você está grávida ou com suspeita de gravidez?

- (0) Não
(1) Sim
(9) IGN

Se SIM: encerra questionário.

Se NÃO ou IGN pula para bloco G (QFA).

58. O corpo muda ao longo da puberdade de uma maneira diferente para cada um, e os microbios que moram no nosso intestino também mudam durante esse período. Por este motivo estamos interessados em conhecer sobre essas mudanças!

Gostaria de mostrar à sua filha alguns desenhos que descrevemos fases da puberdade e gostaria que ela aponte para onde ela achar que está em relação ao desenvolvimento dela (*neste momento mostre-lhes a folha apropriada sem explicar todos os estágios*). Podemos fazer esta parte com o adulto presente, ou se ela se sentir mais confortável, podemos fazer sem a presença do adulto. Nós não vamos examinar a adolescente, apenas iremos descrever as etapas do desenvolvimento e pedir que ela marque a etapa com a qual se sente mais identificada.

(Se a adolescente se sentir completamente desconfortável fazendo isso, então você pode perguntar se a mãe/o pai pode selecionar onde eles pensam que a adolescente está no desenvolvimento puberal – anote no questionário se mãe/pai selecionou).

→ ATENÇÃO: Caso o entrevistado não saiba ler ou tenha dificuldade com o uso do tablet, prossiga a entrevista normalmente.

Explique o seguinte ao menina:

Com este questionário, gostaria de perguntar-lhe como é o seu corpo neste momento, especialmente os seios (também chamados de mamas). Precisamos saber disso porque o desenvolvimento das mamas é um indicador confiável do estágio da puberdade no qual você está.

Por favor, olhe para cada um dos desenhos e escolha o estágio que você acha que corresponde à aparência atual de seus seios. Se os lados direito e esquerdo parecem diferentes, responda a pergunta com base na mama maior.

Ler cada estágio para a adolescente.

58. Parte 1. Mamas: Marque a opção que mais se parece com a sua fase atual

Fase 1. Nada mudou

Fase 2. Há uma leve elevação no mamilo (botão), mas o tecido mamário não se estende além de mamilo.

Fase 3. O tecido mamário aumentou e se estendeu além do mamilo.

Fase 4. Existe um botão (broto) secundário. O tecido mamário e o mamilo aumentam e ficam mais saltados

Fase 5. A mama está totalmente desenvolvida.

**NESTE MOMENTO ENTREGAR O TABLET OU O QUESTIONÁRIO IMPRESSO PARA A ADOLESCENTE
MARCAR A FASE ESCOLHIDA**

[1] Fase 1

[2] Fase 2

[3] Fase 3

[4] Fase 4

[5] Fase 5

59. Parte 2. Pelos pubianos: Marque a opção que mais se parece com a sua fase atual

Fase 1. Nada mudou

Fase 2. Tem poucos pelos

Fase 3. Os pelos estão mais escuros e crespos

Fase 4. Os pelos agora estão escuros e crespos. Espalham-se por uma região maior, mas não se espalharam para as pernas.

Fase 5. Os pelos são iguais aos de uma mulher adulta.

***NESTE MOMENTO ENTREGAR O TABLET OU O QUESTIONÁRIO IMPRESSO PARA A ADOLESCENTE
MARCAR A FASE ESCOLHIDA***

[1] Fase 1

[2] Fase 2

[3] Fase 3

[4] Fase 4

[5] Fase 5

60. O adolescente precisou de ajuda para preencher esta parte? (apenas observar e anotar a opção correspondente)

- (0) Não
- (1) Sim
- (9) IGN

Se NÃO ou IGN pula para bloco G (QFA).

60.a. Quem lhe ajudou?

- (1) Pai
- (2) Mãe
- (3) Avó/Avô
- (4) Outrapessoa
- (9) IGN

BLOCO F – PUBERDADE (PARA MENINOS)

58. O corpo muda ao longo da puberdade de uma maneira única para todos, e os micróbios que moram no nosso intestino também mudam durante esse período. Por este motivo estamos interessados em conhecer sobre essas mudanças!

Gostaria de mostrar a seu filho alguns desenhos que descrevem as fases da puberdade e gostaria que a aponte para onde ele acharque está em relação ao desenvolvimento dele (*neste momento mostre-lhes a folha apropriada sem explicando todos os estágios*). Podemos fazer esta partecom o adulto presente, ou, se ele se sentir mais confortável, podemos fazer sem a presença do adulto. Nós não vamos examinar o adolescente, apenas iremos descrever as etapas do desenvolvimento e pedir que ele marque a etapa com a qual se sente mais identificado.

(Se a adolescente se sentir completamente desconfortável fazendo isso, então você pode perguntar se a mãe/o pai pode selecionar onde eles pensam que a adolescente está no desenvolvimento puberal – anote no formulário se mãe/pai selecionou).

→ ATENÇÃO: *Caso o entrevistado não saiba ler ou tenha dificuldade com o uso do tablet, prossiga a entrevista normalmente.*

Explique o seguinte ao menino:

Com este questionário, gostaria de perguntar-lhe como é o seu corpo neste momento, especialmente sua genitália. Precisamos saber disso porque o desenvolvimento dos órgãos genitais é um indicador confiável do estágio puberal no qual você está (*neste momento entregue as folhas de estágio puberal*). Por favor, olhe para cada um dos desenhos e escolha o estágio que você acha que corresponde à aparência atual da sua genitália. Escolha a figura mais próxima do seu estágio atual.

Ler cada estágio para a adolescente.

58. Parte 1. Genitália: Marque a opção que mais se parece com a sua fase atual

Fase 1. Nada mudou.

Fase 2. O pênis aumenta um pouco. Os testículos descem um pouco no escroto (“saco”)

Fase 3. O pênis e os testículos aumentam mais

Fase 4. A “cabeça” do pênis aumenta, o escroto fica mais escuro.

Fase 5. O pênis e os testículos estão totalmente desenvolvidos, iguais aos de um homem adulto.

***NESTE MOMENTO ENTREGAR O TABLET OU O QUESTIONÁRIO IMPRESSO PARA O ADOLESCENTE
MARCAR A FASE ESCOLHIDA***

[1] Fase 1

[2] Fase 2

[3] Fase 3

[4] Fase 4

[5] Fase 5

59. Parte 2. Pelos pubianos: Marque a opção que mais se parece com a sua fase atual

Fase 1. Nada mudou.

Fase 2. Tem poucos pelos.

Fase 3. Os pelos estão mais escuros e crespos.

Fase 4. Os pelos agora estão escuros e crespos. Espalham-se por uma região maior, mas não se espalharam para as pernas.

Fase 5. Os pelos são iguais aos de um homem adulto.

***NESTE MOMENTO ENTREGAR O TABLET OU O QUESTIONÁRIO IMPRESSO PARA O ADOLESCENTE
MARCAR A FASE ESCOLHIDA***

[1] Fase 1

[2] Fase 2

[3] Fase 3

[4] Fase 4

[5] Fase 5

60. O adolescente precisou de ajuda para preencher esta parte? (apenas observar e anotar a opção correspondente)

- (0) Não
- (1) Sim
- (9) IGN

Se **NÃO** ou **IGN** pula para bloco G (QFA).

60.a. Quem lhe ajudou?

- (1) Pai
- (2) Mãe
- (3) Avó/Avô
- (4) Outrapessoa
- (9) IGN

BLOCO G – QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Vamos falar mais um pouco sobre sua alimentação. Para cada alimento que vou listar, responda se você consumiu este alimento nos ÚLTIMOS 12 MESES, ou seja, desde <MÊS> do ano passado até agora, de acordo com a seguinte escala de frequência.

→ **ATENÇÃO:** *Mostrar escala de frequência neste momento.*

* Caso você **NÃO** tenha consumido o alimento, ou comeu **MENOS DE 1 VEZ POR MÊS**, então responda “**NUNCA** ou **QUASE NUNCA**”. Se você consumiu mais de 1 vez por mês, veja as outras opções de frequência mensal, semanal ou diária e escolha a que representa esse consumo nestes últimos 12 meses.

* Para os alimentos que você consumiu mais de uma vez por mês, quero que você observe as imagens no livro e diga se **NORMALMENTE** você costuma comer **MENOS** ou **MAIS** da quantidade apresentada.

OK?

Vamos começar!

<i>ALIMENTO</i>	<i>FREQUÊNCIA</i>								<i>QUANTIDADE</i>			
“COM QUAL FREQUENCIA VOCÊ CONSUME PÃES E CEREAIS MATINAIS”	<i>Nunca ou quase nunca</i>	<i>1-3x mês</i>	<i>1x semana</i>	<i>2-4x semana</i>	<i>5-6x semana</i>	<i>1x dia</i>	<i>2-4x dia</i>	<i>≥5x dia</i>	<i>PENSANDO EM...</i>	<i>VOCÊ CONSUME...</i>		
										<i>Menos</i>	<i>Igual</i>	<i>Mais</i>
Pão integral, centeio ou preto	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 fatias ou 1 cacetinho integral	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pão branco: caseiro, de forma, francês	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 cacetinho ou 2 fatias de pão de forma	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bolacha doce, recheada, ou cookies	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	5 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bolacha salgada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	5 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bolo sem recheio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Granola	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	4 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cereais matinais, como sucrilhos, cornflakes, choco krispies, pop	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 xícara	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Barra de cereais	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 barrinha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE CEREAIS, TUBÉRCULOS E MASSAS”	<i>Nunca ou quase nunca</i>	<i>1-3x mês</i>	<i>1x semana</i>	<i>2-4x semana</i>	<i>5-6x semana</i>	<i>1x dia</i>	<i>2-4x dia</i>	<i>≥5x dia</i>	<i>PENSANDO EM...</i>	<i>VOCÊ CONSUME...</i>		
										<i>Menos</i>	<i>Igual</i>	<i>Mais</i>
Arroz branco	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 colheres sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Batata cozida, assada ou purê	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	4 colheres sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Batata, polenta ou aipim FRITOS	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Miojo, nissin, cupnoodles	<input type="radio"/>	1 pacote ou copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Macarrão, espaguete, massa parafuso, entre outros	<input type="radio"/>	1 pegador	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Lasanha, nhoque, ravióli	<input type="radio"/>											

<i>ALIMENTO</i>	<i>FREQUÊNCIA</i>								<i>QUANTIDADE</i>			
“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE FEIJÃO E ERVILHA”	<i>Nunca ou quase nunca</i>	<i>1-3x mês</i>	<i>1x semana</i>	<i>2-4x semana</i>	<i>5-6x semana</i>	<i>1x dia</i>	<i>2-4x dia</i>	<i>≥5x dia</i>	<i>PENSANDO EM...</i>	<i>VOCÊ CONSOME...</i>		
										<i>Menos</i>	<i>Igual</i>	<i>Mais</i>
Feijão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 concha média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lentilha, ervilha, grão de bico	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 concha média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE LEITE E DERIVADOS”	<i>Nunca ou quase nunca</i>	<i>1-3x mês</i>	<i>1x semana</i>	<i>2-4x semana</i>	<i>5-6x semana</i>	<i>1x dia</i>	<i>2-4x dia</i>	<i>≥5x dia</i>	<i>PENSANDO EM...</i>	<i>VOCÊ CONSOME...</i>		
										<i>Menos</i>	<i>Igual</i>	<i>Mais</i>
Leite de vaca (líquido ou pó)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo médio ou 2 colheres de sopa pó	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na maioria das vezes, que tipo de leite você toma: [] integral, [] semi ou [] desnatado?												
Na maioria das vezes, você usa açúcar no leite? [] Não [] Sim									3 colheres de chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Leite de soja (líquido ou pó)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo médio ou 2 colheres sopa pó	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Iogurte	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo médio ou 2 potes ou 1 garrafinha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na maioria das vezes, você toma o iogurte [<input type="checkbox"/>] diet, light ou [<input type="checkbox"/>] normal?												
Queijo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na maioria das vezes, que tipo de queijo você come: _____: [<input type="checkbox"/>] ricota/minas [<input type="checkbox"/>] mussarela [<input type="checkbox"/>] lanche												
Requeijão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 colher de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Você costuma consumir estes produtos sem lactose? [<input type="checkbox"/>] Não [<input type="checkbox"/>] Sim												
Se sim: Quais alimentos sem lactose você costuma consumir?												
“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBREFRUTAS”	Nunca ou quase nunca	1-3x mês	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	PENSANDO EM...	VOCÊ CONSOME...		
										Menos	Igual	Mais
Laranja ou Bergamota	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Banana	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 unidades (banana prata)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Mamão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Maçã ou Pêra	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

AS PRÓXIMAS FRUTAS SÃO AQUELAS QUE GERALMENTE CONSUMIMOS EM DETERMINADAS ESTAÇÕES DO ANO.

VOCÊ COME ESTAS FRUTAS? QUAL A FREQUÊNCIA QUE VOCÊ COME QUANDO É A EPOCA DESSAS FRUTAS?

Melancia ou melão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Abacaxi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Abacate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Manga	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Morango	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Uva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 cacho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pêssego	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Goiaba	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE VEGETAIS”	<i>Nunca ou quase nunca</i>	<i>1-3x mês</i>	<i>1x semana</i>	<i>2-4x semana</i>	<i>5-6x semana</i>	<i>1x dia</i>	<i>2-4x dia</i>	<i>≥5x dia</i>	<i>PENSANDO EM...</i>	<i>VOCÊ CONSOME...</i>			
										<i>Menos</i>	<i>Igual</i>	<i>Mais</i>	
Alface	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 folha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Tomate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	5 rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Couve	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Repolho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chuchu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Abóbora	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Pepinoao natural	<input type="radio"/>	5 rodelas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Vagem	<input type="radio"/>	3colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Cenoura	<input type="radio"/>	3colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Beterraba	<input type="radio"/>	2colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Couve-flor	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Pimentão	<input type="radio"/>												
Cebola	<input type="radio"/>												
Alho	<input type="radio"/>												
Na maioria das vezes, você adiciona óleoou azeite na salada? [<input type="checkbox"/>] Não [<input type="checkbox"/>] Sim													
Se sim, qual tipo de óleo? [<input type="checkbox"/>] óleo de soja [<input type="checkbox"/>] azeite de oliva extra virgem [<input type="checkbox"/>] outros azeites													
Na maioria das vezes, você coloca sal na salada ou no prato de comida pronto?[<input type="checkbox"/>] Não [<input type="checkbox"/>] Sim										1 colher de café rasa ou 1 saquinho (1g)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE CARNES E OVOS”	<i>Nunca ou quase nunca</i>	<i>1-3x mês</i>	<i>1x semana</i>	<i>2-4x semana</i>	<i>5-6x semana</i>	<i>1x dia</i>	<i>2-4x dia</i>	<i>≥5x dia</i>	<i>PENSANDO EM...</i>	<i>VOCÊ CONSOME...</i>		
										<i>Menos</i>	<i>Igual</i>	<i>Mais</i>
Carne vermelha, na forma de bife, pedaço, guisado outras	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pedaço ou bife ou 4 colheres sopa (guisado)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na maioria das vezes, você come a carne: [<input type="checkbox"/>] frita, [<input type="checkbox"/>] assada/grelhada ou [<input type="checkbox"/>] cozida?												

Na maioria das vezes, você come a gordura da carne? [<input type="checkbox"/>] Não [<input type="checkbox"/>] Sim													
Carne de porco	<input type="radio"/>	1 pedaço grande	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Com qual frequência você come as carnes na forma de churrasco?	<input type="radio"/>												
Frango	<input type="radio"/>	1 coxa/sobrecoxa ou 1 bife	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Na maioria das vezes, você come o frango: [<input type="checkbox"/>] frito, [<input type="checkbox"/>] assado/grelhado ou [<input type="checkbox"/>] cozido?													
Na maioria das vezes, você come a pele do frango? [<input type="checkbox"/>] Não [<input type="checkbox"/>] Sim													
Peixe	<input type="radio"/>	1 filé grande	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Na maioria das vezes, você come o peixe: [<input type="checkbox"/>] frito, [<input type="checkbox"/>] assado/grelhado ou [<input type="checkbox"/>] cozido?													
Peixe enlatado como sardinha e atum	<input type="radio"/>												
Camarão	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Miúdos, como moela, fígado, coração, rim, ou outros	<input type="radio"/>	1 bife ou 3 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Hamburguer industrializado OU Nuggets	<input type="radio"/>	1 hambúrguer ou 2 nuggets	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Salsicha	<input type="radio"/>	1 unidade média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Lingüiça ou salsichão	<input type="radio"/>	1 salsichão ou 4 rodela de lingüiça	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Mortadela, presunto, salame	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								

Bacon outoucinho	<input type="radio"/>	1 pedaço	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Ovos	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Na maioria das vezes, você come o OVO: [<input type="checkbox"/>] frito ou [<input type="checkbox"/>] cozido?													

“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE MANTEIGA E MAIONESE”	<i>Nunca ou quase nunca</i>	<i>1-3x mês</i>	<i>1x semana</i>	<i>2-4x semana</i>	<i>5-6x semana</i>	<i>1x dia</i>	<i>2-4x dia</i>	<i>≥5x dia</i>				
Manteiga	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Margarina	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Maionese	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE ALGUNS DOCES”	<i>Nunca ou quase nunca</i>	<i>1-3x mês</i>	<i>1x semana</i>	<i>2-4x semana</i>	<i>5-6x semana</i>	<i>1x dia</i>	<i>2-4x dia</i>	<i>≥5x dia</i>	<i>PENSANDO EM...</i>	<i>VOCÊ CONSOME...</i>		
										<i>Menos</i>	<i>Igual</i>	<i>Mais</i>
Sorvete ou picolé	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 bolas de sorvete ou 1 picolé	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Balaso ou pirulito	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	4 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Doce à base de leite, como doce de leite, e pudins	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa ou 1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Doces à base de frutas, como geleias, goiabada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chocolate em pó ou Nescau	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Chocolate em barra ou bombom	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 barra pequena ou 1 bombom	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE ALGUMAS BEBIDAS”	<i>Nunca ou quase nunca</i>	<i>1-3x mês</i>	<i>1x semana</i>	<i>2-4x semana</i>	<i>5-6x semana</i>	<i>1x dia</i>	<i>2-4x dia</i>	<i>≥5x dia</i>	<i>PENSANDO EM...</i>	<i>VOCÊ CONSOME...</i>		
										<i>Menos</i>	<i>Igual</i>	<i>Mais</i>
Refrigerante tipo Cola, como Coca- cola, Pepsi-cola, Fruki-Cola	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Outros refrigerantes: Guaraná, Limão, Laranja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo			
Quando o (a) você toma refrigerante, qual o tipo mais consumido: [<input type="checkbox"/>] Diet/Light ou [<input type="checkbox"/>] Normal ?												
Suco de caixa ou pó	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Suco natural (fruta ou polpa)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Geralmente, você usa açúcar no suco? [<input type="checkbox"/>] Não [<input type="checkbox"/>] Sim:									3 colheres de chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Café	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 xícara média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Geralmente, você usa açúcar no café? [<input type="checkbox"/>] Não [<input type="checkbox"/>] Sim									3 colheres de chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 xícara	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Geralmente, você usa açúcar no chá? [<input type="checkbox"/>] Não [<input type="checkbox"/>] Sim									3 colheres de chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chimarrão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
“VOCÊ TOMA COM FREQUENCIA ALGUMA BEBIDA DE ALCOOL?” <i>(SE NAO, PULAR O BLOCO)</i>									[<input type="checkbox"/>] Não [<input type="checkbox"/>] Sim			
										<i>VOCÊ CONSOME...</i>		

	<i>Nunca ou quase nunca</i>	<i>1-3x mês</i>	<i>1x semana</i>	<i>2-4x semana</i>	<i>5-6x semana</i>	<i>1x dia</i>	<i>2-4x dia</i>	<i>≥5x dia</i>	<i>PENSANDO EM...</i>	<i>Menos</i>	<i>Igual</i>	<i>Mais</i>
Cerveja ou Chopp	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 latas de cerveja ou 2 copos de chopp	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Vinho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 taça	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cachaça/uísque/vodka, drinks ou batidas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 dose ou 1 drink	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
“AGORA VOU LHE PERGUNTAR SOBRE ALIMENTOS DIVERSOS”	<i>Nunca ou quase nunca</i>	<i>1-3x mês</i>	<i>1x semana</i>	<i>2-4x semana</i>	<i>5-6x semana</i>	<i>1x dia</i>	<i>2-4x dia</i>	<i>≥5x dia</i>	<i>PENSANDO EM...</i>	VOCÊ CONSUME...		
										<i>Menos</i>	<i>Igual</i>	<i>Mais</i>
Chips e salgadinhos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pacote	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pizza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bauru, cheesburger ou cachorro quente	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Salgados como quibe, pastel, empada, esfirra, coxinha de galinha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Pipoca doce ou salgada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Alimentos em conserva, como ervilha, milho, pepino ou picles	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Castanha, noz, amêndoa ou avelã	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
61. Alguém lhe ajudou a responder ao questionário de alimentação?(apenas observar e anotar a opção correspondente) (0) Não						61.a. SE SIM: Quem lhe ajudou a responder ao questionário de alimentação? (1) Pai (2) Mãe (3) Avó/Avô						

<p>(1) Sim (9) IGN</p> <p>Se NÃO ou IGN pula para bloco H (MEDIDAS).</p>	<p>(4) Outra pessoa (9) IGN</p> <p>61.b. SE OUTRO. Quem? _____</p>
---	--

BLOCO H – MEDIDAS

MEDIDA 1 – Agora, gostaria de medir a sua altura. Você pode ficar descalço, por favor, suba no estadiômetro de costas para ele, com os pés juntos, de maneira que os ossos do tornozelo fiquem encostados. Por favor, permaneça com as mãos ao longo do corpo e olhando para frente.

Alerta: Para registrar a medida utilize vírgula. Utilize a casa decimal após a vírgula e não arredonde.

Resultado da medida1: _____, ___cm

[888,8 =NSA]

[999,9 = IGN]

Resultado da medida2: _____, ___cm

[888,8 =NSA]

[999,9 = IGN]

Se a altura não pode ser medida por qualquer motivo, registre aqui:

MEDIDA 2 – Agora, gostaria de medir a sua cintura. Você pode permanecer de pé. Por favor, vou precisar que você fique com a cintura exposta para medi-la.

Alerta: Para registrar a medida utilize vírgula.

Preencha todas as casas, incluindo o zero quando necessário e não arredonde. Ex.: 82,4 = 082,4

Anote o resultado da 1ª medida: _____, ___cm

[888,8 =NSA]

[999,9 = IGN]

Anote o resultado da 2ª medida: _____, ___cm

[888,8 =NSA]

[999,9 = IGN]

Se a diferença entre a primeira e a segunda medida for maior do que 1 cm, realizar a terceira medida.

Anote o resultado da 3ª medida: _____, ___cm

[888,8 =NSA]

[999,9 = IGN]

Se a circunferência da cintura não pode ser medida por qualquer motivo, registre aqui:

MEDIDA 3 – Agora, gostaria de pesar você. Para isso, preciso que você fique com a sua roupa íntima e vista o avental. Por favor, vou precisar que você suba na balança e olhe para frente, com os braços ao longo do corpo. Permaneça em pé, com o peso igualmente distribuído em ambos os pés.
*Se precisar, procurar um local mais discreto, mas **SEMPRE** acompanhado por um adulto.*

Alerta: Para registrar a medida utilize vírgula. Preencha todas as casas, incluindo o zero quando necessário e não arredonde. Ex.: 90,8 = 090,8

Anote o valor que aparecer no visor da balança: _____, _kg

[888,8 =NSA]

[999,9 = IGN]

Anote o valor que aparecer no visor da balança: _____, _kg

[888,8 =NSA]

[999,9 = IGN]

Se o peso não pode ser aferido por qualquer motivo, registre aqui.

Anote as roupas que o entrevistado está usando.

Horário do fim da entrevista: ____ : ____

Anexo 2 – Ficha de coleta de fezes

FICHA DE COLETA DE FEZES	
ATENÇÃO: Preencher esta ficha logo depois de ter realizado a coleta de fezes (cocô).	
Nome e sobrenome do participante	
Dia em que coletou as fezes	_____ / _____ / _____
Horário em coletou as fezes	_____ : _____
Por favor, marque com um "X" a resposta correta para as perguntas abaixo	
Você tomou algum tipo de antibiótico no dia anterior à coleta de fezes? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	Você tomou algum tipo de laxante no dia anterior à coleta de fezes? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Você tomou algum tipo de probiótico no dia anterior à coleta de fezes? Por exemplo: Probiotil, Probiatop, Simfort, Vitplex, Leiba, Prolive, Lactipan, Lacteol, Lactofilus <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	Você tomou algum outro tipo de remédio no dia anterior à coleta de fezes? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim SE SIM. Qual?
Nos 15 dias anteriores à coleta de fezes, você teve....	
Febre	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Dor na barriga (sem contar cólica menstrual)	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Diarréia	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Intestino preso	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Tosse	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Peito "encatarrado"	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Dor de garganta	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Nariz escorrendo	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Vômitos	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Teve alguma dificuldade ao coletar as fezes? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	
SE SIM. Qual foi a dificuldade? Você pode marcar com um "X" uma ou mais das opções abaixo	
<input type="checkbox"/> Teve problemas para entender as instruções <input type="checkbox"/> Achou difícil coletar a amostra de fezes <input type="checkbox"/> Teve dificuldade em evacuar <input type="checkbox"/> Não tinha vaso sanitário <input type="checkbox"/> O papel rasgou <input type="checkbox"/> Deixou o xixi entrar em contato com as fezes <input type="checkbox"/> Preciso usar o Kit alternativo (saco plástico azul) <input type="checkbox"/> Outro	
Qual?	
Como estava a aparência das fezes no momento da coleta? <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Dura <input type="checkbox"/> Mole <input type="checkbox"/> Líquida <input type="checkbox"/> Outro	
Qual?	

Acesse nosso tutorial (MICROBIOMA – SOP) no link: <https://www.youtube.com/watch?v=gTPwLUsXTAo>
Guardar o Kit com a amostra em local protegido do sol e sem refrigeração.

Em caso de dúvidas, você pode ligar para Centro de Pesquisas em Saúde Dr. Amílcar Gigante a cobrar: 9090 3284 1301 ramais: 357 e 368 - QG 2004

Anexo 3 – Instruções da coleta de fezes para o adolescente

Instrução de Coleta de amostra fecal

Nosso corpo é a casa de milhões de micróbios e a maioria deles vive em nosso intestino. Estes micróbios nos ajudam a digerir alguns alimentos e nos protegem contra organismos perigosos, eles têm o poder de nos manter saudáveis ou nos deixar doentes. Micróbios no nosso intestino podem mudar conforme envelhecemos. Embora cientistas saibam muito sobre esses micróbios, ainda há muito mais o que aprender. Nós gostaríamos de saber quais tipos de micróbios estão vivendo em seu intestino nesse momento e nós podemos saber por meio de alguns experimentos com seu cocô.

O modo mais fácil de conhecer quais micróbios estão vivendo em seu intestino é pegando uma amostra do seu cocô. Por favor, leia as instruções abaixo lenta e cuidadosamente para que possamos obter uma amostra do seu cocô.

O kit que você recebeu contém:

				
Tubo plástico Norgen®	Par de luvas	Papel coletor Fe-Col®	Lenços umedecidos de álcool	Saco plástico com fecho de correr (zip)
Este tubo contém uma colher anexada à tampa e uma pequena quantidade de líquido* que ajudará a preservar seu cocô.	As luvas protegerão suas mãos de contaminação.	Este papel coletor tornará mais fácil para você coletar seu cocô.	Estes pequenos lenços ajudarão você a limpar o tubo no final da coleta.	Você irá usar essa bolsa no final, para guardar o tubo plástico.

*** Não beba o líquido do tubo plástico. Se o conteúdo entrar em contato com sua pele ou olhos, lave bem com água.**

Por favor, verifique se tudo está no pacote. Se alguma coisa estiver faltando, por favor, informe a entrevistadora.

Instruções:

1. Vá ao banheiro e tenha certeza que você tem tudo que você precisa.
2. Por favor, urine antes de você começar e então lave suas mãos com sabonete. É muito importante que a urina não entre em contato com a amostra de fezes.

SE VOCÊ QUISER QUE ALGUÉM LHE AJUDE, POR FAVOR, CHAME ESSA PESSOA ANTES DE COMEÇAR.

Quem lhe ajudar deve fazer todos os passos abaixo, exceto o número 5.

<p>3.  35:</p>	<p>Passo 1 Ponha as luvas antes de começar. *Se alguém está lhe ajudando, ele/ela deve pôr as luvas e fazer os próximos passos.</p>		<p>Passo 2 Abra cuidadosamente o pacote plástico do papel coletor Fe-Col®. Fique com o papel na mão e ponha a embalagem no lixo. *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.</p>
	<p>Passo 3 Desdobre cuidadosamente o papel coletor e deslize cobrindo o acento do sanitário. *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.</p>		<p>Passo 4 Empurre o papel coletor com muito cuidado no centro do sanitário para fazer uma curva. *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.</p>
	<p>Passo 5 Sente na privada e faça cocô no papel coletor. Limpe-se quando terminar. <u>Não ponha o papel na privada.</u> *Se alguém estiver lhe ajudando, você pode pedir para ele/ela sair do banheiro nesse passo.</p>		<p>Passo 6 Desenrosque a tampa do tubo plástico com muito cuidado para o líquido não derramar. Seu tubo contém uma colher anexada a tampa. *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.</p>

	<p>Passo 7a Usando a colher grudada na tampa, retire um pedacinho do seu cocô de três localidades diferentes do seu cocô. Cada pedacinho deve ser colocado dentro do tubo. Cada vez que colocar a colher com o cocô no tubo, observe a altura do líquido do tubo.</p>		<p>Passo 7b Quando o líquido atingir a linha preta, você deve parar de colocar cocô no tubo. <u>Não coloque mais do que isso. Não raspe a colher no papel coletor, pois isso irá prejudicar a amostra.</u> *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.</p>
	<p>Passo 8 Feche a bem tampa e agite suavemente até que o seu cocô esteja bem misturado com o líquido do tubo. Limpe qualquer resíduo do tubo com o lenço umedecido de álcool. *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.</p>		<p>Passo 9 Rasgue o papel coletor dos dois lados e deixe na água do vaso por um minuto. (antes de dar descarga). *Se alguém estiver lhe ajudando, ele/ela deverá fazer este passo.</p>

4. Preencha a ficha que você recebeu com as informações necessárias sobre a coleta
5. Guarde o tubo plástico que contém a sua amostra de cocô na bolsa plástica com fecho zip
6. Insira esse saquinho com o tubo e a folha de coleta dentro do envelope que você recebeu.
7. Verifique se seu nome está escrito no envelope do lado de fora.
 - a. Se você coletou a amostra no mesmo dia que o(a) entrevistador(a) foi a sua casa, dê a ele(a) o envelope.
 - b. Se você coletou a sua amostra em outro dia, ponha o envelope em um local fresco e seco em sua casa e aguarde que a equipe de pesquisa entrará em contato e buscará a amostra em sua casa.

ATENÇÃO!!

Caso o papel coletor rasque, você poderá usar o kit alternativo (saco plástico azul e luvas brancas). O papel plástico azul deve ser usado no lugar do papel coletor Fe-Col®, descrito no passo 2. As mesmas instruções devem ser seguidas, entretanto, o descarte do saco plástico deve ser feito no saco de lixo comum. Não dê a descarga com o saco plástico do kit alternativo.

Acesse nosso tutorial (MICROBIOMA - SOP) no link <https://www.youtube.com/watch?v=gTPwLUsXTAo>

Em caso de dúvidas, você pode ligar para Centro de Pesquisas em Saúde Dr. Amílcar Gigante a cobrar: 9090 3284 1301 ramais: 357 e 368 - QG 2004

SEÇÃO II.

MODIFICAÇÕES NO PROJETO DE PESQUISA

Durante a atualização e revisão dos dados do projeto, verificamos necessária a atualização de alguns dados como informações relacionadas sobre o sequenciamento aleatório em genomas inteiros, conhecido como *shotgun*. Anteriormente foi declarado no projeto que “as moléculas longas de DNA são quebradas aleatoriamente em fragmentos que são então sequenciadas. Assim, todo o genoma bacteriano pode ser sequenciado (Weinstock, 2012)”, entretanto, ressaltamos que as moléculas de DNA não são necessariamente quebradas.

Conforme descrito no projeto apresentado, inicialmente contava-se com a condução de um estudo de revisão sistemática de literatura com o objetivo de compilar de maneira abrangente e funcional os fatores genéticos do hospedeiro capazes de modular as características da composição da microbiota intestinal. Porém, segundo a busca realizada em maio de 2022 foram encontrados 10 estudos sobre o tema no GWAS Catalog e foram incluídos mais seis a partir das referências, totalizando 16 estudos que seriam incluídos na revisão sistemática. Durante a etapa de compilação e análise das informações, observou-se que os artigos baseados em GWAS resumiam e englobavam, de maneira consolidada, os achados dos demais trabalhos, o que tornava os resultados redundantes e limitava a originalidade da revisão.

Portanto, foi feita proposta de realização de um terceiro artigo original como substituto ao artigo de revisão sistemática à banca de qualificação. O artigo proposto e aceito para elaboração tem como base a subamostra da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004. Nele, foi investigada a relação entre a prática de amamentação aos 3 meses e a composição da microbiota intestinal aos 12 anos de idade. Este estudo é justificado pelo papel fundamental da amamentação como um dos principais determinantes da microbiota intestinal, reconhecido como um dos primeiros fatores que influenciam o crescimento bacteriano. Tal relação é descrita no projeto de pesquisa, seção 2, Marco Teórico, 2.4, Determinantes do microbioma intestinal, destacando os oligossacarídeos presentes no leite humano (HMOs) como compostos que atuam como prebióticos, promovendo o crescimento de bactérias específicas. Isso, por sua vez, influencia a composição da microbiota intestinal neonatal e a função gastrointestinal (Milani et al., 2017).

O objetivo foi investigar a associação entre o aleitamento materno e a

composição da microbiota intestinal e comparar a microbiota daqueles alimentados exclusivamente com leite materno daqueles que receberam outros líquidos, como leite de vaca ou em pó. Foram considerados como exposição o tempo de duração da amamentação e a amamentação exclusiva aos 3 meses e como desfecho as variáveis de abundância relativa dos táxons bacterianos a nível de gênero.

O título original da tese — “Avaliação do papel de fatores genéticos e consumo de ultraprocessados na microbiota intestinal humana na adolescência” — foi inicialmente proposto com base nos objetivos do projeto, focando principalmente na investigação do consumo de alimentos ultraprocessados e do papel da genética na composição da microbiota intestinal. Entretanto, ao longo da pesquisa, a substituição do terceiro artigo original que aborda a influência do aleitamento materno na composição bacteriana de adolescentes, fez-se necessário uma adaptação ao título original acoplando um fator alimentar relevante. Portanto, ampliamos a abrangência da pesquisa e o novo título foi definido com base nisso: “Avaliação do papel de fatores genéticos e alimentares na microbiota intestinal humana na adolescência”, contemplando tanto a amamentação como o consumo de alimentos ultraprocessados.

Outra alteração após a qualificação, refere-se à análise de dados do artigo 2, que preconizava avaliar as diferenças através de regressão logística no software Stata. Houve uma alteração devido a complexidade dos dados trabalhados. Selecionamos para análise a partir do GWAS mais recente sobre microbiota intestinal (Kurilshikov et al., 2021) os SNPs relatados como significativamente associados a uma ou mais características da microbiota na amostra de referência (N = 31 SNPs, valor de $p < 5 \times 10^{-8}$). Empregamos modelos de regressão linear e logística, sob modelo genético aditivo, conforme natureza das variáveis e analisamos a associação entre exposição e desfecho no software PLINK, ajustando para sexo e dez componentes principais de ancestralidade, que explicam o máximo possível da variância total, para corrigir a estratificação populacional.

SEÇÃO III

Relatório de Trabalho de Campo



Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Medicina
Departamento de Medicina Legal
Programa de Pós-graduação em Epidemiologia



**COORTE DE NASCIMENTO DE 2004 DE PELOTAS-RS:
ACOMPANHAMENTO DA COVID-19**

Pelotas

2022

Autoras:

Bianca Del Ponte da Silva

Etiene Dias Alves

Júlia de Souza Rodrigues

Colaboradores:

Luciana Tovo Rodrigues

Deise Cristina Modesto

Alicia Matijasevich

SUMÁRIO

1. Coorte de nascimentos de 2004	Erro! Marcador não definido.
2. Acompanhamento COVID-19	Erro! Marcador não definido.
3. Atividades anteriores ao trabalho de campo	Erro! Marcador não definido.
3.1 Recrutamento de pessoal (entrevistadoras)	Erro! Marcador não definido.
3.2 Recrutamento de pessoal (agendadoras)	Erro! Marcador não definido.
3.3 Treinamentos específicos	Erro! Marcador não definido.
3.3.1 Questionários	Erro! Marcador não definido.
3.3.2 Coleta de cabelo	Erro! Marcador não definido.
3.4 Estudo piloto	Erro! Marcador não definido.
4. Instrumentos de pesquisa	Erro! Marcador não definido.
4.1 RedCap	Erro! Marcador não definido.
4.2 Questionários	Erro! Marcador não definido.
4.2.1 Questionário geral da mãe	Erro! Marcador não definido.
4.2.2 Questionários aplicados ao adolescente	Erro! Marcador não definido.
4.2.2.1 Questionário geral do(a) adolescente	Erro! Marcador não definido.
4.2.2.2 Questionário confidencial do(a) adolescente	Erro! Marcador não definido.
4.3 Equipamentos	Erro! Marcador não definido.
4.3.1 Coleta de cabelo, número	Erro! Marcador não definido.
5. Manuais de instrução	Erro! Marcador não definido.
6. Trabalho de campo	Erro! Marcador não definido.
6.1 Início do trabalho de campo	Erro! Marcador não definido.
6.2 Logística do trabalho de campo	Erro! Marcador não definido.
6.2.1 Estratégias de busca dos(as) adolescentes	Erro! Marcador não definido.
6.2.1.1 Divulgação na imprensa local e redes sociais	Erro! Marcador não definido.
6.2.1.2 Tentativa de contato pelo Facebook e Whatsapp	Erro! Marcador não definido.
6.2.1.3 Rastreamento de endereços não encontrados	Erro! Marcador não definido.
6.2.1.4 Jovens residentes em outros municípios e entrevistas telefônicas	Erro! Marcador não definido.
6.3 Visitas domiciliares	Erro! Marcador não definido.
6.4 Entrevistas	Erro! Marcador não definido.
6.5 Suporte remoto via Whatsapp	Erro! Marcador não definido.
7. Controle do andamento do trabalho de campo	Erro! Marcador não definido.
8. Controle de qualidade dos dados	Erro! Marcador não definido.
9. Reversão de recusas	Erro! Marcador não definido.
10. Reversão das perdas na coleta de cabelo	Erro! Marcador não definido.

11. Gerenciamento dos dados	Erro! Marcador não definido.
11.1 RedCap	Erro! Marcador não definido.
11.2 Análise de inconsistências	Erro! Marcador não definido.
12. Equipe	Erro! Marcador não definido.
12.1 Reuniões de trabalho	Erro! Marcador não definido.
12.1.1 Pesquisadores, supervisão e colaboradores	Erro! Marcador não definido.
12.1.2 Equipe	Erro! Marcador não definido.
12.2 Alterações na equipe no decorrer do trabalho de campo	Erro! Marcador não definido.
13. Aspectos financeiros	Erro! Marcador não definido.
14. Questões éticas	Erro! Marcador não definido.
15. Resultados preliminares do trabalho de campo	Erro! Marcador não definido.
15.1 Panorama geral	Erro! Marcador não definido.
15.2 Banco de dados	Erro! Marcador não definido.
ANEXOS	Erro! Marcador não definido.
ANEXO 1 - FORMULÁRIO DE INSCRIÇÃO DE ENTREVISTADORES	Erro! Marcador não de
ANEXO 2 - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO ADOLESCENTE	Erro! Marcador não definido.
ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DA MÃE OU REPONSÁVEL	Erro! Marcador não definido.
ANEXO 4 - CONTROLE DE QUALIDADE (MÃE/RESPONSÁVEL)	Erro! Marcador não definido.
ANEXO 5 - CONTROLE DE QUALIDADE (ADOLESCENTE)	Erro! Marcador não definido.
ANEXO 6 - LISTA DE SERVIÇOS EM SAÚDE	Erro! Marcador não definido.
ANEXO 7 - MANUAL	
Erro! Marcador não definido.	

1. Coorte de nascimentos de 2004

A “Coorte de Nascimentos de 2004” é um estudo longitudinal coordenado pelos pesquisadores Dra. Iná Santos, Dra. Alicia Matijasevich, Dr. Aluísio Barros e Dra. Luciana Tovo Rodrigues. No ano de 2004, todos os nascidos vivos na cidade de Pelotas, cujas famílias residiam no local, foram elegíveis para participar do estudo, que objetivou avaliar aspectos da saúde dos participantes. Das 4.263 crianças identificadas, os pais de 4.231 aceitaram participar do estudo, caracterizando o estudo perinatal e o tamanho de amostra dessa coorte.

Foram realizados sete acompanhamentos desde 2004, aos 3, 12, 24, 48 meses e 6-7, 10 anos e 15-16 anos. Este relatório descreve o acompanhamento sobre a COVID-19 da coorte. No estudo perinatal, as mães foram entrevistadas quanto às características socioeconômicas, demográficas e reprodutivas e à utilização de serviços de saúde, padrão de amamentação, estilos de vida e morbidade. As entrevistas e exames de recém-nascidos foram realizados nas maternidades. Nos acompanhamentos aos 3, 12, 24 e 48 meses de idade, a mãe ou cuidadora foi entrevistada e a criança examinada em casa. Foram coletadas informações sobre características socioeconômicas e demográficas, utilização de serviços de saúde, práticas alimentares, estilos de vida e crescimento infantil, desenvolvimento e morbidade desde o nascimento. Em 2010/2011, foi realizado o acompanhamento dos 6-7 anos de idade já na clínica do Centro de Pesquisas Epidemiológicas (CPE) Dr. Amílcar Gigante da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Foram coletadas informações detalhadas de saúde, dieta e estilo de vida das famílias, condições de moradia, comportamentos de saúde, assistência médica e qualidade de vida das crianças e mães. Também foram realizadas medidas antropométricas, avaliação da composição corporal e atividade física, espirometria e pressão arterial, além da aplicação de testes para avaliação da cognição e saúde mental a todas as crianças. Em 2015, no acompanhamento dos 10 anos de idade, as crianças e suas mães foram novamente avaliadas na clínica do CPE. Foram aplicados dois questionários: um direcionado à mãe, contendo informações detalhadas sobre cuidados e saúde da criança, características da mãe, família e domicílio, além de saúde materna e qualidade de vida; e outro

aplicado a criança, contendo questões sobre escola, atividade física, sono, alimentação, eventos estressores, percepção corporal, escala de faces, computador/internet, locus de controle, saúde bucal, menstruação (apenas para as meninas) e um questionário confidencial. Também foram realizadas medidas antropométricas, avaliação da composição corporal, pressão arterial e espirometria, além de testes para avaliação da cognição e saúde mental das crianças e de suas mães e/ou responsáveis. Detalhes metodológicos referentes aos acompanhamentos prévios da Coorte de 2004 já se encontram publicados (Santos et al., 2011; Santos et al., 2014).

2. Acompanhamento COVID-19

O acompanhamento da COVID-19 foi realizado de maneira presencial entre 02/09/2021 e 30/12/2021, em sua maior parte, na residência das famílias participantes. Ao todo, foram entrevistados 1.831 adolescentes, correspondendo a uma taxa de acompanhamento de 94,0%. A Tabela 1 apresenta o número de participantes incluídos em cada acompanhamento. A taxa de acompanhamento em cada visita foi calculada dividindo-se o total obtido pela soma entre o número de entrevistas realizadas e o número de óbitos acumulados no período pelo número de nascidos vivos.

3. Atividades anteriores ao trabalho de campo

O planejamento do acompanhamento Covid anos teve início em agosto de 2021, a partir da seleção e elaboração de instrumentos a serem utilizados e organização da logística a ser seguida. A equipe de pesquisa do acompanhamento foi composta pela coordenadora do trabalho de campo, professora Luciana Tovo Rodrigues, pela pós-doutoranda e supervisora do trabalho de campo Bianca Del Ponte da Silva, doutorandas Etiene Dias Alves e Júlia de Souza Rodrigues e coordenadores do estudo, professores Iná Santos, Alicia Matijasevich e Aluísio Barros. Uma série de reuniões mensais de equipe sucederam-se até que o trabalho pudesse ser iniciado. Nestas reuniões foram definidos a logística, os instrumentos e os exames a serem aplicados.

O presente relatório de trabalho de campo descreve, a seguir, todas as

atividades desenvolvidas no acompanhamento dos membros da Coorte de 2004, em 2021.

Tabela 1. Descrição dos números referentes a cada acompanhamento realizado na Coorte de Nascimentos de 2004. Pelotas-RS.

Acompanhamento	Perinatal	3 meses	12 meses	24 meses	48 meses	6 anos	10 anos	15-16 anos	COVID-19***
Entrevistas realizadas	4.231	3.985	3.907	3.869	3.799	3.722	3.566	2.029	1.826
Óbitos	-	66*	82*	88*	94*	95*	98*	102*	103*
Recusas (%)	32 (0,8)	26 (0,6)	26 (0,6)	40 (0,9)	51 (1,2)	27 (0,6)	68 (1,6)	76 (1,8)	57 (2,9)
Perdas (%)	-	154 (3,6)	216 (5,1)	234 (5,5)	287 (6,8)	387 (9,2)	499 (11,8)	2.024 (47,8)**	65 (3,3)
Perdas + Recusas (%)	32 (0,8)	180 (4,3)	242 (5,7)	274 (6,5)	338 (8,0)	414 (9,8)	567 (13,4)	2.100 (49,6)	122 (6,3)
Taxa de Acompanhamento (%)	99,2	95,7	94,3	93,5	92,0	90,2	86,6	50,4	93,4

* Número cumulativo.

** Acompanhamento interrompido devido à pandemia de COVID-19.

*** A amostra de referência é equivalente ao número de adolescentes acompanhados presencialmente aos 15-16 anos (N=1949).

3.1 Recrutamento de pessoal (entrevistadoras)

Entre os dias 11 e 27 de agosto de 2021, ocorreu a seleção da equipe de entrevistadoras da Coorte de 2004. O processo de seleção ocorreu por meio de uma chamada pública disponibilizada no dia 10 de agosto de 2021, nos sites da UFPEL, do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia (PPGEpi) ([Centro de Epidemiologia Ufpel || Pesquisas Epidemiológicas \(epidemioufpel.org.br\)](http://Centro de Epidemiologia Ufpel || Pesquisas Epidemiológicas (epidemioufpel.org.br))), no perfil do Facebook “Coortes Pelotas” e também enviado para divulgação via *e-mail* para a rede de contatos da secretaria do PPGEpi.

Em um primeiro momento, foi estabelecido o contato com as entrevistadoras que atuaram no acompanhamento da Coorte de 2004 realizado aos 15 anos, a fim de verificar se teriam interesse e disponibilidade de horário para darem continuidade ao trabalho neste novo acompanhamento. Seis candidatas que haviam participado do acompanhamento anterior da coorte

demonstraram interesse em participar, e passaram diretamente para etapa de treinamento. Foi aberto, então, um processo seletivo para o preenchimento de 9 vagas. Houveram 103 candidatas inscritas. Os critérios para pontuação foram: ensino superior completo, disponibilidade de horário avaliado pela análise curricular e pelo formulário de inscrição (Anexo I) enviado para o email da Coorte 2004. Um total de 77 participantes preencheram os requisitos exigidos acima. Levando em consideração a disponibilidade aos finais de semana e experiência prévia em pesquisa de campo na área da saúde, 35 candidatas foram selecionadas para o treinamento.

Devido a necessidade de contratação de novas entrevistadoras após o primeiro mês de trabalho de campo, uma segunda chamada foi aberta no dia 14/10/2021 no site do PPGEpi ([Centro de Epidemiologia Ufpel || Pesquisas Epidemiológicas \(epidemiio-ufpel.org.br\)](http://Centro de Epidemiologia Ufpel || Pesquisas Epidemiológicas (epidemiio-ufpel.org.br))) no perfil do *Facebook* “Coortes Pelotas” e também enviado para divulgação via *e-mail* para a rede de contatos da secretaria do PPGEpi. O processo seletivo possuiu o mesmo formato do processo anterior. Houveram 17 inscrições para 2 vagas de entrevistadora. Um total de 13 participantes preencheram os requisitos para pontuação e foram selecionadas para a etapa de treinamento.

O primeiro treinamento de entrevistadoras foi conduzido por método teórico-prático durante um período de três dias (21 horas) e ocorreu nos dias 25, 26 e 27 de agosto de 2021. O segundo treinamento de entrevistadoras foi conduzido no mesmo formato do primeiro e ocorreu nos dias 26, 27 e 28 de outubro de 2021. O corpo de pesquisadores responsáveis pelos treinamentos foram as professoras Alicia Matijasevich, Luciana Tovo Rodrigues, as pós-doutorandas Bianca Del Ponte, os doutorandos Etiene Alves, Júlia Rodrigues, Karen Sanchez e Pedro Crespo e a secretária Deise Modesto.

A avaliação das candidatas foi realizada a partir de uma prova prática, que ocorreu no último dia de ambos os treinamentos, utilizando como critérios: desenvoltura, participação, interesse e presença. A partir desta avaliação, foi selecionada a equipe de trabalho de campo e definido os turnos de trabalho conforme disponibilidade das selecionadas.

3.2 Recrutamento de pessoal (agendadoras)

Três agendadoras que já haviam participado dos acompanhamentos anteriores da Coorte de 2004 foram contactadas e aceitaram participar deste acompanhamento. Na sétima semana de campo, uma agendadora pediu desligamento. Para sua substituição, foi preciso abrir uma nova seleção e realizar um novo treinamento.

A nova seleção ocorreu por meio de edital divulgado no site do PPGEpi ([Centro de Epidemiologia Ufpel || Pesquisas Epidemiológicas \(epidemioufpel.org.br\)](http://Centro.de.Epidemiologia.Ufpel.//Pesquisas.Epidemiologicas.epidemioufpel.org.br)), no dia 14/10/2021. As candidatas se inscreveram até o dia 20/10. Houveram 15 inscrições para a vaga de agendadora. A avaliação das candidatas foi conduzida pela professora Luciana Tovo Rodrigues, pela pós-doutoranda Bianca del Ponte e pela secretária Deise Modesto.

Após análise do currículo e formulário enviado, 13 (treze) candidatas foram selecionadas para entrevista online, que ocorreu no dia 22/10. Após a entrevista com as candidatas para a vaga de agendadora, 5 candidatas foram selecionadas para uma prova prática que ocorreu no dia 25/10. A candidata que obteve melhor desempenho foi selecionada para a vaga, e as candidatas restantes foram classificadas para suplência.

3.3 Treinamentos específicos

Após designada a função de cada membro da equipe, deu-se início aos treinamentos específicos, que ocorreram dos dias 25 de agosto a 27 de agosto de 2021 e 26 de outubro a 28 de outubro de 2021. Estes foram divididos da seguinte forma:

3.3.1 Questionários

O primeiro treinamento ocorreu nos dias 25 e 26 de agosto nos períodos da manhã e tarde, e 27 de agosto pela manhã. O segundo treinamento ocorreu nos dias 26 e 27 de outubro nos períodos da manhã e tarde e 28 de outubro pela manhã. O corpo de pesquisadores responsáveis pelo treinamento foram as professoras Alicia Matijasevich, Luciana Tovo Rodrigues, as pós-doutorandas Bianca Del Ponte, os doutorandos Etiene Alves, Júlia Rodrigues, Karen Sanchez e Pedro Crespo e a secretária Deise Modesto. Para realização

desta etapa, foi realizada a leitura em grupo dos manuais e questionários, assim como a prática da aplicação dos questionários por meio de simulação das visitas domiciliares.

3.3.2 Coleta de cabelo

O treinamento da coleta de cabelo ocorreu dia 27 de agosto de 2021 (primeiro treinamento) e dia 28 de outubro de 2021 (segundo treinamento). Para a realização desta etapa, as coletas foram simuladas em uma peruca de cabelo. Algumas candidatas e membros da equipe de treinamento se voluntariaram para que pudessem coletar seus cabelos durante a prática. Os dois treinamentos foram coordenados pela Professora Luciana Tovo Rodrigues e pela doutoranda Etiene Dias, com colaboração de Clarice Brinck Brum e Deise Faria Freitas.

3.4 Estudo piloto

O estudo piloto foi realizado no dia 30 de agosto de 2021. O trabalho foi supervisionado pelas doutorandas, coordenadora e supervisora de trabalho de campo, que observaram o funcionamento da logística proposta para o acompanhamento Covid da Coorte de 2004.

A equipe foi dividida conforme o turno de trabalho e realizou-se uma simulação de acompanhamento, com 7 adolescentes e mães voluntários. A simulação contemplou todas as etapas da entrevista. Essa estratégia permitiu avaliar a logística inicialmente proposta, desde a chegada da entrevistadora à casa da família e a leitura dos termos de consentimento e assentimento, até a sua saída, com entrega do brinde. Através do estudo piloto foi possível também estimar o tempo de permanência da entrevistadora no local da entrevista.

4. Instrumentos de pesquisa

4.1 RedCap

O REDCap (*Research Electronic Data Capture*) é um software

desenvolvido e implantado inicialmente na Universidade *Vanderbilt*, EUA. O software RedCap é utilizado para a captura de dados eletrônicos e para a organização da logística de trabalho com bases de dados (Harris et al., 2009). Ele pode operar em navegadores web por meio de dispositivos eletrônicos (tablet, celular e computador), e permite que a captura dos dados seja realizada tanto online como offline. O RedCap é amplamente utilizado na comunidade acadêmica, sendo o consórcio REDCap uma rede internacional de cerca de 2500 instituições associadas .

4.2 Questionários

Os questionários aplicados aos participantes e às mães podem ser acessados, na íntegra, no link: <https://epidemiologia-ufpel.org.br/coorte-2004/>. A seguir os demais materiais são apresentados em anexo neste relatório.

4.2.1 Questionário geral da mãe

Foi aplicado ao responsável, preferencialmente à mãe do(a) adolescente. O questionário era composto pelos seguintes blocos:

Bloco A (identificação): com questões incluindo nome e número de identificação do(a) adolescente, nome da entrevistadora, data e horário do início da entrevista, grau de parentesco do responsável com o(a) adolescente, se o responsável residia com o(a) adolescente, se o(a) adolescente tem irmão(ã) gêmeo(a) e em caso afirmativo, se este residia com ele(a).

Bloco B (saúde do adolescente): composto questões relacionadas à saúde do(a) adolescente, possíveis medicamentos que possam ter sido usados nos últimos 15 dias, se utilizou corticóides nos últimos 3 meses, se deixou de usar algum remédio por não ter conseguido comprar.

Bloco C (características da mãe, da família e do domicílio): composto por questões que abordam temas como trabalho atual e situação do emprego durante a pandemia do novo coronavírus, fumo, renda da casa e auxílio

emergencial.

Bloco D (Covid): composto por 10 (dez) questões que abordam a rotina e hábitos do(a) adolescente durante a pandemia do novo Coronavírus.

Bloco E (SQD): composto por 24 questões que procuram saber uma descrição do(a) adolescente pelo ponto de vista da mãe.

Bloco F (saúde da mãe): composto por uma questão relacionada a como a mãe considera sua saúde.

Bloco G (CTSPC): 12 questões referentes ao tratamento da mãe ou do pai dado ao(a) adolescente quando este(a) se comporta mal, desobedece ou faz coisas erradas.

Bloco H (Edimburgo): composto por 10 questões, com quatro opções de resposta.

Nos casos em que o(a) adolescente tinha irmão(ã) gêmeo(a), aplicava-se um questionário reduzido, contendo informações referentes ao segundo filho, sem que fosse necessário refazer as questões relacionadas à mãe/responsável e ao domicílio. Eram aplicados os **BLOCOS A** (identificação), **B** (saúde do adolescente), **D** (covid), **E** (SQD) e **G** (CTSPC).

4.2.2 Questionários aplicados ao adolescente

4.2.2.1 Questionário geral do(a) adolescente

O questionário aplicado ao(à) adolescente foi composto pelos seguintes blocos:

BLOCO A (Identificação): composto por que incluem nome, número de identificação do adolescente, nome da entrevistadora, data e horário de início da entrevista. Também foi perguntado se o(a) adolescente tinha algum telefone próprio, *Instagram*, *Facebook* e e-mail.

BLOCO B (escola): composto por 4 questões que contêm informações sobre o modo como o aluno teve aulas durante o primeiro ano da pandemia do coronavírus, qual tipo de escola estuda, se está tendo aulas presenciais e/ou *on-line*.

BLOCO C (Covid-19): composto por 9 questões sobre a pandemia do novo coronavírus

BLOCO D (distanciamento social e covid-19)

BLOCO E (trabalho)

BLOCO F (lazer e tempo de tela)

BLOCO G (atividade física)

BLOCO H (saúde)

BLOCO I (locus de controle)

BLOCO J (autoestima)

BLOCO K (controle emocional)

BLOCO L (sentimentos e comportamentos)

BLOCO M (sono)

BLOCO N (cortisol)

BLOCO O (estresse - instrumento dass-21)

BLOCO P (eventos estressantes)

BLOCO Q (sociedade brasileira)

BLOCO R (estado social subjetivo)

4.2.2.2 Questionário confidencial do(a) adolescente

O questionário confidencial era aplicado após o questionário geral. O(A) adolescente era questionado(a) sobre a capacidade de manusear o *tablet*, assim como sobre a compreensão das questões. Caso não apresentasse dificuldade, o questionário era auto aplicado, período no qual o(a) adolescente permanecia sozinho(a) na sala de entrevista. Se apresentasse dificuldade no uso com *tablet*, o confidencial era aplicado na versão impressa e se o(a)adolescente não fosse alfabetizado, as questões eram lidas pela entrevistadora, que orientava o(a) participante na marcação das respostas. O questionário aplicado foi composto pelas seguintes blocos:

BLOCO A (*cigarros*): composto por duas questões envolvendo consumo de cigarro e cigarro eletrônico.

BLOCO B (*brigas e violência*): composto por 28 questões sobre comportamentos que podem colocar jovens em problemas com a lei e situações que poderiam já ter acontecido na vida do(a) adolescente, como roubar, arrombar casas ou carros e vender drogas; nove questões sobre brigas e violência; sete questões sobre relação do(a) adolescente com os pais e entre seus pais; e mais duas questões sobre separação dos pais.

4.3 Equipamentos

4.3.1 Coleta de cabelo, número

Foi realizada a coleta de uma mecha de cabelo dos(as) adolescentes. Para a realização desta coleta, os materiais utilizados foram:

Material de coleta, uso coletivo:

1. Tesoura
2. Folhas papel toalha

3. Álcool 70%
4. Clipe de escritório (1)
5. Etiquetas de identificação do participante
6. Medidor de coleta, retângulo de papel furado para padronizar a quantidade de cabelo a coletar
7. Coletor de lixo contaminado
8. Secador de cabelo
9. Kit de coleta de uso individual

Kit para coleta, uso individual e descartável:

1. Saco Ziplock
2. Cartão de papel
3. Papel toalha
4. Pente e cliques de cabelo (2)
5. Clipe de escritório (1)
6. Barbante

5. Manual de instrução

Os manuais de instruções do estudo serviram como guia e apoio para o pessoal de campo. Foi elaborado um manual de instruções para auxiliar as entrevistadoras (ANEXO 7). O manual é referente aos questionários e continham instruções e respostas às possíveis dúvidas específicas de cada uma das questões. Além disso, traziam orientações gerais sobre material básico, rotina de trabalho, apresentação pessoal e postura, entre outras.

6. Trabalho de campo

6.1 Início do trabalho de campo

O trabalho de campo deste acompanhamento teve início no dia 02 de setembro de 2021. As entrevistas começaram a ser realizadas no domicílio em que residiam os adolescentes com o acompanhamento de suas mães ou responsáveis.

6.2 Logística do trabalho de campo

Todos os(as) adolescentes e seus responsáveis eram convidados a participar do estudo mediante agendamento telefônico. A mãe ou responsável autorizava por telefone a visita em domicílio e, então, o agendamento era realizado. Inicialmente, eram agendadas 30 entrevistas por dia. Esse número foi sendo reduzido gradativamente conforme o número total da amostra de participantes foi decrescendo. Três estratégias de busca foram adotadas para tentar localizar aquelas famílias as quais não foi possível contactar somente via telefone.

6.2.1 Estratégias de busca dos(as) adolescentes

6.2.1.1 Divulgação na imprensa local e redes sociais

Com o objetivo de divulgar o acompanhamento sobre a COVID-19 da Coorte de 2004 e incentivar a participação dos(as) adolescentes no estudo, foi realizada a divulgação deste novo acompanhamento no perfil da coorte no *Facebook* ([Coorte 2004 — Publicações | Facebook](#)).

6.2.1.2 Tentativa de contato pelo *Facebook* e *Whatsapp*

Durante o trabalho de campo, as famílias que não foram contactadas através de tentativas por telefone, foram contactadas via *Facebook* e/ou *Whatsapp*. O contato foi feito através do perfil oficial da Coorte de 2004 do *Facebook* e através do *Whatsapp* da Coorte de 2004. A mensagem enviada consistiu em um texto padronizado, convidando as mães ou responsável a participarem deste novo acompanhamento. Uma vez tendo sucesso no contato, o agendamento era realizado e os dados cadastrais atualizados.

6.2.1.3 Rastreamento de endereços não encontrados

Durante o trabalho de campo, dois rastreadores ficaram responsáveis

pela localização dos domicílios daqueles adolescentes em que não foi possível o contato via telefone e/ou redes sociais. Inicialmente, apenas um rastreador era responsável por essa tarefa, mas, em seguida, ele solicitou afastamento da função e outra pessoa foi contratada.

Os rastreadores utilizavam como referência o endereço que constava no cadastro atualizado nos acompanhamentos anteriores. Uma vez localizado o adolescente e/ou responsável, o rastreador efetuava imediatamente uma ligação para o CPE a fim de realizar o agendamento da visita domiciliar e também atualizar as informações do cadastro.

6.2.1.4 Jovens residentes em outros municípios e entrevistas telefônicas

Alguns adolescentes estavam residindo fora da cidade de Pelotas. Para esses participantes, era feita a proposta de realizarem a entrevista por telefone. Dessa forma, as entrevistas eram agendadas com a mãe ou responsável e posteriormente realizadas via telefone pelas entrevistadoras. As ligações eram efetuadas no QG da Coorte de 2004 localizado no CPE, sob supervisão da pós-doutoranda Bianca Del Ponte e pela doutoranda Etiene Alves. Os participantes residiam em diferentes locais como: outros estados do Brasil, como Rio Grande do Norte, Paraná e Santa Catarina e outras cidades do Rio Grande do Sul. As entrevistas então, eram realizadas na clínica ou por telefone.

6.3 Visitas domiciliares

As visitas domiciliares eram realizadas mediante agendamento prévio e confirmação da mãe ou responsável no dia anterior. Apenas uma agendadora era responsável por cada visita domiciliar. Antes de sinalizar chegada na residência, a entrevistadora já estava utilizando um crachá de identificação e os EPIs. Após sinalizada a chegada, a entrevistadora se identificava e dadas as concessões da família, a entrevista era iniciada.

6.4 Entrevistas

As entrevistas contaram com as seguintes etapas principais:

- ***Leitura do TCLE***

A leitura do TCLE (ANEXO 3) era realizada pela entrevistadora em voz alta, enquanto a mãe ou responsável acompanhava a leitura em outra via entregue. Após a leitura, eventuais dúvidas eram tiradas e as assinaturas coletadas.

- ***Aplicação do questionário da mãe ou responsável e questionário do segundo gêmeo***

O questionário da mãe ou responsável e do segundo gêmeo, quando era o caso, eram aplicados pela entrevistadora em modelo de pergunta e repostas. Os questionários eram aplicados e as informações coletadas pelo RedCap em um tablet. Em casos de eventuais problemas com o *tablet*, os formulários eram aplicados em papel e depois passados para o sistema do RedCap.

- ***Leitura do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE)***

A leitura do TALE (ANEXO 2) era realizada pela entrevistadora em voz alta, enquanto o(a) adolescente acompanhava a leitura em outra via entregue. Após a leitura, eventuais dúvidas eram tiradas e as assinaturas coletadas. Quando era o caso de gêmeos, a leitura do TALE era realizada individualmente a cada um dos gêmeos.

- ***Aplicação do questionário geral do adolescente***

O questionário do adolescente foi aplicado pela entrevistadora em modelo de pergunta e respostas, assim como o questionário da mãe. O questionário era aplicado e as informações eram coletadas pelo RedCap em um tablet. Em eventuais problemas com o *tablet*, os formulários eram aplicados em papel e depois passados para o sistema do RedCap. Quando era o caso de

gêmeos, o questionário geral do adolescente era aplicado individualmente a cada um dos gêmeos.

- **Questionário confidencial**

Ao final da entrevista, o(a) adolescente era solicitado a responder ao questionário confidencial, seguindo todas as exigências do protocolo para a aplicação do instrumento. Quando era o caso de gêmeos, o questionário confidencial era aplicado individualmente a cada um dos gêmeos logo após a aplicação do questionário geral do adolescente.

- **Coleta de cabelo**

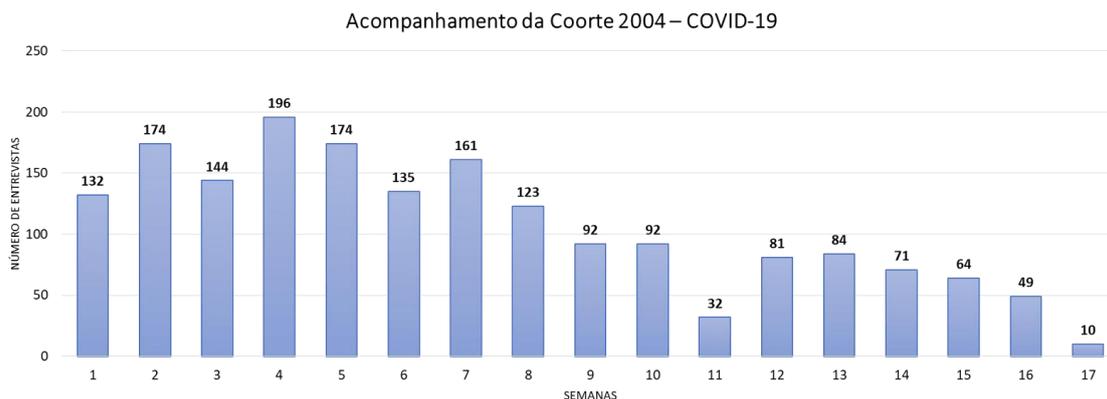
Durante a entrevista, após determinado bloco de questões, a entrevistadora explicava o procedimento da coleta de cabelo para o participante, questionava-o se aceitaria que fosse coletada uma amostra de seu cabelo, da região da cabeça conhecida como “coroa”, para posterior medida de cortisol capilar.

As entrevistadoras carregavam consigo o material específico para esse procedimento e a coleta era realizada apenas no adolescente. Era necessário o registro no caderno de campo do número de ID e nome do/a adolescente ao qual a coleta seria realizada, assim como na folha de coleta. Ao final do procedimento, o saco onde a mecha de cabelo estava era selado com o clipe de escritório, era feito um registro fotográfico da ficha da coleta para comunicação as doutorandas que estivessem na supervisão.

6.5 Suporte remoto via *Whatsapp*

Todos os dias (incluindo domingos e feriados) em que havia trabalho de campo, uma das doutorandas ficava responsável pelo plantão no grupo de entrevistadoras do *Whatsapp*. O revezamento dos plantões entre as duas doutorandas ocorreu alternando os dias da semana. Os plantões serviam como suporte remoto para as entrevistadoras que estavam em campo em caso de quaisquer dúvidas ou intercorrências.

7. Controle do andamento do trabalho de campo

Figura 1: Número de entrevistas realizadas por semana.

Um controle semanal da evolução do trabalho de campo era realizado por meio de um relatório elaborado pela pós-doutoranda Bianca Del Ponte. Esse relatório continha um resumo da produção a cada sete dias, sempre contabilizando os dados de quinta à quarta-feira. Neste arquivo, era apresentado o número acumulado e por semana de participantes acompanhados. Esse conteúdo era apresentado semanalmente na reunião da coordenação para os(as) membros(as) da equipe.

8. Controle de qualidade dos dados

No mês de setembro de 2021, iniciaram-se as ligações para o controle de qualidade (CQ) das entrevistas realizadas com os membros na Coorte. Foi sorteado 10% da amostra que realizou o acompanhamento em visita domiciliar (1674), totalizando 165 adolescentes e 163 mães ou responsáveis. O(A) adolescente sorteado era contactado por telefone e eram feitas dez perguntas, sendo sete em relação ao questionário geral e três para avaliação da visita domiciliar (ANEXO 4). De maneira semelhante, a mãe ou responsável sorteado também era contatado por telefone e eram feitas outras dez perguntas, sendo sete em relação ao questionário geral e três para avaliação do atendimento na clínica (ANEXO 5). O sorteio do CQ esteve sob responsabilidade da doutoranda Júlia de Souza Rodrigues. As entrevistas foram realizadas por uma bolsista de apoio técnico (Ingrid Tuchtenhagen) diretamente no REDCap. O banco foi transferido para o programa estatístico Stata 16.0®, onde serão

realizadas as análises de concordância.

9. Reversão de recusas

Alguns adolescentes e/ ou responsáveis recusaram participar do acompanhamento no primeiro contato com a responsável pelos agendamentos, ou, ainda, aceitavam o agendamento várias vezes, mas não compareciam. Portanto, ao longo do acompanhamento, os responsáveis pelos agendamentos ligavam para os responsáveis e tentavam reverter tal situação, por meio de propostas como troca de dia e horários ou realização da entrevista na clínica.

10. Reversão das perdas na coleta de cabelo

Durante o campo, algumas coletas de cabelo não foram realizadas porque o(a) adolescente estava com o cabelo muito curto, o que inviabilizou a coleta, caracterizando perda. Alguns desses adolescentes foram contatados novamente para que a coleta pudesse ser realizada um tempo depois, quando o cabelo já estivesse maior. Dessa forma, algumas perdas de coleta de cabelo foram revertidas.

11. Gerenciamento dos dados

11.1 RedCap

A maior parte dos dados coletados pelas entrevistadoras eram armazenados no aplicativo do RedCap instalado nos *tablets*, salvo exceções, em que os dados eram coletados nos questionários em papel. As coletas eram realizadas em modo *offline*. Durante todo o trabalho de campo, nas segundas-feiras, as entrevistadoras compareciam ao CPE para realizarem o *upload* dos dados no servidor do RedCap. O *upload* dos dados ficava sob responsabilidade das doutorandas. Assim que os dados eram passados para o servidor, eram deletados do aplicativo. Após esse processo, o *tablet*, então, era devolvido à entrevistadora. O processo de extração de dados do servidor e a tradução destes dados para bancos Stata® eram feitos semanalmente. Também

semanalmente, havia a conferência do banco de dados com o intuito de constatar que todas as entrevistas realizadas estavam no servidor do RedCap.

11.2 Análise de inconsistências

Semanalmente, era realizada uma análise das inconsistências do banco de dados pela doutoranda Júlia Rodrigues, por meio de um *dofile*, no qual detectava incoerência de respostas e possíveis *missing data*. Uma planilha com as inconsistências detectadas era gerada e repassada às entrevistadoras para que cada situação fosse corrigida.

12. Equipe

A coordenação do Estudo de Coorte de Nascimentos de 2004 em Pelotas é coordenada pelos(as) professores(as) Iná Santos, Alicia Matijasevich e Aluísio Barros. A coordenação geral do acompanhamento foi realizada pela Professora Luciana Tovo Rodrigues e a supervisão da clínica, pela pós-doutoranda Bianca Del Ponte. Os doutorandos Káren Sanches, Pedro Augusto Crespo da Silva, também apoiaram todo o trabalho de campo. Este acompanhamento também contou com a colaboração integral das doutorandas Júlia de Souza Rodrigues e Etiene Dias que, por meio de uma escala de revezamento, realizavam plantões diários. A equipe de trabalho de campo foi composta por 16 pessoas no total, distribuídas em diferentes cargos, conforme demonstra a Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição da equipe conforme a função.

Função	Número de pessoas
Entrevistadoras	12*
Atualização de cadastro e agendamento	3*
Secretária	1
Total	16

*De setembro a dezembro de 2021 houve rotatividade de entrevistadoras. Em média, haviam 12 entrevistadoras trabalhando em campo.

‡Uma agendadora pediu desligamento e foi prontamente substituída em 25 de outubro de 2021.

12.1 Reuniões de trabalho

12.1.1 Pesquisadores, supervisão e colaboradores

A equipe de professores pesquisadores, coordenadora, supervisora, colaboradores e doutorandos se reuniam semanalmente, por vídeo-chamada, para a discussão de estratégias de logística e busca dos(as) adolescentes, distribuição de tarefas e responsabilidades e atualização do trabalho de campo.

12.1.2 Equipe

Ao longo do trabalho de campo, foram realizadas reuniões semanais com as entrevistadoras, com o objetivo de informar eventuais mudanças na logística, questionários, postura e etc. As reuniões eram organizadas pela supervisora do trabalho de campo (Bianca Del Ponte), em conjunto com as doutorandas.

12.2 Alterações na equipe no decorrer do trabalho de campo

No decorrer do trabalho de campo, uma bolsista e algumas entrevistadoras solicitaram o desligamento, sendo necessárias novas contratações para substituí-las. Foram dois desligamentos de entrevistadoras no primeiro mês; e um de agendadora e sete de entrevistadoras no segundo mês do trabalho de campo. Para substituir as entrevistadoras, foram chamadas todas as suplentes da primeira seleção. Porém, como forma de garantir que o campo prosseguisse sem possíveis desfalques, no final de outubro de 2021, realizamos outro treinamento para o Agendamento e Entrevistadoras. Uma nova agendadora e três entrevistadoras foram contratadas. Em novembro, houve mais dois desligamentos de entrevistadoras e uma suplente do segundo treinamento foi chamada pra substituir a vaga. Como o campo já estava no final, não foi necessário substituir as duas vagas.

13. Aspectos financeiros

O controle financeiro da pesquisa ficou a cargo da coordenadora Luciana Tovo Rodrigues, com colaboração da secretária Deise Modesto. Os recursos provenientes da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) foram administrados pelo financeiro do CPE.

14. Questões éticas

O acompanhamento da COVID-19 da Coorte de 2004 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Pelotas por meio do número e parecer 4.878.509 (CAAE:44843221.3.0000.5317). Todos os participantes assinaram o TCLE e tiveram a garantia de sigilo das informações fornecidas. Mães ou responsáveis em risco de suicídio recebiam orientações gerais dos psicólogos e eram orientados a procurar serviço de atendimento médico, assim como quando a mãe relatava risco de suicídio do(a) adolescente. Uma lista dos serviços de saúde disponíveis na cidade era entregue aos responsáveis (ANEXO 6).

15. Resultados preliminares do trabalho de campo

15.1 Panorama geral

A seguir são apresentados alguns dos principais resultados do trabalho de campo.

Como panorama geral do acompanhamento, observa-se, conforme Figura 1, nas semanas 1 a 8, um número menor de jovens sendo acompanhados, devido ao agendamento ter sido programado para tal. Observa-se um declínio a partir da semana 9 devido aos casos mais difíceis de serem agendados. O trabalho de campo teve duração de 17 semanas, tendo sido iniciado no dia 02 de setembro de 2021 e finalizado no dia 30 de dezembro de 2021.

Das 4.231 crianças nascidas vivas em 2004, 102 foram detectadas

como óbitos (até o ano de 2020). Dentre os 4.129 restantes, 1.949 realizaram as entrevistas na clínica (entre 2019 e 2020) e 80 via telefone (em 2020, no período de pandemia) durante o acompanhamento dos 15 anos. Das 1949 famílias acompanhadas na clínica no acompanhamento anterior, 1827 (93,74%) foram acompanhadas neste seguimento, 57 (2,92%) recusaram a participação e 65 (3,33%) caracterizaram perdas.

Das 1827 acompanhadas, 1 óbito foi contabilizado, 1656 (90,64%) foram realizadas por meio de visita em domicílio, 119 (6,51%) por telefone e 52 (2,85%) na clínica. Uma entrevista foi realizada em partes por telefone, em partes na clínica, sendo contabilizada duas vezes na descrição anterior.

15.2 Banco de dados

O banco de dados da mãe inclui o Questionário Geral da Mãe e o Questionário Geral da Mãe (Segundo Gêmeo), e o banco de dados do adolescente inclui o Questionário Geral do Adolescente, Questionário Confidencial, as informações sobre a coleta de cabelo e o checklist sobre a entrevista.

Do total das 1826 entrevistas realizadas, 9 (0,49%) entrevistas foram realizadas de forma incompleta: 7 (0,38%) foram realizadas apenas com a mãe, e 2 (0,11%) foram realizadas apenas com o(a) adolescente. Os motivos pelos quais essas entrevistas foram realizadas de forma incompleta foram em decorrência de recusa parcial, por parte da mãe/responsável ou adolescente e em decorrência da impossibilidade de contactar a mãe/responsável ou adolescente, mesmo após o agendamento da entrevista. Além disso, 17 (0,93%) entrevistas foram realizadas com irmãos gêmeos.

Cada linha do banco de dados representa um ID e cada coluna uma variável. O banco de dados possui 1800 IDs cadastrados no banco de dados da mãe e do adolescente, 7 IDs que constam apenas no banco de dados da mãe (entrevistas incompletas) e 2 IDs que constam apenas no banco de dados do adolescente (entrevistas incompletas). Em relação aos dados de irmãos gêmeos, o cadastro dos IDs constam dentro do mesmo formulário no questionário da mãe (1 linha com os dados dos gêmeos 1 e 2) e de forma separada (1 linha com os dados do gêmeo 1 e outra linha com os dados do

gêmeo 2) no banco de dados do adolescente, totalizando 1809 linhas no banco de dados da mãe, e 1819 linhas no banco de dados do adolescente.

ANEXOS

ANEXO 1- FORMULÁRIO DE INSCRIÇÃO DE ENTREVISTADORES

 PPGE Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia		FACULDADE DE MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA			
FORMULÁRIO DE INSCRIÇÃO DE ENTREVISTADORES – COORTE2004					
IDENTIFICAÇÃO DO CANDIDATO					
NOME COMPLETO:			e-mail:		
CPF:	IDENTIDADE:	ÓRGÃO EMISSOR:	UF:	DATA DE EMISSÃO:	
DATA DE NASCIMENTO:	NACIONALIDADE:	ESTADO CIVIL:	SEXO:	FOTO	
ENDEREÇO RESIDENCIAL:			BAIRRO:	3 X 4	
CEP:	CIDADE	UF:	DDD ()	TEL. RESIDENCIAL: CELULAR:	
FORMAÇÃO ACADÊMICA					
ENSINO MÉDIO					
NOME DO CURSO:				ANO DE CONCLUSÃO:	
INSTITUIÇÃO:					
PAÍS:		CIDADE:		UF:	
GRADUAÇÃO					
NOME DO CURSO:			NÍVEL:	ANO DE CONCLUSÃO:	
INSTITUIÇÃO:					
PAÍS:		CIDADE:		UF:	
INSTITUIÇÃO:					
INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:					
INFORMAÇÃO PROFISSIONAL					
1. ÚLTIMO EMPREGO					
NOME DA EMPRESA:			NOME DA CHEFIA IMEDIATA:		
TELEFONE:	PERÍODO:		MOTIVO DA SAÍDA:		
PRINCIPAIS ATIVIDADES:					

2. PENÚLTIMO EMPREGO		
NOME DA EMPRESA:		NOME DA CHEFIA IMEDIATA:
TELEFONE:	PERÍODO:	MOTIVO DA SAÍDA:
PRINCIPAIS ATIVIDADES:		

3. ANTE PENÚLTIMO EMPREGO		
NOME DA EMPRESA:		NOME DA CHEFIA IMEDIATA:
TELEFONE:	PERÍODO:	MOTIVO DA SAÍDA:
PRINCIPAIS ATIVIDADES:		

MANTÉM VÍNCULO DE EMPREGO ATUALMENTE?	[] Sim	[] Não
---------------------------------------	---------	---------

POSSUI AUTOMÓVEL?	[] Sim	[] Não
-------------------	---------	---------

HORÁRIO DISPONÍVEL

Horário	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado	Domingo
8-12							
13-18							
18-21							

Indique o nome de duas pessoas que poderão fornecer referências sobre você
Nome:
Função e telefone:
Nome:
Função e telefone:

Perguntas sobre seu interesse em participar como entrevistadora:

1. Por que você se interessou pela atividade de entrevistador?

2. Você já trabalhou em pesquisa de campo? Quando? Qual? Qual sua função?

ANEXO 2 - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO ADOLESCENTE



Programa de Pós-graduação em Epidemiologia
Departamento de Medicina Social
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Pelotas



COORTE DE NASCIMENTOS DE PELOTAS DE 2004 - VISITA COVID-19

Investigadores responsáveis: Prof. Dr. Aluísio J. Dornellas de Barros; Profa. Dra. Iná S. dos Santos;
Profa. Dra. Alicia Matijasevitch Manitto; Profa. Dra. Luciana Tovo-Rodrigues

Centro de Pesquisas em Saúde Dr. Amílcar Gigante
Rua Marechal Deodoro 1160, 3º piso, 96020-220, Pelotas, RS, Fone/Fax: 53 3284 1300

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO ADOLESCENTE

Você está sendo convidado(a) para participar, voluntariamente, do estudo: “O efeito da pandemia de COVID-19 em níveis de estresse crônico em adolescentes da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004”. Sua mãe ou responsável por você já permitiu seu/sua participação. Queremos saber sobre suas condições de saúde, níveis de estresse, seus estudos, trabalho, atividade física, sono e saúde mental durante a pandemia do novo coronavírus (COVID-19).

A pesquisa será realizada na sua casa, por entrevistadoras devidamente treinadas. Serão realizadas perguntas comportamentais e de saúde. Além disso, você responderá sozinho(a) a um pequeno questionário confidencial, com perguntas mais íntimas, sem a sua identificação. Será realizada a coleta de uma pequena mecha de cabelo da parte de trás da sua cabeça, por meio da qual mediremos uma molécula relacionada ao estresse nos últimos meses. As amostras de cabelo já coletada e a parte de trás de sua cabeça serão fotografadas, caso você concordar. Essa foto estará disponível para os pesquisadores e poderá ser usada em artigos científicos, mas não permitirá a sua identificação. Todos os resultados serão mantidos em sigilo e serão usados apenas para fins de pesquisa. Como já foi dito, sua participação neste estudo será voluntária e você poderá interrompê-la a qualquer momento. Este projeto não envolve nenhum risco à sua saúde. Nós vamos fazer muitas perguntas e algumas delas poderão deixá-lo(a) pouco à vontade. Por favor, lembre-se que você poderá deixar de responder qualquer pergunta que desejar. Os resultados das análises poderão servir de base para programas visando prevenir doenças comuns na fase adulta. Você não terá que pagar por nenhum dos procedimentos. Depois da entrevista, as informações prestadas serão utilizadas sem identificação em todas as etapas do estudo. Todos os resultados do estudo serão apresentados sem identificar individualmente qualquer participante. Pedimos que, se você concordar em participar deste estudo, escreva seu nome e assine nos espaços abaixo. Se você tiver qualquer dúvida sobre a pesquisa, poderá entrar em contato com os responsáveis pelo estudo por meio do telefone acima ou mandar um e-mail para selecaocoorte2004@gmail.com. Se tiver qualquer dúvida sobre a ética deste estudo poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFPel, que revisou e aprovou os aspectos éticos deste estudo. O endereço é Rua Duque de Caxias, 250 – Pelotas/RS. O telefone é (53)32844960.

Data: ____/____/____

Nome do Adolescente

Assinatura do Adolescente

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para pergunta e as respondi em sua totalidade. O(A) adolescente compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento.

Iná S. dos Santos

Aluísio J. Dornellas de Barros

Alicia Matijasevich Manitto

Luciana Tovo Rodrigues

ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DA MÃE OU REPONSÁVEL



Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia
Departamento de Medicina Social
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Pelotas



COORTE DE NASCIMENTOS DE PELOTAS DE 2004 VISITA COVID-19

Investigadores responsáveis: Profa. Dra. Luciana Tovo-Rodrigues;
Prof. Dr. Aluísio J. Dornellas de Barros; Profa. Dra. Iná S. dos Santos; Profa. Dra.
Alicia Matijasevitch Manitto

Centro de Pesquisas em Saúde Dr. Amílcar Gigante
Rua Marechal Deodoro 1160, 3º piso, 96020-220, Pelotas, RS, Fone/Fax: 53 3284 1300

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DA MÃE OU RESPONSÁVEL

OBJETIVOS DO PROJETO: Avaliar o nível de estresse e condições de saúde mental e geral dos(as) adolescentes durante a pandemia do novo coronavírus (COVID-19), seus estudos, trabalho, atividade física, sono, relacionamento com os pais, comportamento e saúde mental e também a saúde da mãe nesse período.

PROCEDIMENTOS: Por ocasião do parto e quando as crianças completaram 3, 12, 24 e 48 meses e 6, 11 e 15 anos de idade, a mãe foi entrevistada e a criança/adolescente foi avaliado quanto medidas corporais e respondeu a diversas questões relacionadas à vida, à saúde e ao comportamento e saúde mental. Agora, serão entrevistados novamente aquelas mães e adolescentes que foram entrevistados no acompanhamento dos 15 anos e em função da nova condição de vida que estamos vivendo devido ao COVID-19, será aplicado um questionário para a mãe ou responsável (questionário da mãe) com perguntas sobre questões socioeconômicas, comportamentais e de saúde mental e geral do(a) adolescente e da mãe. O outro questionário, para o(a) adolescente, terá perguntas comportamentais, relacionadas a estresse e de saúde. Além disso, o(a) adolescente responderá sozinho(a) a um pequeno questionário confidencial, com perguntas mais íntimas, sem identificação do(a) participante. Será realizada a coleta de uma mecha de cabelo, a qual será utilizada para medir a concentração de cortisol, uma molécula relacionada ao nível de estresse, acumulado nos últimos 3 meses, que será utilizada para avaliar o impacto da pandemia nos níveis de estresse do adolescente. As amostras de cabelo e a parte da nuca do(a) adolescente serão fotografados, caso a(o) Sra. (Sr.) e o(a) adolescente concordem. Essa foto estará disponível para os pesquisadores e poderá ser usada em artigos científicos, mas não permitirá a identificação do(a) adolescente.

BENEFÍCIOS: Todos os resultados das análises serão mantidos em sigilo e serão utilizados somente para fins científicos. Os mesmos poderão servir de base para programas visando prevenir doenças comuns na fase adulta: diabetes, doenças do coração, doenças mentais, tumores, entre outras. Indivíduos que apresentarem resultados que sejam indicativos de problemas relevantes de saúde serão orientados a procurar um serviço de saúde para avaliação diagnóstica e conduta.

RISCOS E DESCONFORTO: O estudo não envolve nenhum risco para a saúde da(o) Sra. (Sr.) ou do(a) seu(sua) filho(a). Porém, nós vamos fazer muitas perguntas e algumas delas podem deixá-lo(a) pouco à vontade. Por favor, lembre-se que a(o) Sra. (Sr.) e seu(sua) filho(a) poderão deixar de responder qualquer pergunta que desejarem.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA: A participação no estudo é voluntária e a(o) Sra. (Sr.) e seu(sua) filho(a) podem deixar de participar a qualquer momento, sem ter que dar qualquer justificativa para tal. Se a(o) Sra. (Sr.) resolver não participar, isto não vai lhe causar nenhum problema de atendimento médico na Faculdade de Medicina ou em qualquer outro serviço público de saúde.

DESPESAS: Não há nenhum gasto, despesa, nem qualquer outra responsabilidade para participar do estudo.

CONFIDENCIALIDADE: Depois da entrevista, as informações prestadas serão utilizadas sem identificação em todas as etapas do estudo. O nome, endereço e telefone só serão utilizados para contatos visando futuras entrevistas deste estudo. Em nenhum caso, seu(sua) filho(a) será identificado(a) por outros. Todos os resultados do estudo serão apresentados sem identificar individualmente qualquer participante. As suas informações e informações do(a) adolescente não serão passadas a terceiros.

Se a(o) Sra. (Sr.) tiver alguma dúvida sobre o projeto, pode entrar em contato com os pesquisadores responsáveis pela pesquisa por meio do telefone acima, em horário comercial ou enviar um e-mail para selecaocoorte2004@gmail.com. Se houver alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFPel, que revisou e aprovou os aspectos éticos deste estudo. O endereço é Rua Duque de Caxias, 250 - Pelotas/RS. O telefone é (53)32844960.

Recebi as explicações sobre o estudo registradas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Tive oportunidade de esclarecer minhas dúvidas, sendo que todas as minhas perguntas foram respondidas claramente. Declaro estar de acordo em participar voluntariamente deste estudo, sabendo que tenho o direito de deixar de participar a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ou perda de qualquer direito.

Por favor, assinale abaixo se a Sra. (Sr.) concorda com os exames, testes e entrevistas a serem realizados:

MÃE	ADOLESCENTE	
<input type="checkbox"/> Questionário geral	<input type="checkbox"/> Questionário do adolescente	<input type="checkbox"/> Coleta de cabelo
	<input type="checkbox"/> Questionário confidencial	<input type="checkbox"/> Foto da nuca

Nome da mãe ou responsável

Nome do Adolescente

Data: ____/____/____

Assinatura da mãe ou responsável

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. A(O) responsável pelo(a) adolescente compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento.

Iná S. dos Santos

Aluísio J. Dornellas de Barros

Alicia Matijasevich Manitto

Luciana Tovo Rodrigues

ANEXO 4 - CONTROLE DE QUALIDADE (MÃE/RESPONSÁVEL)

Confidential

C2004 - Controle de qualidade (2021)
Page 1 of 1

Controle De Qualidade Mae responsavel

Numero de identificação da Coorte 2004 _____

BOM DIA/BOA TARDE. MEU NOME É [aplicador]. SOU SUPERVISOR(A) DA PESQUISA QUE ESTÁ SENDO REALIZADA COM OS ADOLESCENTES PERTENCENTES À COORTE DE 2004. ESTAMOS FAZENDO UM CONTROLE DA QUALIDADE DA PESQUISA E GOSTARÍAMOS DE FAZER APENAS 10 PERGUNTAS BEM RÁPIDAS PARA SABERMOS SE NOSSO PESSOAL FEZ TUDO CORRETO. VAMOS LEVAR 1 MINUTO.

Pense no que a Sra.(Sr.) respondeu quando foi entrevistado(a):

1. Nome do(a) adolescente _____

2. A(O) Sra.(Sr.) mora com o(a) [nome]? Não
 Sim

3. O(A) [nome] tem irmão(ã) gêmeo(a)? Não
 Sim

4. A(O) Sra.(Sr.) perdeu o emprego durante a pandemia do novo coronavírus? Não
 Sim

5. A(O) Sra.(Sr.) fuma? Não
 Sim

6. Quem é a pessoa de maior renda na casa? Pai do(a) adolescente
 Mãe do(a) adolescente
 Pai social do(a) adolescente
 Mãe social do(a) adolescente
 Outro
 IGN

7. Em geral, desde o início da pandemia, como a (o) Sra. (Sr.) considera que está a sua saúde?
Ler opções Excelente
 Muito Boa
 Boa
 Regular
 Ruim

8. A entrevistadora estava utilizando os equipamentos de EPI como avental, luvas e máscara? Não
 Sim

9. A entrevistadora foi pontual? Não
 Sim

10. Por fim, queremos saber se a entrevistadora foi atenciosa com a(o) Sra. (Sr.) durante a visita? Não
 Sim

11. A(O) Sra. (Sr.) teria alguma sugestão ou comentário a fazer sobre a visita?

OBRIGADA PELA SUA COLABORAÇÃO. ELA É MUITO IMPORTANTE PARA O ESTUDO!

ANEXO 5 - CONTROLE DE QUALIDADE (ADOLESCENTE)

Confidential

C2004 - Controle de qualidade (2021)
Page 1 of 1

Controle De Qualidade Adolescente

Numero de identificação da Coorte 2004 _____

BOM DIA/BOA TARDE. MEU NOME É [iaplicador]. SOU SUPERVISOR(A) DA PESQUISA QUE ESTÁ SENDO REALIZADA COM OS ADOLESCENTES PERTENCENTES À COORTE DE 2004. ESTAMOS FAZENDO UM CONTROLE DA QUALIDADE DA PESQUISA E GOSTARÍAMOS DE FAZER APENAS 10 PERGUNTAS BEM RÁPIDAS PARA SABERMOS SE NOSSO PESSOAL FEZ TUDO CORRETO. VAMOS LEVAR 1 MINUTO.

Por favor, pense no que você respondeu quando foi entrevistado(a):

- | | |
|--|--|
| 1. Você teve aulas presenciais e/ou on-line durante o primeiro ano da pandemia do coronavírus?
Ler opções | <input type="radio"/> Não estava estudando
<input type="radio"/> Não, as aulas foram suspensas durante a pandemia
<input type="radio"/> Sim, presencial somente
<input type="radio"/> Sim, on-line somente
<input type="radio"/> Sim, presencial e on-line |
| 2. Qual o tipo de escola em que você estuda?
Ler opções | <input type="radio"/> Pública municipal
<input type="radio"/> Pública estadual
<input type="radio"/> Pública federal
<input type="radio"/> Privada |
| 3. Desde o início da pandemia, você trabalhou recebendo dinheiro ou alguma coisa em troca? | <input type="radio"/> Não
<input type="radio"/> Sim |
| 4. Você está trabalhando atualmente? | <input type="radio"/> Não
<input type="radio"/> Sim |
| 5. Como você considera a sua saúde?
Ler opções | <input type="radio"/> Excelente
<input type="radio"/> Muito boa
<input type="radio"/> Boa
<input type="radio"/> Regular
<input type="radio"/> Ruim |
| 6. O quanto você acha que a pandemia/distanciamento social afetou você?
Ler opções | <input type="radio"/> Não afetou nada
<input type="radio"/> Afetou um pouco
<input type="radio"/> Afetou razoavelmente
<input type="radio"/> Afetou muito |
| 7. Por fim, queremos saber se a entrevistadora foi atenciosa com você durante a visita? | <input type="radio"/> Não
<input type="radio"/> Sim |
| 8. A entrevistadora estava utilizando os equipamentos de EPI como avental, luvas e máscara? | <input type="radio"/> Não
<input type="radio"/> Sim |
| 9. A entrevistadora foi pontual? | <input type="radio"/> Não
<input type="radio"/> Sim |
| 10. Você teria alguma sugestão ou comentário a fazer sobre a visita? | _____ |

OBRIGADA PELA SUA COLABORAÇÃO. ELA É MUITO IMPORTANTE PARA O ESTUDO!

ANEXO 6 - LISTA DE SERVIÇOS EM SAÚDE

Serviços de atendimento psiquiátrico e psicológico em Pelotas

SAMU (atendimento de urgência, 24 horas)	Telefone: 192
Hospital Espírita de Pelotas (atendimento de urgência, 24 horas)	Fone: 32281288 - Av. Domingos de Almeida, 2969
Ambulatório de Saúde Mental UFPel	Fone: 32211666 - Av. Duque de Caxias, 250, 2º piso
Centro de Especialidades	Fone: 32221426 - Rua Voluntários da Pátria, 1428
Campus da Saúde – UCPel	Fone: 2128 8502 ou 3223 3511 Av. Fernando Osório, 1586
Posto/ UBS Pestano	Fone: 3283-1841 Av. Leopoldo Brod, 3220
Posto/UBS Fátima	Fone: 3222-4028 - Rua Baldomero Trápaga, 480
Ambulatório de saúde mental (Prefeitura Municipal)	Fone: 3222-1426 / 3227 8200 R. Voluntários da Pátria, 1428

Para atendimento no CAPS, primeiro deverá ir ao Postinho [ou Unidade Básica de Saúde (UBS)] e solicitar encaminhamento médico para atendimento no CAPS.

CAPS Infantil Canguru	Rua Dom Pedro II, 565 - 3222-6290
CAPS BARONESA	Rua Otacílio Camará 404 - Areal - 3272-1030
CAPS CASTELO	Rua Lobo da Costa, 1959 (atrás do IFsul) 3227-6465
CAPS ESCOLA	Rua Félix da Cunha, 451 - 3229-2923
CAPS FRAGATA	Av. Duque de Caxias, 342 - 3281-1081
CAPS PORTO	Rua Félix da Cunha, 457 - 3278-2068
CAPS ZONA NORTE	Av. Fernando Osório, 5615 - 3273-6301
CAPS AD	Rua Dom Pedro II, 813 - 3222-3350

ANEXO 7 – MANUAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA

Coorte de Nascimentos Pelotas 2004

**- Manual de Instruções -
Acompanhamento COVID**

2021

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	199
1.1	A COORTE DE NASCIMENTOS DE 2004	199
1.2	A EQUIPE DO PROJETO	200
2.	ORIENTAÇÕES GERAIS	201
2.1	ROTINA DE TRABALHO DA EQUIPE	201
2.2	O CONSENTIMENTO E O ASSENTIMENTO INFORMADO	204
2.3	CASOS ESPECIAIS	205
2.4	CONCEITOS BÁSICOS	205
2.5	ADULTO A SER ENTREVISTADO	206
3.	QUESTIONÁRIO DA MÃE	209
BLOCO A	– IDENTIFICAÇÃO	209
BLOCO B	– SAÚDE DO ADOLESCENTE	210
BLOCO C	– CARACTERÍSTICAS DA MÃE, DA FAMÍLIA E DO DOMICÍLIO	213
BLOCO D	– COVID	215
BLOCO E	– SDQ	217
BLOCO F	– SAÚDE DA MÃE	217
BLOCO G	– CTSPC	217
BLOCO H	– EDIMBURGO	218
4.	QUESTIONÁRIO DO ADOLESCENTE	219
BLOCO A	– IDENTIFICAÇÃO	219
BLOCO B	– ESCOLA	220
BLOCO C	– COVID-19	220
BLOCO D	– DISTANCIAMENTO SOCIAL E COVID-19	222
BLOCO E	– TRABALHO	225
BLOCO F	– LAZER E TEMPO DE TELA	226
BLOCO G	– ATIVIDADE FÍSICA	228
BLOCO H	– SAÚDE	230
BLOCO I	– LOCUS DE CONTROLE	230
BLOCO J	– AUTOESTIMA	230
BLOCO K	– CONTROLE EMOCIONAL	231
BLOCO L	– SENTIMENTOS E COMPORTAMENTOS	232
BLOCO M	– SONO	232
BLOCO N	– CORTISOL	234
BLOCO O	– ESTRESSE (INSTRUMENTO DASS-21)	235
BLOCO P	– EVENTOS ESTRESSANTES	236

5.	CONFIDENCIAL DO ADOLESCENTE	237
	BLOCO A - CIGARROS	238
	BLOCO B – BRIGAS E VIOLÊNCIA	238

1. INTRODUÇÃO

1.1 A COORTE DE NASCIMENTOS DE 2004

Em 1982 teve início em Pelotas um estudo sobre a saúde dos recém-nascidos da cidade. Todos os bebês nascidos no município foram avaliados e suas mães entrevistadas. Foi feito um acompanhamento das crianças com 3 meses, com 12 meses e com 24 meses. Este estudo teve um grande impacto nos meios de pesquisa no Brasil e no exterior. Os resultados levaram a um grande número de publicações, que por sua vez serviram de referência para a elaboração de políticas de saúde e de novas pesquisas. Em 1993 uma nova coorte teve início, nos mesmos moldes da de 1982. Estava configurado um ciclo de coortes de nascimentos em Pelotas, experiência única na América Latina.

Em 2004 iniciamos uma nova coorte. A repetição destas coortes permite que se avalie como está mudando a saúde das crianças, o atendimento à gestante durante o pré-natal, o atendimento ao parto e o perfil da população em termos de fatores de risco a diversas doenças. Estas informações são fundamentais para que as políticas de saúde sejam atualizadas e reflitam as mudanças observadas. Por exemplo, a desnutrição já não é hoje um problema tão frequente, assim como as mortes infantis por diarreia.

O nosso papel neste estudo é fazer com que ele seja realizado dentro do mais alto padrão de qualidade de modo que os dados obtidos reflitam a realidade da forma mais exata possível. Afinal, estes dados estarão sendo analisados e reanalisados durante as próximas décadas! Para que consigamos atingir o patamar de qualidade desejado, é necessário muito esforço, muita dedicação. E este manual é a base de sustentação deste esforço.

1.2 A EQUIPE DO PROJETO

O projeto tem como coordenadores o Prof. Aluísio Jardim Dornellas de Barros, a Prof^a. Iná da Silva dos Santos, a Prof^a. Alicia Matijasevich Manitto e a Prof^a. Luciana Tovo Rodrigues, do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia (Departamento de Medicina Social) da Universidade Federal de Pelotas. A coordenação de campo está a cargo da Prof^a. Luciana Tovo Rodrigues.

O endereço do Programa é:

Programa de Pós-graduação em Epidemiologia

Rua Marechal Deodoro, 1160 - 3º piso.

96020-220 Pelotas, RS Telefone/Fax: (53)

3284-1300.

Contato com o supervisor:

Alicia Matijasevich	Coordenação	alicia.matijasevich@usp.br
Aluísio Barros	Coordenação	abarros.epi@gmail.com
Iná S. Santos	Coordenação	inasantos.epi@gmail.com
Luciana Tovo Rodrigues	Coordenação	luciana.tovo@gmail.com
Joseph Murray	Colaborador	prof.murray@outlook.com
Deise Cristina Veleda Modesto	Secretária	coorte2004@gmail.com
Bianca Del Ponte da Silva	Pós-doutoranda	bianca.delponte@gmail.com
Etiene Dias Alves	Doutoranda	etienediasnutri@gmail.com
Júlia Rodrigues	Doutoranda	juulia_rs@hotmail.com

2. ORIENTAÇÕES GERAIS

2.1 ROTINA DE TRABALHO DA EQUIPE

- Você deverá, em todas as entrevistas, utilizar equipamentos de proteção individual (EPIs). Os EPIs incluem: avental descartável, máscara de proteção N95, luvas, propés descartáveis e óculos de proteção.
- Os EPIs devem ser colocados antes de entrar no domicílio da entrevista e deverá ser retirado após sair do domicílio. Os seguintes EPIs devem ser descartados após cada domicílio visitado: avental descartável, luvas e propés descartáveis. A máscara N95 deve ser descartada a cada 3 domicílios visitados. O óculos de proteção não deve ser descartado.
- O descarte deve ser feito em saco branco leitoso (para material contaminado) que você carregará na mochila. Ao final do dia todo esse material deve ficar armazenado em local isolado até que seja levado ao CPE, pois deverá ser descartado no laboratório do CPE nos dias de entrega de materiais de pesquisa (descarregamento das entrevistas dos tablets). OBS: Esse material não poderá **JAMAIS** ser descartado em lixo comum por risco de contaminação ambiental. A UFPel tem o descarte apropriado para esse tipo de resíduo.
- Não esqueça de higienizar suas mãos com álcool 70° antes e depois de cada entrevista. Evite compartilhar seu material com o entrevistado (como caneta para assinatura de termo). Faça isso em caso de extrema necessidade e sempre higienize antes de oferecer o material e após o uso do participante.
- Higienize após cada uso o material com que o participante teve contato, como as cartelas plastificadas, a cartela de coleta de cabelo, caneta e tablet)
- A higienização dos tablets deve ser feito com solução específica fornecida. Nunca higienize os tablets com álcool 70°
- A higienização dos óculos de proteção deve ser feita com sabão neutro e água ao fim do dia.
- Use sempre o seu crachá - ele é a sua identificação;
- É importante ser discreta no seu modo de falar, vestir e de se maquiar. Roupas indiscretas, transparentes, curtas ou decotadas não são permitidas. Mantenha uma postura profissional e neutra.
- Coloque seu celular no modo silencioso durante a entrevista.
- Trate o/a entrevistado/a por Sra. ou Sr., sempre com respeito. Só mude este tratamento se ele/a próprio/a pedir para ser tratado/a de outra forma.

- Chame a mãe **sempre** pelo nome (p. ex., Dona Maria José). **Jamais, jamais**, chame-a de *mãe*. Isto despersonaliza a entrevista e é interpretado como desinteresse.
- Logo de início, é importante estabelecer um clima de diálogo cordial com a mãe, tratando-a com respeito e atenção. **Nunca** demonstre pressa ou impaciência diante de suas hesitações ou demora ao responder uma pergunta.
- Durante a entrevista, de quando em quando, faça referência ao nome da entrevistada. É uma forma de ganhar a atenção e manter o interesse. Por exemplo: "Dona Joana, agora vamos falar sobre..." e não simplesmente "Agora vamos falar sobre...".
- **Nunca demonstre censura, aprovação ou surpresa diante das respostas.** Lembre-se de que o propósito da entrevista é obter informações e não transmitir ensinamentos ou influenciar conduta das pessoas. A postura do entrevistador deve ser sempre **neutra** em relação às respostas.
- Procure fazer com que o diálogo seja dinâmico, demonstre interesse pelo que lhe está sendo reportado. Olhe para a mãe enquanto ela está respondendo suas perguntas.
- É essencial que você conheça profundamente o conteúdo do questionário que vai aplicar, bem como o do manual do entrevistador. Esteja totalmente familiarizada com os termos usados na entrevista, para que não haja nenhuma dúvida ou hesitação de sua parte, na hora de formular perguntas e anotar respostas. É só a entrevistada que tem o direito de hesitar.
- **Sempre** leia todo o texto escrito no questionário/*tablet*. É importante para a uniformização das perguntas e respostas que você não altere qualquer palavra. Faz uma grande diferença nas respostas se você ora pergunta de um modo, ora de outro.
- Caso o/a entrevistado/a não entenda a pergunta, repita a questão da mesma forma. Se, mesmo assim, ele não souber responder, pergunte: "O que tu entendes com essa pergunta?" e veja o que ele/a irá responder. Anote a questão e a dúvida no seu diário. Se os supervisores não souberem resolver prontamente, ele/a encaminhará a questão/dúvida para ser discutida em grupo. É importante, também, prestar atenção nos pulos automáticos do computador. Qualquer irregularidade percebida chame imediatamente os supervisores.
- **Nunca** influencie ou sugira respostas. Dê tempo ao/a entrevistado/a para que reflita e encontre a resposta com suas próprias palavras. Se você não conseguir obter nenhuma resposta, leia **todas** as alternativas antes de deixar que o/a

entrevistado/a responda. Assim ele/a não vai escolher logo a primeira possibilidade que for oferecida.

- Em casos específicos, as alternativas **devem** ser lidas. Isto estará claramente indicado no questionário.
- Procure manter um diálogo aberto com os supervisores do trabalho de campo, reportando imediatamente qualquer problema, dificuldade ou dúvida que apareça no decorrer do treinamento e entrevistas. As suas sugestões são importantes no sentido de aprimorar o trabalho do grupo.
- **Mantenha sempre à mão o seu Manual do Entrevistador.** A consulta a esse documento lhe dará segurança e a certeza de que a entrevista está sendo conduzida da maneira correta.
- No caso de a dúvida persistir **após consulta ao Manual**, entre em contato com o/a supervisor/a. Se ainda permanecer uma desconfiança do que seria o correto, **NUNCA decida sozinho/a**. Portanto, SEMPRE leia com atenção todas as instruções do questionário antes de qualquer decisão.
- As instruções contidas no questionário em letra **negrito** são para você ler para os entrevistados. As com letra em *itálico* servem como um guia para você conduzir as entrevistas corretamente, sem fazer perguntas inadequadas.
- Quanto aos pulos, ou seja, perguntas que não devem ser realizadas, o programa os fará automaticamente. No questionário impresso, os PULOS que você deve obedecer estarão abaixo das questões ou ao lado das opções de resposta em *itálico*.
- Durante o treinamento será possível distinguir claramente o que deve ou não ser lido para o/a entrevistado/a. As diferenças entre as formas de apresentação das letras servem de guias para o melhor preenchimento dos dados. A indicação dos pulos aparecerá somente no Manual de Instruções e no questionário impresso, no computador o pulo ocorrerá automaticamente.
- **Mantenha SEMPRE**, para seu controle, um "diário de campo" (caderno). Nele deverão constar diariamente quais foram os membros da Coorte de 2004 entrevistados por você e se houve alguma informação importante a ser registrada. **Anote tudo e não confie apenas na sua memória.**
- São muitas entrevistas por dia, durante semanas e meses. Nestas anotações deve haver: data da entrevista, ID (número de identificação) do/a participante, horário da entrevista, bloco e número da questão em que teve dúvida e qualquer outro aspecto que você considera importante repassar aos supervisores do trabalho de campo.

- Após o término do questionário do/a adolescente, você deverá explicar que ele/a terá que responder sozinho a um pequeno questionário, que é **confidencial**. Porém, antes de encaminhá-lo ao questionário, você já saberá se ele/a sabe ler e escrever. Pergunte, ainda, se ele/a tem familiaridade em trabalhar com o tablet, se apresenta alguma dificuldade. Caso não saiba, entregue o questionário impresso. Ao final do questionário, lacre-o na frente do/a adolescente.
- Para casos que exijam anotações ou procedimentos diferenciados, os supervisores estão capacitados a orientá-la da melhor forma. Porém, não se esqueça de anotar o que aconteceu, assim como a resposta dada tal qual como foi mencionada pelo/a entrevistado/a.
- A palavra outro/a, quando estiver dentre as opções a serem assinaladas, representa uma resposta que não está pré-codificada. Ou seja, o/a entrevistado/a disse algo que não está contido nas outras opções de respostas previstas. Portanto, quando tiver que especificar o que foi relatado pelo/a entrevistado/a, você terá que anotar as palavras ditas, desde que elas façam sentido. Feito isso, você deve checar com o/a entrevistado/a se o que foi anotado corresponde ao que ele/a quis dizer e o que é compreensível. As frases precisam ter sentido. Cuide bem! Quem vai codificar posteriormente não ouviu ou viu o que o participante disse ou fez. A frase deve ser sucinta, clara e explicativa. Ela DEVERÁ reproduzir a situação mencionada. Caso não haja espaço no computador anote em seu diário.
- **Não marque a resposta por 'sua conta'**, mesmo que você saiba a resposta, ela deve ser sempre dada pelo/a entrevistado/a. Caso algo aconteça, como uma contradição, anote a situação no seu caderno no final da entrevista.
- **Em geral, as quantidades nulas devem ser preenchidas com zero.** O código "0" não deve ser aplicado como sinônimo de "não", a não ser quando isto esteja especificado claramente nas opções da pergunta [como: (0) Não]. Deve-se considerá-lo normalmente em seu significado numérico. Assim, 0 mês e 2 dias = 2 dias; 0 dias = menos que 24 horas, 0 meses = menos de 30 dias. Observe sempre no *tablet* ou no questionário impresso quais os códigos que devem ser digitados.
- Caso seja necessário fazer algum cálculo mais demorado, faça durante a entrevista com a utilização de uma calculadora para que não resulte em erro.

2.20 CONSENTIMENTO E O ASSENTIMENTO INFORMADO

Após a apresentação, explique para a mãe detalhes sobre a participação dela e do/a adolescente no projeto e, se ela concordar, você precisa que ela assine uma declaração, da qual ela fica com uma via. Além disso, é necessário que o/a

adolescente também concorde com a sua participação na pesquisa, a partir do termo de assentimento livre e pré-informado do/a adolescente. Na ausência da mãe no momento da entrevista com o adolescente, você deve comunicar a supervisão e não aplicar o questionário ao adolescente.

SOMENTE INICIAR A APLICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO DEPOIS DE TER O TERMO DE CONSENTIMENTO E ASSENTIMENTO ASSINADO PELA MÃE E PELO ADOLESCENTE!

2.3 CASOS ESPECIAIS

- Participante que não sabe ler: responde o questionário normalmente. Anotar no seu "diário de campo" e seguir as orientações de cada parte do questionário.
- Deficiência mental: não responde os questionários.
- Deficiência física: responde os questionários.
- Adolescentes surdos: para aqueles que utilizam a linguagem de sinais, peça para um familiar, que também a utilize, aplique o Questionário do Adolescente.

Você será avisado previamente se terá que realizar uma entrevista com uma pessoa especial (que não possua capacidade mental e/ou física para responder ao questionário). Caso você não tenha sido avisado, mas perceba algo diferente durante a entrevista, comunique ao/a supervisor/a ou o que está percebendo de diferente. NESTES CASOS, SUGERE-SE QUE VOCÊ UTILIZE QUESTIONÁRIO IMPRESSO.

2.4 CONCEITOS BÁSICOS

Casa - o local onde a família faz as refeições, dorme e convive. É o local de moradia para uma ou mais pessoas, mesmo que não tenha sido construída com esta finalidade.

Nos casos em que há mais de uma casa no mesmo terreno ou pátio, a/o entrevistada/o deverá responder sobre as pessoas que moram na casa onde os moradores fazem as refeições regularmente juntos. Se houver mais de uma família fazendo as refeições juntas, registrá-los como sendo moradores da mesma casa da/o entrevistada/o. Essa regra é válida também para todas as perguntas sobre família, como por exemplo, a questão sobre a renda.

Morador - É a pessoa que tem a unidade domiciliar (casa) como local de residência habitual; pessoa que está morando na casa na data da entrevista e não tem outro local de residência habitual. Também é morador a pessoa ausente temporariamente na data da entrevista por um período inferior a 12 meses, mas que

tem a unidade domiciliar como local de residência habitual. Essa ausência pode ser em decorrência de:

- a) viagem a passeio, negócio, serviço ou outro motivo;
- b) permanência no local do trabalho por conveniência ou situação de trabalho;
- c) internação em colégios, pensionatos ou similares, estadia em domicílio de parentes, ou partilhada com amigos - somente por motivo de estudo. Caso a pessoa more em outro local para estudo e retorne frequentemente à casa dos pais aos finais de semana, por exemplo, ela será considerada moradora daquele domicílio;
- d) internação em hospital, sanatório ou estabelecimento similar;
- e) detenção ou sentença definitiva;
- f) embarque de marítimos.

Caso nenhuma destas situações contemple, entenda que pessoa/morador que ocupa dois ou mais domicílios será definida como moradora na residência em que:

- reside sua família e/ou
- passa a maior parte do tempo e/ou
- que reside há mais tempo.

<MÊS> - Quando esta indicação aparecer NÃO leia "mês", substitua esta palavra pelo mês adequado, ou seja, o mês em que você está realizando a entrevista. Se você está fazendo entrevista em janeiro substitua a palavra **<MÊS>** por janeiro ao ler a pergunta.

<ADOLESCENTE> - Como não podemos fazer um questionário personalizado escolhemos escrever **<ADOLESCENTE>** para que o entrevistador substitua, no momento da entrevista, pelo verdadeiro nome do/a adolescente que está sendo entrevistado/a ou sobre o/a qual a mãe deverá responder.

(8) NSA - Não se aplica. Utilizado quando a pergunta não se aplica a determinada situação. Esta pergunta deve ser pulada.

(9) IGN - Ignorado. Utilizado quando o/a participante não sabe ou não lembra a resposta.

Mãe biológica - É a mulher que gerou o/a adolescente. É a mãe biológica.

Mãe social - Mulher considerada como a mãe, aquela que faz o papel de mãe para o/a adolescente. Aquela mulher que convive há tempos com o/a jovem e é capaz de responder sobre a vida dele/a. Pode ser uma parente (avó, tia), mãe adotiva ou madrasta.

2.5 ADULTO A SER ENTREVISTADO

O questionário da mãe foi construído para ser aplicado APENAS à mãe biológica ou social do/a <ADOLESCENTE>. Com ele teremos muitas informações sobre a saúde dela, do/a <ADOLESCENTE> e suas opiniões sobre o/a adolescente. No entanto, sabemos que há exceções, por exemplo, o/a adolescente pode morar com outro familiar. Importante considerar que a mãe social pode ser uma tia, madrinha, avó, irmã mais velha, ou seja, toda e qualquer mulher que seja responsável pelo/a adolescente e cuide dele(a). Essa responsabilidade não precisa necessariamente ser legalizada, ou seja, ela não precisa ter a guarda legal dele/a, apenas precisa ser quem responde por ele/a nas situações da vida. A entrevista poderá ser feita com o pai ou o responsável pelo(a) adolescente, mesmo sendo a mãe biológica ou social a preferência pelas respostas.

Neste acompanhamento, o questionário da mãe será aplicado preferencialmente à pessoa que respondeu o questionário da mãe no acompanhamento dos 15 anos (pré-covid). Você receberá o nome de quem deve ser entrevistado. Sempre que você se deparar com uma situação em que a mãe ou quem deve ser entrevistado não pode responder o questionário, entre em contato com algum/a supervisor/a do estudo.

EM CASO DE DÚVIDA CONSULTE OS SUPERVISORES!

- Os questionários (da mãe e do adolescente) devem ser aplicados individualmente e de forma privativa.
- A leitura dos TCLE e TALE devem preceder a aplicação dos questionários correspondentes, ou seja, a leitura do TCLE antes da aplicação do questionário da mãe e a leitura do TALE antes da aplicação do questionário do adolescente.
- Leia com atenção todas as **instruções** dos questionários. São três questionários: dois para os/as adolescentes e um para a mãe. Tenha sempre consigo o manual - ele sempre fará falta, pois há várias situações imprevisíveis.
- Em caso de dúvida no momento da entrevista, anote a dúvida e, ao término da questão, assinale a resposta conforme o **manual**. Caso a dúvida persistir, converse com o/a supervisor/a e explique a situação daquela família ou a resposta dada por eles. O/A supervisor/a está capacitada a orientá-la da melhor forma. Mas não esqueça de anotar o que aconteceu e a resposta dada tal qual foi mencionada. Se a informação anotada não preencher os quesitos da questão, poderemos escutar o áudio gravado, ou ainda telefonar ou ir ao domicílio, a fim de encontrar uma resposta correta.

- Todos os **SE SIM** e **SE NÃO** se referem à pergunta anterior ou ao bloco de perguntas antecedente. Tenha cuidado, leia antes de seguir a entrevista para não criar situações em que você se mostre não treinado ou inseguro.
- Ao final da entrevista **revise o questionário** para ver se você fez todas as perguntas necessárias. A não aplicação de alguma parte do questionário demonstra uma falta grave do entrevistador.
- Não marque mesmo que você saiba a resposta - ela deve ser sempre dada pelo/a entrevistado/a.
- Preencher todos os campos em que as **respostas são em números**, como idade, escrevendo sempre da direita para esquerda.
- As **datas** ignoradas devem ser preenchidas com 01/01/1919. As datas que não se aplicam àquele caso devem ser escritas com 88/08/8888.
- No caso de **gêmeos**, dois questionários deverão ser aplicados para a mãe, pois existem questões específicas de comportamento de cada filho. No entanto, algumas partes já estarão automaticamente assinaladas no *tablet* e não aparecerão para você. Após fazer a entrevista com a mãe para o gêmeo 1 e o gêmeo 2, entreviste o gêmeo 1. Após finalizar, inicie novo questionário com o gêmeo 2, pule a entrevista da mãe e faça apenas as perguntas do(a) adolescente. Não se esqueça de anotar no caderno de campo e tenha sempre muito cuidado para não confundir os Ids dos gêmeos.
- Quando você for fazer uma **anotação complementar** ou necessitar escrever mais nas questões abertas faça um asterisco ou uma flecha apontando onde você seguirá escrevendo.
- O **Termo de Consentimento** deve ser assinado pelo adulto à **caneta**. Em casos de **mãe analfabeta utilize a almofada para coletar a digital**.
- **No questionário impresso, apague bem** as questões que você preencheu errado, pois do contrário você será chamado para explicar por que preencheu duas respostas.

3. QUESTIONÁRIO DA MÃE

3.1 Instruções de preenchimento das questões específicas por bloco.

BLOCO A – IDENTIFICAÇÃO

Sou da Faculdade de Medicina e faço parte do mesmo estudo que o(a) <ADOLESCENTE> participa desde o nascimento. A última visita foi aos 15-16 anos de idade e, agora, estamos entrevistando novamente todos(as) adolescentes que visitaram a clínica neste último acompanhamento. Gostaria de conversar com a Sra. sobre a saúde dele(a), da sua família e sobre a pandemia. Podemos conversar?

NOTA: Entrevistar preferencialmente a mãe biológica ou social do adolescente.

0. Nome do/a adolescente:

Preencha com o nome completo do(a) adolescente.

1. Número de identificação do adolescente:

Preencha com o número de identificação (ID) do(a) adolescente.

1a. Nome do responsável

Preencha com o nome do responsável pelo(a) adolescente.

2. Nome da entrevistadora:

Preencha com o seu nome.

3. Data e horário de início da entrevista:

- Preencher o dia, o mês e o ano do início da entrevista com dois dígitos. Exemplo: dia dois de Janeiro de 2021 → 02/01/21.
- Hora do início da entrevista deve ser escrita no modo 24 horas, exemplo: 02:20 horas da tarde, deve ser codificada como **14:20** horas.

4. Quem responde a entrevista?

Marque quem está respondendo a entrevista, caso não tenha a opção assinalada "(6) Outro" e preencha com o parentesco.

4a. Observação:

Em caso de preencher "(6) Outro" na questão anterior, descreva quem é a pessoa que está respondendo ao questionário, inserindo seu parentesco com o/a adolescente.

4b Você se considera responsável pelo(a) <ADOLESCENTE>?

Esta pergunta é de interpretação da/o entrevistada/o, se ela/e se considera ou não responsável legal do/a adolescente.

4c. A(O) Sra.(Sr.) mora com o(a) <ADOLESCENTE>?

Preencha se a entrevistada reside ou não com o/a adolescente.

4d. O(A) <ADOLESCENTE> tem irmão(ã) gêmeo(a)?

Preencha se o/a adolescente possui irmão(ã) gêmeo(a).

SE SIM:

4e. O(A) <ADOLESCENTE> mora com o(a) irmão(ã) gêmeo(a)?

Preencha se o/a adolescente mora com o(a) irmão(ã) gêmeo(a).

BLOCO B – SAÚDE DO ADOLESCENTE

SAÚDE GERAL

**Agora vou fazer algumas perguntas sobre como está a saúde do(a)
<ADOLESCENTE>:**

5. Em geral, a(o) Sra.(Sr.) considera a saúde do(a) <ADOLESCENTE>: *Ler opções*
Nessa questão, as opções devem ser lidas para a mãe ou responsável. Assinale a resposta fornecida por ela/e.

MEDICAMENTOS

**Agora vamos falar sobre remédios que o(a) <ADOLESCENTE> usou nos últimos
15 dias.**

6. Nos últimos 15 dias, o(a) <ADOLESCENTE> usou algum remédio?

Nessa questão importa saber se o/a adolescente tomou algum remédio nos últimos 15 dias. Considerar todo tipo de medicamento. Mesmo os muito simples, como um comprimido de analgésico para dor de cabeça, produtos naturais, homeopatia, fórmulas feitas em farmácia de manipulação, florais, vitaminas, remédios caseiros, etc. Se responder (0) Não ou (9) IGN, ir para pergunta 14.

SE SIM:

7. Qual(ais) o(s) nome(s) do(s) remédio(s)? *Nome do remédio sem acento e com letras MAIÚSCULA.*

Se respondeu (1) Sim para a questão 6, pergunte a 7. Esta pergunta se refere aos últimos 15 dias. No REDCap, aparecerá uma lista de medicamentos, que, quando a entrevistadora iniciar a preencher o nome, poderá selecionar o correspondente.

Quando a mãe ou responsável não lembrar o nome, pergunte o motivo pelo qual o/a adolescente está fazendo uso da medicação e digite: remédio para vermes; remédio para dor, etc.

Considerar todo tipo de medicamento. Mesmo os muito simples, como um comprimido de analgésico para dor de cabeça. Anotar também os produtos naturais, homeopatia, fórmulas feitas em farmácia de manipulação, florais, vitaminas, remédios caseiros, etc.

Cada medicamento deve ser anotado em uma linha diferente.

7a. Remédio 1:

7b. Remédio 2:

7c. Remédio 3:

7d. Remédio 4:

7e. Remédio 5:

8. Número total de medicamentos (anotado pela entrevistadora):

Ao final da lista de remédios referida pela mãe ou responsável, anotar o número total de medicamentos utilizados pelo/a adolescente.

****Orientação para o papel:** Se o/a adolescente estiver utilizando mais de cinco medicamentos, seguir anotando todos em outro questionário de papel e fazer todas as perguntas que seguem para cada um deles.

Remédio 1

9a. Por qual motivo ou doença este remédio foi ou está sendo usado?

Pergunte para a mãe ou responsável por que razão o/a adolescente usou o medicamento que tiver citado na questão **7a**. Anote adequadamente o motivo. Não preencha códigos, pois essa codificação será feita posteriormente.

10a. Foi receitado por um médico ou dentista?

Pergunte para a mãe ou responsável se o remédio foi receitado por médico ou dentista.

11a. Este medicamento está sendo usado de forma contínua, sem data certa para parar?

Pergunte para a mãe ou responsável se o medicamento está sendo utilizado sem data certa para parar, ou seja, se é um medicamento de uso contínuo.

*Remédio 2***9b. Por qual motivo ou doença este remédio foi ou está sendo usado?**

Pergunte para a mãe ou responsável por que razão o/a adolescente usou o medicamento que tiver citado na questão **7b**. Anote adequadamente o motivo. Não preencha códigos, pois essa codificação será feita posteriormente.

10b. Foi receitado por um médico ou dentista?

Pergunte para a mãe ou responsável se o remédio foi receitado por médico ou dentista.

11b. Este medicamento está sendo usado de forma contínua, sem data certa para parar?

Pergunte para a mãe ou responsável se o medicamento está sendo utilizado sem data certa para parar, ou seja, se é um medicamento de uso contínuo.

*Remédio 3***9c. Por qual motivo ou doença este remédio foi ou está sendo usado?**

Pergunte para a mãe ou responsável por que razão o/a adolescente usou o medicamento que tiver citado na questão **7c**. Anote adequadamente o motivo. Não preencha códigos, pois essa codificação será feita posteriormente.

10c. Foi receitado por um médico ou dentista?

Pergunte para a mãe ou responsável se o remédio foi receitado por médico ou dentista.

11c. Este medicamento está sendo usado de forma contínua, sem data certa para parar?

Pergunte para a mãe ou responsável se o medicamento está sendo utilizado sem data certa para parar, ou seja, se é um medicamento de uso contínuo.

*Remédio 4***9d. Por qual motivo ou doença este remédio foi ou está sendo usado?**

Pergunte para a mãe ou responsável por que razão o/a adolescente usou o medicamento que tiver citado na questão **7d**. Anote adequadamente o motivo. Não preencha códigos, pois essa codificação será feita posteriormente.

10d. Foi receitado por um médico ou dentista?

Pergunte para a mãe ou responsável se o remédio foi receitado por médico ou dentista.

11d. Este medicamento está sendo usado de forma contínua, sem data certa para parar?

Pergunte para a mãe ou responsável se o medicamento está sendo utilizado sem data certa para parar, ou seja, se é de uso contínuo.

*Remédio 5***9e. Por qual motivo ou doença este remédio foi ou está sendo usado?**

Pergunte para a mãe ou responsável por que razão o/a adolescente usou o medicamento que tiver citado na questão **7e**. Anote adequadamente o motivo. Não preencha códigos, pois essa codificação será feita posteriormente.

10e. Foi receitado por um médico ou dentista?

Pergunte para a mãe ou responsável se o remédio foi receitado por médico ou dentista.

11e. Este medicamento está sendo usado de forma contínua, sem data certa para parar?

Pergunte para a mãe ou responsável se o medicamento está sendo utilizado sem data certa para parar, ou seja, se é de uso contínuo.

12. Nas duas últimas semanas, o(a) <ADOLESCENTE> deixou de usar algum remédio que precisava por não ter conseguido comprar?

Pergunte para a mãe ou responsável se o/a adolescente parou de usar algum remédio que precisava por não ter conseguido comprar, ou seja, por não ter condições financeiras para adquirir a medicação. Se a resposta for (0) Não ou (9) IGN, ir para pergunta 14.

SE SIM:

13. Qual(ais) o(s) nome(s) do(s) remédio(s)?

Escrever o nome dos remédios, um para cada linha. No *tablet*, será possível preencher quantos forem necessário. Para o papel, caso sejam mais de três, continue preenchendo em outro questionário.

13a. Remédio 1:

13b. Remédio 2:

13c. Remédio 3:

14. O(A) <ADOLESCENTE> usou algum desses remédios nos últimos 3 meses (mostrar cartela de corticoides)?

Pergunte para a mãe ou responsável se o/a adolescente usou algum dos corticoides que aparecem na cartela ou algum outro. Se a resposta for (0) Não ou (9) IGN, ir para o Bloco C.

SE SIM:

15. Qual?

Pergunte para a mãe ou responsável qual corticoide utilizado pelo/a adolescente.

16. O(A) <ADOLESCENTE> usou quase todos os dias há pelo menos um mês ou mais?

Pergunte para a mãe ou responsável se o/a adolescente usou corticoides quase todos os dias pelo menos um mês ou mais.

BLOCO C – CARACTERÍSTICAS DA MÃE, DA FAMÍLIA E DO DOMICÍLIO

Gostaria que me contasse sobre a senhora e sua família.

17. A Sra. trabalha atualmente?

Marcar (1) Sim se a mãe exerce alguma atividade em casa (para fora) ou fora de casa, que lhe rende remuneração. Considerar como (1) Sim mesmo que a remuneração não seja em dinheiro (recebe alimentos, por exemplo) ou quando a mãe trabalha para uma firma familiar sem remuneração, mas exerce alguma função. Não importa a situação legal (com ou sem carteira assinada) ou a forma de remuneração (cuida da casa e em troca pode morar nela, por exemplo). Se (0) Não ou (9) IGN, ir para pergunta 19.

SE SIM:

18. A Sra. tem carteira assinada?

Marcar conforme a resposta da mãe, se ela exerce trabalho formal (com carteira assinada) ou informal (sem carteira).

19. A Sra. perdeu o emprego durante a pandemia do novo coronavírus?

Interessa saber se a mãe perdeu o emprego durante a pandemia do coronavírus, mesmo que tenha sido emprego sem carteira assinada e mesmo que ela já tenha conseguido outro emprego. Desta forma, estamos interessados em saber se, em algum momento da pandemia, a mãe esteve desempregada. Se (0) Não ou (9) IGN, ir para pergunta 22.

SE SIM:

20. Quando a Sra. perdeu o emprego?

Anotar conforme resposta da mãe. Preencher o mês e o ano em que ela perdeu o emprego. Caso ela relate que não lembra, marcar 99 9=IGN. Caso ela relate que perdeu mais de uma vez, anotar o primeiro emprego que perdeu

SE SIM:

21. Por quanto tempo a Sra. ficou sem trabalhar?

Registrar conforme a resposta da mãe em dias ou meses. Se a resposta for em dias, preencher 0 em meses e, se a resposta for em meses, preencher 0 em dias. Caso ela ainda esteja desempregada, marcar 77 77=continua desempregada. Caso ela relate que não lembra, marcar 99 99=IGN.

CIGARRO

Agora vamos falar um pouco sobre cigarro.

22. A Sra. fuma?

Marcar (1) Sim se a mãe fumar atualmente. Considerar fumante quem fuma pelo menos 1 cigarro todos os dias. Se a resposta for (0) Não ou (9) IGN, ir para pergunta 24.

SE SIM:

23. Quantos cigarros por dia?

Anotar o número médio de cigarros fumados por dia. Lembre-se que um maço de cigarros tem 20 unidades.

RENDA DA CASA

Agora vamos falar sobre renda familiar.

24. Quem é a pessoa de maior renda na casa?

Registrar quem é a pessoa que ganha mais entre aqueles que moram na casa. No caso de não ser o marido/companheiro ou a mãe, marque "outro" e especifique quem.

24a. Quem?

Registrar quem é a pessoa com a maior renda na casa.

25. No mês passado, quanto receberam as pessoas da casa?

O objetivo dessa questão é investigar quantas pessoas na casa participam da renda familiar através de salário ou aposentadoria. Anotar então qual foi a renda de cada pessoa no mês passado. **A renda deve ser anotada em reais.**

- Quando mencionarem a renda em salários mínimos, por exemplo, tente descobrir quanto isso significa em Reais. Em 2021, o salário mínimo equivale R\$1.100,00.
- Se alguém recusar dar a informação da renda não insista - siga seu trabalho e preencha os espaços com "99999".
- **IMPORTANTE:** Considerar apenas a renda do mês anterior. Por exemplo, para entrevistas realizadas em 15 de julho, considerar a renda do mês de junho. Se uma pessoa começou a trabalhar no mês corrente, não incluir o seu salário. O mesmo se aplica para o caso inverso, isto é, se uma pessoa está atualmente desempregada, mas trabalhou no mês que passou e recebeu salário, incluí-lo no orçamento familiar. Se estiver desempregado há mais de um mês, considerar a renda do trabalho ou biscate/bico atual.
- Quando a informante não souber informar a renda de outros membros da família, tentar aproximar ao máximo, aceitando a resposta "ignorado" somente em último caso. Quando isto ocorrer, anotar detalhadamente o tipo de ocupação desta pessoa.

- Não incluir rendimentos ocasionais ou excepcionais, como por exemplo, o 13º salário ou o recebimento de indenização por demissão. Para empregados, considerar a renda bruta sem excluir os descontos; se for proprietário de algum estabelecimento, considerar a renda líquida.
- Se a pessoa trabalhou no último mês como safrista, mas durante o restante do ano trabalha em outro emprego, anotar as duas rendas, sempre atentando para o valor correspondente a um mês de trabalho. Nos casos mais complicados, em que não se tenha uma resposta direta, anotar no diário de campo.
- Se mais de quatro pessoas tiverem renda no último mês, anotar no diário de campo e, por ocasião da codificação, somar a renda, por exemplo, da quarta e quinta pessoa e anotar na renda da quarta pessoa.
- No caso de pensão alimentícia do/a adolescente, a renda deve ser anotada no campo do responsável.

**Se houver mais do que quatro pessoas com renda na casa, utilizar outro questionário de papel e seguir preenchendo os valores (Não anotar centavos).

AUXÍLIO EMERGENCIAL

Essas informações são para fins de pesquisa e NÃO serão acessadas por nenhuma fonte governamental.

É importante esclarecer que o governo não terá acesso a essas informações.

26. Você solicitou auxílio emergencial durante a pandemia?

Nesta pergunta, gostaríamos de saber se a mãe ou responsável solicitou o auxílio emergencial durante a pandemia. Se a resposta for (0) Não ou (9) IGN, ir para questão 29.

SE SIM:

27. Você recebeu o auxílio emergencial?

Para aquelas mães ou responsáveis que referiram solicitar auxílio emergencial, interessa saber se de fato recebeu esse benefício. Se a resposta for (0) Não ou (9) IGN, ir para questão 29.

SE SIM:

28. Quantas parcelas você recebeu?

Registrar o número de parcelas que a mãe ou a responsável relatar que recebeu.

29. Comparado com fevereiro, depois do início da pandemia da COVID-19, como ficou a situação financeira da sua família?

Nesta questão as opções devem ser lidas para a mãe ou responsável. Interessa saber se comparado com fevereiro, depois do início da pandemia da COVID-19, houve uma melhora, piora ou se a situação financeira da família do/a adolescente manteve-se igual ao período anterior à pandemia.

BLOCO D – COVID

Para as questões 30 e 32, mostrar cartela de opções de resposta “covid mãe 1” e “covid mãe 2” para a mãe ou responsável

Agora vamos falar um pouco sobre a pandemia do novo Coronavírus.

30. Como tem sido a rotina de atividades do(a) <ADOLESCENTE> nos últimos 30 dias? Ler opções e mostrar cartela de opções de resposta “covid mãe 1” para a mãe ou responsável

Nesta questão, pergunte a mãe ou responsável como tem sido a rotina de atividades do/a adolescente durante a pandemia, ou seja, como está o nível de isolamento dele/a. As opções de resposta devem ser lidas.

31. O(A) <ADOLESCENTE> usou máscara quando saia de casa nos últimos 30 dias? Ler opções

As opções de resposta devem ser lidas para a mãe ou responsável. Marcar conforme a resposta.

32. Pensando na rotina da casa, quem tem entrado na casa nos últimos 30 dias? Ler opções e mostrar cartela de opções de resposta “covid mãe 2” para a mãe ou responsável

As opções de resposta devem ser lidas para a mãe ou responsável. Interessa saber quem tem entrado na casa, se somente moradores, se parentes mais próximos ou amigos.

33. O(A) <ADOLESCENTE> foi diagnosticado(a) com coronavírus?

Precisamos saber se o/a adolescente foi diagnosticado(a) com coronavírus. Preencha conforme resposta do/a entrevistado/a.

33b. Outra pessoa que mora neste domicílio/casa foi diagnosticado(a) com coronavírus?

Precisamos saber se outra pessoa que mora no domicílio em que o adolescente reside foi diagnosticado(a) com coronavirus. Se a resposta for (0) Não ou (9) IGN, ir para a pergunta 39.

SE SIM:

34. Qual foi o número de outros moradores que tiveram diagnóstico de coronavírus?

Registrar o número de pessoas que a mãe ou responsável relatar. Não esqueça que se refere ao número de moradores do domicílio.

35. Qual(is) foi(ram) essa(s) pessoa(s)?

Nesta questão, deve-se registrar o nome, o grau de parentesco com o/a adolescente, como a pessoa ficou sabendo que estava com coronavírus e onde foi tratado/a.

36. Alguma dessas pessoas morreu devido a COVID-19?

Estamos interessados em saber se alguma das pessoas que a mãe ou responsável relatou na questão anterior morreu devido a COVID-19. Se a resposta for (0) Não, haverá um pulo para a questão 39, no bloco seguinte.

SE SIM:

37. Quantas das pessoas que moravam na sua casa morreram por COVID-19?

Registrar o número de pessoas que a mãe ou responsável relatar.

SE SIM:

38. Qual o grau de parentesco dessa(s) pessoa(s) com o(a) adolescente?

Anotar conforme a resposta da mãe qual o grau de parentesco dessas pessoas com

o/a adolescente.

BLOCO E – SDQ

As questões 39 a 63 constituem-se de uma descrição do/a adolescente pelo ponto de vista da mãe. O período recordatório é referente aos **ÚLTIMOS SEIS MESES**. As opções de resposta são **FALSO, MAIS OU MENOS VERDADEIRO** e **VERDADEIRO**; assinale a que a mãe referir. Caso ela não saiba a resposta, repita a pergunta. Leia as instruções em negrito antes de iniciar o questionário.

39. **Tem consideração pelos sentimentos de outras pessoas.**
40. **Não consegue parar sentado(a) quando tem que fazer a lição ou comer, mexe-se muito, esbarrando nas coisas, derrubando coisas.**
41. **Muitas vezes se queixa de dor de cabeça, dor de barriga e enjoo.**
42. **Tem boa vontade em compartilhar doces, brinquedos, lápis... com colegas.**
43. **Frequentemente tem acessos de raiva ou crises de birra.**
44. **É solitário(a), prefere brincar sozinho(a).**
45. **Geralmente é obediente e faz normalmente o que os adultos lhe pedem.**
46. **Tem muitas preocupações, muitas vezes parece preocupado(a) com tudo.**
47. **Tenta ser atencioso(a) se alguém parece magoado, aflito ou se sentindo mal.**
48. **Está sempre agitado(a), balançando as pernas ou mexendo as mãos.**
49. **Tem pelo menos um bom amigo ou amiga.**
50. **Frequentemente briga com colegas ou os amedronta.**
51. **Frequentemente parece triste, desanimado(a) ou choroso(a).**
52. **Em geral, é querido pelos colegas.**
53. **Facilmente perde a concentração.**
54. **Fica inseguro quando tem que fazer alguma coisa pela primeira vez, facilmente perde a confiança si mesmo(a).**
55. **É gentil com colegas mais novos.**
56. **Frequentemente engana e mente.**
57. **Os colegas “pegam no pé” ou atormentam-no(a).**
58. **Frequentemente se oferece para ajudar outras pessoas (pais, professores, colegas).**
59. **Pensa nas coisas antes de fazê-las.**
60. **Rouba coisas de casa, da escola ou de outros lugares.**
61. **Se dá melhor com adultos do que com jovens de sua idade.**
62. **Tem muitos medos, assusta-se facilmente.**
63. **Completa as tarefas que começa, tem boa concentração.**

BLOCO F – SAÚDE DA MÃE

64. Em geral, desde o início da pandemia, como a Sra. considera que está a sua saúde? Ler opções

Ler as opções claramente e no mesmo tom de voz, não dando ênfase a nenhuma opção. Aguarde que a mãe responda.

BLOCO G – CTSPC

As questões 65 a 82 são referentes ao tratamento da mãe ou do pai dado ao/a adolescente quando o/a mesmo/a se comporta mal, desobedece ou faz coisas erradas. Referem-se **DESDE MARÇO DO ANO PASSADO, OU SEJA, DESDE O INÍCIO DA PANDEMIA** e o período deve ser enfatizado. As opções de resposta são **NUNCA, UMA VEZ** e **MAIS DE UMA VEZ**; assinale a que a mãe ou o pai referir. Caso ele/a

não saiba a resposta, repita a pergunta. Leia as instruções em negrito antes de iniciar o questionário.

65. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) explicou ao(à) <ADOLESCENTE> porquê algo estava errado?**
66. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) colocou de castigo do tipo: mandou-o(a) ficar no quarto ou em qualquer outro lugar?**
67. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) sacudiu o(a) <ADOLESCENTE>?**
68. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) bateu no bumbum dele(a) com alguma coisa como um cinto, chinelo, escova de cabelo, vara ou outro objeto duro?**
69. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) deu a ele(a) outra coisa para fazer em vez daquilo que ele(a) estava fazendo de errado?**
70. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) falou alto, berrou ou gritou com o(a) <ADOLESCENTE>?**
71. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) bateu com a mão fechada ou deu um chute com força nele(a)?**
72. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) deu uma palmada no bumbum do (a) <ADOLESCENTE>?**
73. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) xingou ou praguejou, quer dizer, rogou praga contra ele(a)?**
74. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) disse que iria expulsá-lo(a) de casa ou enxotá-lo(a) para fora de casa?**
75. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) ameaçou dar um tapa nele(a) e não deu?**
76. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) bateu em alguma parte do corpo dele(a) diferente do bumbum com alguma coisa como um cinto, chinelo, escova de cabelo, vara ou outro objeto duro?**
77. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) deu tapa na mão, no braço ou na perna do (a) <ADOLESCENTE>?**
78. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) tirou as regalias dele(a) ou deixou-o(a) sem sair de casa?**
79. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) deu um beliscão no(a) <ADOLESCENTE>?**
80. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) jogou o(a) <ADOLESCENTE> no chão?**
81. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) o(a) chamou de estúpido(a), burro(a), preguiçoso(a) ou de outra coisa parecida?**
82. **Quantas vezes a(o) Sra.(Sr.) deu um tapa/bofetada no rosto, na cabeça ou nas orelhas do(a) <ADOLESCENTE>?**

BLOCO H – EDIMBURGO

Agora pense em como você tem se sentido nos últimos sete dias.

Ler junto com a mãe

As questões 83 a 92 constituem-se de um teste que será lido pela entrevistadora juntamente com a mãe. Deve ser explicado à pessoa entrevistada que as questões vão ser lidas, que ela deve acompanhar através de uma cópia plastificada do instrumento e indicar a opção escolhida. Em casos em que a mãe não sabe ler ou que não compreenda as perguntas, a entrevistadora deverá ler o enunciado das questões e todas as opções, devendo a mãe escolher uma só opção.

****Atenção!** Esse questionário refere-se aos **ÚLTIMOS SETE DIAS.**

83. Eu tenho sido capaz de rir e achar graça das coisas.

- (1) Como eu sempre fiz
- (2) Não tanto quanto antes
- (3) Sem dúvida, menos que antes
- (4) De jeito nenhum

84. Eu tenho pensado no futuro com alegria.

- (1) Como eu sempre fiz

- (2) Não tanto quanto antes
 (3) Sem dúvida, menos que antes
 (4) De jeito nenhum
85. **Eu tenho me culpado sem razão quando as coisas dão errado.**
 86. **Eu tenho ficado ansiosa ou preocupada sem uma boa razão.**
 87. **Eu tenho me sentido assustada ou em pânico sem um bom motivo.**
 88. **Eu tenho me sentido sobrecarregada pelas tarefas e acontecimentos do meu dia-a-dia.**
 89. **Eu tenho me sentido tão infeliz que eu tenho tido dificuldade de dormir.**
 90. **Eu tenho me sentido triste ou muito mal.**
 91. **Eu tenho me sentido tão triste que tenho chorado.**
 92. **Eu tenho pensado em fazer alguma coisa contra mim mesma.**

4. QUESTIONÁRIO DO ADOLESCENTE

4.1 Instruções de preenchimento das questões específicas por bloco.

BLOCO A – IDENTIFICAÇÃO

Sou da Faculdade de Medicina e faço parte do mesmo estudo que você participa desde o nascimento. A última visita foi aos 15-16 anos de idade e, agora, estamos entrevistando novamente todos(as) adolescentes que visitaram a clínica neste último acompanhamento. Gostaria de conversar sobre a sua saúde, de sua família e sobre a pandemia. Podemos conversar?

1. Número de identificação do adolescente:

Preencha com o número de identificação (ID) do/a adolescente.

2. Nome da entrevistadora:

Preencha com o seu nome e código correspondente.

3. Data e horário de início da entrevista:

Preencher o dia, o mês e o ano do início da entrevista com dois dígitos. Exemplo: dia dois de janeiro de 2021 → 02/01/21.

Hora do início da entrevista deve ser escrita no modo 24 horas, exemplo: 02:20 horas da tarde, deve ser codificada como **14:20** horas.

3a. Você tem algum telefone próprio para contato?

Preencher o campo com o telefone para contato.

3b. Você tem instagram?

Perguntar ao adolescente se possui perfil no instagram. Se a resposta for (0)Não, pular para questão 3d.

SE SIM:

3c. Qual o nome do seu perfil?

Preencher o campo com o perfil do instagram do adolescente.

3d. Você tem facebook?

Perguntar ao adolescente se possui perfil no facebook. Se a resposta for (0)Não, pular para questão 3d.

SE SIM:

3e. Qual o nome do seu perfil?

Preencher o campo com o perfil do facebook do adolescente.

3d. Você tem e-mail?

Perguntar ao adolescente se possui e-mail. Se a resposta for (0)Não, pular para questão 4.

SE SIM:

3e. Qual o seu endereço de e-mail?

Preencher o campo com o endereço de e-mail do adolescente.

BLOCO B – ESCOLA**VAMOS COMEÇAR FALANDO SOBRE OS SEUS ESTUDOS.****4. Você teve aulas presenciais e/ou on-line durante o primeiro ano da pandemia do coronavírus? *Ler opções***

Nesta pergunta estamos interessados em saber se o/a adolescente teve aulas durante o primeiro ano da pandemia, sejam elas no formato presenciais e/ou on-line. As opções de resposta devem ser lidas para o/a adolescente. Caso ele/a relate (0) Não estava estudando, ir para pergunta 6.

5. Qual o tipo de escola em que você estuda? *Ler opções*

Precisamos saber se a escola é do tipo pública municipal, pública estadual, pública federal ou privada. As opções de resposta devem ser lidas para o/a adolescente.

6. No momento, você está tendo aulas presenciais e/ou on-line? *Ler opções*

Nesta pergunta estamos interessados em saber se o/a adolescente está tendo aulas atualmente, sejam elas no formato presenciais e/ou on-line. As opções de resposta devem ser lidas para o/a adolescente. Caso ele/a relate (0) Não estava estudando, (1) Não, as aulas foram suspensas durante a pandemia e ainda não voltaram ou (3) Sim, *on-line* somente, ir para pergunta 8.

7. Quando retornaram as aulas presenciais?

Adolescentes que responderam (2) Sim, presencial somente ou (4) Sim, presencial e *on-line*, será questionado quando ocorreu o retorno das aulas presenciais. A entrevistadora deve preencher o mês e o ano. Caso tenha havido mais de uma data de retorno, ou seja, as aulas presenciais voltaram, foram suspensas e depois voltaram novamente, anotar o primeiro retorno.

BLOCO C – COVID-19**AGORA VAMOS FALAR UM POUCO SOBRE A PANDEMIA DO NOVO CORONAVÍRUS.****8. Você teve COVID-19?**

Registrar se o/a adolescente teve ou não coronavírus. Se a resposta for (0) Não ou (9) IGN, ir para a pergunta 11.

SE NÃO TEVE COVID-19:

9. Você tem medo de pegar coronavírus?

Interessa saber se o/a adolescente tem medo de se contaminar com o novo coronavírus ou medo dos problemas ou sequelas causados por essa doença. Se a resposta for (0) Não, ir para a pergunta 11.

SE SIM, TEM MEDO:

10. Por quê?

Preencher qual o motivo de ter medo. No *RedCap* a resposta deve ser escrito em letras maiúsculas e sem acento e sem cedilha.

11. Algum dos seus amigos/amigas teve COVID-19?

Queremos saber se algum amigo do/a adolescente já se contaminou com COVID-19,

ou seja, indivíduos do círculo de amizade do/a adolescente. Se a resposta for (0) Não, ir para a pergunta 13.

SE SIM:

12. Algum dos seus amigos/amigas morreu de COVID-19?

Se o/a adolescente relatar que algum amigo/a já se contaminou com COVID-19, será questionado se algum deles/as veio a óbito em decorrência dessa doença.

13. Seu peso mudou durante a pandemia do coronavírus?

Pergunte ao/a adolescente se seu peso mudou durante a pandemia. Interessa saber se o/a adolescente perdeu peso, ganhou ou manteve o mesmo peso durante este período. *Ler todas as opções para o adolescente.*

14. Qual seu peso atual?

Registrar o peso atual em quilos que o/a adolescente relatar. Caso ele/a relate que não sabe, preencher com 999=IGN.

14. Quanto você pesava antes da pandemia do coronavírus?

Registrar o peso em quilos que o/a adolescente relatar que pesava no período anterior à pandemia. Caso ele/a relate que não sabe, preencher com 999=IGN.

16. Qual a sua altura?

Registrar a altura em centímetros que o/a adolescente relatar. Caso ele/a relate que não sabe, preencher com 999=IGN.

BLOCO D – DISTANCIAMENTO SOCIAL E COVID-19

AS NORMAS GOVERNAMENTAIS PARA O ENFRENTAMENTO DA PANDEMIA COM RELAÇÃO À RESTRIÇÃO DE ATIVIDADES NÃO ESSENCIAIS E DISTANCIAMENTO SOCIAL FORAM INSTAURADAS A PARTIR DE MARÇO DE 2020.

(Ler todas as opções para o adolescente e mostrar cartela de opções de resposta “covid jovem” para as perguntas 17 e 22)

ATENÇÃO: AS QUESTÕES 17 A 21 CORRESPONDEM AO PERÍODO DE MARÇO A JULHO DE 2020.

17. Em qual nível de restrição de atividades e distanciamento social você esteve nos cinco primeiros meses da pandemia (março a julho de 2020), na maior parte do tempo? *Ler opções e mostrar cartela de opções de resposta “covid jovem”*

Queremos saber o nível de restrição de atividades e distanciamento social praticado pelo/a adolescente logo no início da pandemia, nos cinco primeiros meses, a iniciar em março de 2020, quando foi instituído a pandemia em nosso país.-Se a resposta for (6) Teve vida praticamente normal, ir para a pergunta a 21.

18. Por quanto tempo adotou as medidas de distanciamento social? *Ler opções*

Gostaríamos de saber o período de tempo que o/a adolescente conseguiu manter as medidas de distanciamento social. As opções de resposta devem ser lidas para o/a adolescente.

19. Durante esse período dos cinco primeiros meses (março a julho de 2020), seu comportamento restritivo se alterou? *Ler opções*

Esta pergunta está relacionada com a manutenção ou não do padrão restritivo durante este período dos cinco primeiros meses da pandemia, ou seja, se o padrão manteve inalterado durante este período ou se houve aumento ou diminuição da restrição com o passar dos meses. As opções de resposta devem ser lidas para o/a adolescente.

20. Por qual(is) motivo(s) você manteve o distanciamento social entre março e julho de 2020? Vou ler diversas possibilidades e você me responde sim ou não, como melhor se aplicar a você.

Após responder essa pergunta, vá para 22

Nesta pergunta será listado uma sequência de motivos que podem justificar o distanciamento social realizado pelo/a adolescente. Leia atentamente e solicite que o/a adolescente responda (0) Não ou (1) Sim para cada um. Após responder essa pergunta, ir para a pergunta 22.

20a. Para evitar a disseminação da doença/para evitar que a doença se espalhasse

20b. Minha cidade estava de quarentena

20c. Eu não quero ficar doente/não quero que familiares fiquem doentes

20d. Meus pais/responsáveis me obrigaram a ficar em casa

20e. Eu prefiro ficar em casa de qualquer maneira

20f. Não tinha nada para fazer fora de casa, já que estava tudo fechado

20g. Meus amigos me disseram que eu devia ficar em casa

20h. Não queria que as outras pessoas pensassem mal de mim por sair de casa

21. Quais motivos te levaram a esse comportamento (vida praticamente normal)? Vou ler diversas possibilidades e você me responde sim ou não, como melhor se aplicar a você.

Esta pergunta só será realizada para aqueles/as adolescentes que responderam a opção (6) Teve vida praticamente normal, na pergunta 17. Nela, será listado uma sequência de motivos que podem justificar o não cumprimento do distanciamento social pelo/a adolescente. Leia atentamente e solicite que o/a adolescente responda (0) Não ou (1) Sim para cada um.

21a. Não achei que o distanciamento social era necessário ou efetivo para controlar a doença.

21b. Precisei trabalhar ou exercer alguma atividade essencial.

21c. Estava sentindo falta de conviver com meus amigos e familiares.

21d. Já estava cansado(a) de ficar em casa.

21e. A pandemia já estava controlada, então o distanciamento social não era mais necessário.

21f. Me senti pressionado(a) pelos meus amigos/familiares para sair de casa.

AGORA PENSE NO PERÍODO DE MARÇO A JULHO DE 2021

(Atenção: AS QUESTÕES 22 A 26 CORRESPONDEM AO PERÍODO DE MARÇO A JULHO DE 2021.)

22. Em relação aos meses de março a julho de 2021, qual nível de restrição você esteve na maior parte do tempo? Ler opções e mostrar cartela de opções de resposta “*covid jovem*”

Queremos saber o nível de restrição de atividades e distanciamento social praticado pelo/a adolescente entre março e julho de 2021, ou seja, um ano após o início da pandemia. As opções de resposta devem ser lidas para o/a adolescente. Se a resposta for (6) Teve vida praticamente normal, ir para a pergunta a 26.

23. Por quanto tempo adotou as medidas de distanciamento social?

Gostaríamos de saber o período de tempo que o/a adolescente conseguiu manter as medidas de distanciamento social. As opções de resposta devem ser lidas para o/a adolescente.

24. Durante esse período dos meses de março a julho de 2021, seu comportamento restritivo se alterou? Ler opções

Esta pergunta está relacionada com a manutenção ou não do padrão restritivo durante o período de março a julho de 2021, ou seja, se o padrão manteve inalterado durante este período ou se houve aumento ou diminuição da restrição com o passar dos meses. Não deve ser interpretada como comparação com o ano anterior.

25. Por qual(is) motivo(s) você manteve o distanciamento social entre março e julho de 2021? Vou ler diversas possibilidades e você me responde sim ou não, como melhor se aplicar a você.

Após responder essa pergunta, vá para 27.

Nesta pergunta será listado uma sequência de motivos que podem justificar o distanciamento social realizado pelo/a adolescente. Leia atentamente e solicite que o/a adolescente responda (0) Não ou (1) Sim para cada um. Após responder essa pergunta, ir para a pergunta 27.

25a. Para evitar a disseminação da doença/para evitar que a doença se espalhasse.

25b. Minha cidade estava de quarentena.

25c. Eu não quero ficar doente/não quero que familiares fiquem doentes.

25d. Meus pais/responsáveis me obrigaram a ficar em casa.

25e. Eu prefiro ficar em casa de qualquer maneira

25f. Não tinha nada para fazer fora de casa, já que estava tudo fechado.

25g. Meus amigos me disseram que eu devia ficar em casa.

25h. Não queria que as outras pessoas pensassem mal de mim por sair de casa.

26. Quais motivos te levaram a esse comportamento (vida praticamente normal)? Vou ler diversas possibilidades e você me responde sim ou não, como melhor se aplicar a você.

Esta pergunta só será realizada para aqueles/as adolescentes que responderam a opção (6) Teve vida praticamente normal, na pergunta 22. Nela, será listado uma sequência de motivos que podem justificar o não cumprimento do distanciamento social pelo/a adolescente.

26a. Não achei que o distanciamento social era necessário ou efetivo para controlar a doença.

26b. Precisei trabalhar ou exercer alguma atividade essencial.

26c. Estava sentindo falta de conviver com meus amigos e familiares.

26d. Já estava cansado(a) de ficar em casa.

26e. A pandemia já estava controlada, então o distanciamento social não era mais necessário.

26f. Me senti pressionado(a) pelos meus amigos/familiares para sair de casa.

AValiação Subjetiva dos Impactos da Pandemia

(Ler todas as opções para o(a) adolescente)

27. O quanto você acha que a pandemia/distanciamento social afetou você? Ler opções

Nesta pergunta, estamos interessados em saber o quanto a pandemia e/ou o distanciamento social afetou a vida do/a adolescente. As opções de resposta devem ser lidas. Se a resposta for (1) Não afetou nada, ir para a pergunta 29.

28. De quais maneiras a pandemia/distanciamento social afetaram você? Vou ler diversas possibilidades e você me responde sim ou não, como melhor se aplicar a você.

Nesta pergunta será listado uma sequência de maneiras que a pandemia e/ou o distanciamento social podem ter afetado o/a adolescente. Leia atentamente e solicite que o/a adolescente responda (0) Não ou (1) Sim para cada uma.

28a. Senti medo de adoecer.

28b. Senti medo de alguém da minha família adoecer.

28c. Senti saudade dos meus amigos e/ou familiares (avós, tios).

28d. Meus estudos e meu aprendizado foram prejudicados pelo fechamento da escola.

28e. Minha família e eu tivemos problemas financeiros decorrentes da pandemia (por exemplo, meu pai ou minha mãe perdeu o emprego).

28f. Fiquei com medo que faltasse comida em casa durante a pandemia.

28g. Não podia ficar sozinho(a) em casa/não tinha privacidade dentro de casa.

28h. Não gostava de ficar em casa, porque sempre havia brigas ou discussões entre meus familiares ou entre outros moradores da casa.

28i. Não saber quando a pandemia iria terminar me deixava mal e ansioso(a).

28j. Senti falta de fazer exercícios ao ar livre, como jogar futebol ou correr.

28k. Eu me sentia vulnerável, pois não tinha acesso a máscara e produtos de higiene, como álcool em gel.

28l. Eu percebi que meus pais ou outros moradores da casa se sentiam mal ou

estressados por causa da pandemia.

28m. Passei a ter insônia durante a noite.

28n. Passei a sentir muito mais sono do que antes do distanciamento social

28o. Senti mais fome ou comi mais do que eu costumava

28p. Senti menos fome ou comi menos do que o que eu costumava

28q. Não gostava de ficar em casa, pois tive que ajudar mais no trabalho doméstico (lavar louça, lavar roupa, arrumar a casa)

28r. Não gostava de ficar em casa, pois meus pais, responsáveis ou outros moradores da casa brigavam muito comigo

28s. Ficava muito tempo no celular, na TV, no *tablet* ou no videogame e acho que isso não faz bem para mim.

BLOCO E – TRABALHO

AGORA VAMOS FALAR SOBRE TRABALHO.

VAMOS CONSIDERAR COMO TRABALHO QUALQUER ATIVIDADE QUE VOCÊ REALIZE GANHANDO ALGUM DINHEIRO OU OUTRA COISA EM TROCA PELO SEU TRABALHO.

29. Desde o início da pandemia, você trabalhou recebendo dinheiro ou alguma coisa em troca?

Nesta pergunta, estamos interessados em saber se o/a adolescente trabalhou desde o início da pandemia. Pode ser trabalho formal ou informal. Pode ter acontecido durante toda a pandemia ou apenas em parte dela. Se a resposta for (0) Não, vá para a pergunta 38.

SE SIM:

30. Desde o início da pandemia, quantos meses você trabalhou?

Selecione o número de meses relatados pelo/a adolescente. Se menos de 1 mês, escreva 0 e preencha normalmente as questões seguintes (31 e 32), referente o número de dias e de horas trabalhadas por dia, respectivamente.

SE SIM:

31. Desde o início da pandemia, quantos dias por semana você trabalhou?

Anote sobre uma semana normal, habitual de trabalho (a maioria das semanas). Por exemplo, caso ele/a tenha ficado doente na semana passada, não queremos saber sobre a semana passada, e sim sobre uma semana na qual ele/a estava sadio, trabalhando normalmente. Se o/a entrevistado/a relatar que em uma semana trabalha cinco dias e na outra, seis dias, digitar o menor número, pois se refere àquele número de dias que sempre se trabalha. Se os dias de trabalho foram muito irregulares, peça para que ele/a tente fazer uma média. Se o/a adolescente trabalhou menos de um mês por ano, ou seja, marcou-se 0 para a questão 9, preencha normalmente os dias trabalhados por semana.

SE SIM:

32. Desde o início da pandemia, quantas horas por dia você trabalhou?

Anote sobre um dia normal de trabalho. Caso exista uma variação muito grande, faça uma média. Por exemplo: se ele/a trabalhou 20 minutos na segunda + 40 minutos na quarta, são 30 minutos por dia ($20 + 40 / 2 = 30$). Se o/a entrevistado/a disser “24 horas” ou “não sei” faça um recordatório do dia anterior ou do horário que ele/a acorda, que vai para o trabalho, que volta dele ou quanto tempo ele/a fica envolvido com o trabalho. Não será aceito respostas como “24 horas” ou “todo o dia”. Se o/a adolescente trabalhou menos de um mês por ano, ou seja, marcou 0 para a questão 30, preencha normalmente o horário de trabalho diário, da mesma maneira como foi preenchido para os dias trabalhados por semana.

33. Você está trabalhando atualmente?

Estamos interessados em saber se o/a adolescente está trabalhando atualmente, recebendo alguma forma de pagamento em troca do seu trabalho, considerando dinheiro ou qualquer coisa em troca.

34. O seu trabalho é/foi em casa ou fora de casa?

Adequar o verbo conforme respostas anteriores do/a adolescente. Se o/a adolescente referir que já trabalhou na pandemia, mas não está trabalhando atualmente, perguntar “O seu trabalho foi...”. Se estiver trabalhando atualmente, perguntar “O seu trabalho é...”. Se ele/a trabalha em um negócio da família (como por exemplo, uma mercearia na parte de baixo da casa), considerar como trabalho fora de casa.

35. Você trabalhou/trabalha com seus pais ou outro parente?

Adequar o verbo conforme respostas anteriores do/a adolescente. Se o/a adolescente referir que já trabalhou na pandemia, mas não está trabalhando atualmente, perguntar “Você trabalhou...”. Se estiver trabalhando atualmente, perguntar “Você trabalha...”. Estamos interessados em saber se o trabalho realizado pelo/a adolescente é com familiares ou com terceiros.

36. Quanto você recebe/recebia?

Se o/a adolescente está trabalhando é sobre o rendimento de trabalho atual. Se já trabalhou em algum momento durante a pandemia, o que nos interessa é o rendimento do último trabalho. Se ele/a recebia outro pagamento, que não o dinheiro, marque a opção correspondente, ou seja, preencha com 00000. Se não possui salário fixo, peça para que ele/a faça uma média. Se recebeu qualquer quantia em dinheiro em troca do trabalho, responder a pergunta 36, se não, ir para a 38, no Bloco F – Lazer e Tempo de tela.

SE RECEBEU DINHEIRO PELO TRABALHO:

37. Do dinheiro que recebe/recebia pelo seu trabalho, você ajuda ou ajudava os seus pais ou outros parentes?

Estamos interessados em saber se o/a entrevistado/a ajuda financeiramente os pais ou outros familiares, desde que não seja companheiro/a ou filho/a, caso ele/a os tenha.

BLOCO F – LAZER E TEMPO DE TELA

AGORA VAMOS CONVERSAR SOBRE COISAS QUE VOCÊ TEM FEITO DESDE O INÍCIO DA PANDEMIA, QUANDO VOCÊ NÃO ESTÁ EM AULA (SEJA ON-LINE OU PRESENCIAL) OU NO TRABALHO.

38. Você assiste televisão?

Ter cuidado para diferenciar entre videogame e televisão, porque o videogame será perguntado mais tarde. Aqui estamos interessados em saber se o/a adolescente assiste televisão no aparelho de televisão. Adolescentes que assistem televisão muito eventualmente (menos de 1 vez por semana) devem ser marcadas como (0) Não. Se a resposta for (0) Não, ir para pergunta 41.

SE SIM:

39. Quantas horas você assiste televisão nos domingos?

Queremos saber o tempo por dia que o/a adolescente assiste televisão em um domingo qualquer (maioria dos domingos). Cuidado para não induzir uma resposta. Se o/a adolescente tiver dificuldade para calcular usar a seguinte estratégia: a) Que horas você acorda nos domingos? b) Entre a hora que você acorda e a hora que almoça, quanto tempo você assiste TV? E do almoço até a janta? E depois da janta?

As horas que devem ser apontadas são as que se referem a maior parte do tempo. Se nas férias for diferente, deve ser perguntado durante o ano.

SE SIM:

40. Quantas horas você assiste televisão em um dia de semana sem ser sábado e domingo?

Queremos saber o tempo por dia que o/a adolescente assiste televisão em um dia de semana qualquer (maioria dos dias entre segunda e sexta). Cuidado para não induzir uma resposta. Se o/a adolescente tiver dificuldade para calcular usar a seguinte estratégia: a) Que horas você acorda? b) Entre a hora que você acorda e a hora que almoça, quanto tempo você assiste TV? E do almoço até a janta? E depois da janta? As horas que devem ser apontadas são as que se referem a maior parte do tempo. Se nas férias for diferente, deve ser perguntado durante o ano.

41. Você tem televisão no seu quarto?

Anotar (0) Não ou (1) Sim. Se dorme na sala, considerar (1) Sim.

42. Você joga no celular ou *tablet*?

Ter cuidado porque aqui queremos saber sobre jogos no celular ou *tablet* e **NÃO** acesso a redes sociais, por exemplo. Se a resposta for (0) Não, ir para pergunta 45.

SE SIM:

43. Quantas horas você joga no celular ou *tablet* nos domingos?

Queremos saber o tempo por dia que o/a adolescente joga no celular ou *tablet* em um domingo qualquer (maioria dos domingos). Cuidado para não induzir uma resposta. Se o/a adolescente tiver dificuldade para calcular usar a seguinte estratégia: a) Que horas você acorda nos domingos? b) Entre a hora que você acorda e a hora que almoça, quanto tempo você joga no celular ou *tablet*? E do almoço até a janta? E depois da janta?

As horas que devem ser apontadas são as que se referem a maior parte do tempo. Se nas férias for diferente, deve ser perguntado durante o ano.

SE SIM:

44. Quantas horas você joga no celular ou *tablet* em um dia de semana sem ser sábado e domingo?

Queremos saber o tempo por dia que o/a adolescente joga no celular ou *tablet* em um dia de semana qualquer (maioria dos dias entre segunda e sexta). Cuidado para não induzir uma resposta. Se o/a adolescente tiver dificuldade para calcular, usar a seguinte estratégia: a) Que horas você acorda? b) Entre a hora que você acorda e a hora que almoça, quanto tempo você joga no celular ou *tablet*? E do almoço até a janta? E depois da janta?

As horas que devem ser apontadas são as que se referem a maior parte do tempo. Se nas férias for diferente, deve ser perguntado durante o ano.

45. Você joga videogame?

Não contar jogos em celulares, *tablets* ou *PlayStation Portable* (PSP), que podem ser usados caminhando pela casa. Todos os demais videogames, acoplados à televisão devem ser considerados. Não contar como videogame os jogos eletrônicos de computador (estes devem ser contados na próxima pergunta). Se a resposta for (0) Não, ir para pergunta 48.

SE SIM:

46. Quantas horas você joga videogame nos domingos?

Queremos saber o tempo por dia que o/a adolescente joga videogame em um domingo qualquer (maioria dos domingos). Cuidado para não induzir uma resposta. Se o/a

adolescente tiver dificuldade para calcular usar a seguinte estratégia: a) Que horas você acorda nos domingos? b) Entre a hora que você acorda e a hora que almoça, quanto tempo você joga videogame? E do almoço até a janta? E depois da janta?

As horas que devem ser apontadas são as que se referem a maior parte do tempo. Se nas férias for diferente, deve ser perguntado durante o ano.

SE SIM:

47. Quantas horas você joga videogame em um dia de semana sem ser sábado e domingo?

Queremos saber o tempo por dia que o/a adolescente joga videogame em um dia de semana qualquer (maioria dos dias entre segunda e sexta). Cuidado para não induzir uma resposta. Se o/a adolescente tiver dificuldade para calcular usar a seguinte estratégia: a) Que horas tu acordas? b) Entre a hora que você acorda e a hora que almoça, quanto tempo você joga videogame? E do almoço até a janta? E depois da janta?

As horas que devem ser apontadas são as que se referem a maior parte do tempo. Se nas férias for diferente, deve ser perguntado durante o ano.

48. Você usa computador?

Contar aqui jogos de computador, internet, redes sociais e todas as demais atividades que sejam realizadas em computador. Se a resposta for (0) Não, ir para pergunta 51.

SE SIM:

49. Quantas horas você fica no computador nos domingos?

Queremos saber o tempo por dia que o/a adolescente fica no computador em um domingo qualquer (maioria dos domingos). Cuidado para não induzir uma resposta. Se o/a adolescente tiver dificuldade para calcular usar a seguinte estratégia: a) Que horas você acorda nos domingos? b) Entre a hora que você acorda e a hora que almoça, quanto tempo você fica no computador? E do almoço até a janta? E depois da janta?

As horas que devem ser apontadas são as que se referem a maior parte do tempo. Se nas férias for diferente, deve ser perguntado durante o ano.

SE SIM:

50. Quantas horas você fica no computador em um dia de semana sem ser sábado e domingo?

Queremos saber o tempo por dia que o/a adolescente fica no computador em um dia de semana qualquer (maioria dos dias entre segunda e sexta). Cuidado para não induzir uma resposta. Se o/a adolescente tiver dificuldade para calcular usar a seguinte estratégia: a) Que horas tu acordas? b) Entre a hora que tu acordas e a hora que almoças, quanto tempo tu ficas no computador? E do almoço até a janta? E depois da janta?

As horas que devem ser apontadas são as que se referem a maior parte do tempo. Se nas férias for diferente, deve ser perguntado durante o ano.

BLOCO G – ATIVIDADE FÍSICA

AGORA VAMOS FALAR UM POUCO SOBRE ATIVIDADE FÍSICA QUE VOCÊ POSSA TER PRATICADO NA ÚLTIMA SEMANA, SEM CONTAR AS AULAS DE EDUCAÇÃO FÍSICA NA ESCOLA.

(Atenção: o tempo deve ser marcado sem considerar a educação física da escola)

50a. Você faz atividade física?

Perguntar ao adolescente se ele/ela pratica atividade física.

Desde <DIA> da semana passada, você praticou...

Lembre-se que é “alguma das atividades que vou dizer SEM CONTAR AS AULAS DE EDUCAÇÃO FÍSICA...”

Quando a resposta for (0) Não, colocar 0 (ZERO) nas colunas A e B/C. Para cada atividade, serão realizadas duas perguntas adicionais:

a. Quantos dias na semana?

b. e c. Quanto tempo cada dia?

Ler cada atividade e esperar a resposta do/a entrevistado/a. Eles/as podem não entender alguns esportes/atividades, mas não tem problema, porque quem pratica irá saber. Caso tenha mais de um “outro esporte”, anote todos e mostre para o supervisor quando entregar o questionário. Na questão de quanto tempo cada dia, nunca somar atividades de dias diferentes. Por exemplo: uma adolescente que jogou futebol duas vezes por semana, 30 minutos cada vez, jogou 30 minutos por dia, e não 60. Da mesma forma, outra que jogou 40 minutos na segunda e 20 na sexta, também jogou 30 minutos por dia, que é a média entre os dias.

51. Futebol de sete, rua ou campo?

52. Futsal?

53. Atletismo?

Atletismo é uma modalidade esportiva, que envolve várias atividades, tais como: saltos, corridas, arremessos e lançamentos. Marcar (1) Sim apenas se o/a adolescente disse que faz. Se o/a jovem falar que “corre”, anotar esta resposta na questão Outro.

54. Basquete?

55. Jazz, ballet, outras danças?

56. Ginástica olímpica, rítmica?

57. Judô, karatê, capoeira, outras lutas?

58. Natação?

59. Vôlei?

60. Tênis, pádel?

61. Caminhada?

Considerar caminhada fora da academia ou quando o/a adolescente foi para a academia para fazer caminhada na esteira. Não considerar aquelas caminhadas para aquecimento que antecedem a musculação, por exemplo.

62. Musculação?

63. Academia?

Considerar aulas de ginástica, de abdominal, zumba, localizada, *spinning* ou algum tipo de *body system*, que inclui *jump*, *pump* e *step*, por exemplo.

64. Outro 1?

65. Outro 2?

66. Outro 3?

Escrever qual(is) a(s) atividade(s) física(s), mesmo que seja bicicleta, taco, caçador, andar a cavalo, corrida, etc. Funcional e *crossfit* também devem ser anotados aqui.

Por que você faz atividade física:

Queremos saber por qual motivo o/a adolescente faz atividade física. Deve-se preencher (0) Não ou (1) Sim para cada pergunta abaixo e se o adolescente não pratica atividade física deve preencher (8) NSA (questão 67 a 72):

67. Para se manter sadio?

68. Para estimular a imunidade?

69. Para perder ou manter o peso?

70. Para liberar o estresse/se sentir mais feliz?

71. Para ganhar massa muscular?

72. Para dormir melhor à noite?

73. Você faz atividade física sozinho(a) ou com outra pessoa? Ler opções

Interessa saber se o/a adolescente faz atividade física sozinho/a ou com algum

familiar ou amigo. As opções de resposta devem ser lidas. Caso o/a adolescente relatar que não pratica atividade física, preencher com (8) NSA.

BLOCO H – SAÚDE

AGORA VAMOS FALAR SOBRE A SUA SAÚDE.

74. Como você considera a sua saúde? *Ler opções*

Nessa questão, as opções devem ser lidas para o/a adolescente.

75. Comparando com adolescentes da sua idade, você considera que a saúde da sua boca e dentes é:

Ler opções

O/A entrevistador deverá ler as opções de resposta. Esta pergunta procura investigar a saúde bucal atual. É importante que a resposta seja referente à atualidade.

BLOCO I – LOCUS DE CONTROLE

AGORA VOU LHE PERGUNTAR O QUE VOCÊ SENTE SOBRE ALGUMAS COISAS.

As questões 76 a 87 consideram a opinião do/a adolescente em relação a fatos que ocorrem em sua vida pessoal. Para cada questão aguarde a resposta do/a entrevistado/a e assinale a referida por ele/a. Todas as respostas têm opção (0) Não e (1) Sim.

76. Você acha que, quando você deseja muito, as coisas boas acontecem?

77. As pessoas são legais com você não importa o que você faça?

78. Você costuma se sair mal na escola mesmo quando se esforça?

79. Quando um amigo está bravo com você é difícil fazer com que o amigo goste de você novamente?

80. Você fica surpreso quando seu professor lhe elogia pelo seu trabalho?

81. Quando coisas ruins acontecem com você, a culpa é geralmente de outra pessoa?

82. Sair-se bem no seu trabalho de aula é apenas uma questão de sorte para você?

83. Muitas vezes você é acusado de coisas que não são culpa sua?

84. Quando você entra em uma discussão ou briga, a culpa é geralmente da outra pessoa?

85. Você acha que é uma perda de tempo estudar para as provas?

86. Quando coisas legais acontecem com você geralmente é porque você “deu sorte”?

87. Será que planejando o futuro as coisas boas acontecem?

BLOCO J – AUTOESTIMA

PARA CADA FRASE, RESPONDA A OPÇÃO MAIS ADEQUADA: DISCORDO TOTALMENTE, DISCORDO, CONCORDO OU CONCORDO TOTALMENTE.

Mostrar “Opções de resposta 1”:

As questões 88 a 97 devem ter as opções de respostas lidas para o/a participante. Estas questões também consideram a percepção do/a adolescente em relação a sua vida pessoal. Assinalar a opção que o/a jovem considera mais adequada.

Leia as opções de resposta da primeira pergunta e alcance para o/a adolescente o

documento de figuras (indicando onde consta “Opções de resposta 1”), pedindo para que ele/a acompanhe as opções de resposta e diga a você qual corresponde a cada uma das perguntas. Ele/a pode dizer a opção ou o número equivalente.

88. Eu sinto que sou uma pessoa de valor, no mínimo, tanto quanto as outras pessoas. Ler “opções de resposta 1”

- (1) **Discordo totalmente**
- (2) **Discordo**
- (3) **Concordo**
- (4) **Concordo totalmente**

89. Eu acho que eu tenho várias boas qualidades.

90. Levando tudo em conta, eu penso que eu sou um fracasso.

91. Eu acho que sou capaz de fazer as coisas tão bem quanto a maioria das pessoas.

92. Eu acho que eu não tenho muito do que me orgulhar.

93. Eu tenho uma atitude positiva com relação a mim mesmo.

94. No conjunto, eu estou satisfeito(a) comigo.

95. Eu gostaria de poder ter mais respeito por mim mesmo.

96. Às vezes eu me sinto inútil.

97. Às vezes eu acho que não presto para nada.

BLOCO K – CONTROLE EMOCIONAL

ESCUТА COM ATENÇÃO CADA UMA DAS AFIRMAÇÕES QUE SE SEGUEM E RESPONDA A QUE PARECE MAIS VERDADEIRA PARA VOCÊ. LEMBRE, NÃO EXISTEM RESPOSTAS CERTAS OU ERRADAS, RESPONDA DE ACORDO COM O QUE VOCÊ GERALMENTE SENTE.

Mostrar “Opções de resposta 2”:

As questões 98 a 113 devem ter as opções de respostas lidas para o/a participante. Estas questões também consideram a percepção do/a adolescente em relação a sua vida pessoal. Assinalar a opção que o/a jovem considera ser o que geralmente sente.

Leia as opções de resposta da primeira pergunta e alcance para o/a adolescente o documento de figuras (indicando onde consta “Opções de resposta 2”), pedindo para que ele/a acompanhe as opções de resposta e diga a você qual corresponde a cada uma das perguntas. Ele/a pode dizer a opção ou o número equivalente.

98. Sou uma pessoa feliz. Ler “opções de resposta 2”

- (1) **Discordo totalmente**
- (2) **Discordo**
- (3) **Não concordo, nem discordo**
- (4) **Concordo**
- (5) **Concordo totalmente**

99. Quando os adultos são simpáticos comigo, eu sou simpático(a) com eles.

100. Eu reajo bem quando as coisas mudam ou tenho que experimentar algo novo.

101. Quando fico aborrecido(a), consigo superar isso rapidamente.

102. Quando as coisas não correm como eu quero, fico aborrecido(a) facilmente.

103. Quando o(a)s outro(a)s adolescentes são simpático(a)s comigo, eu sou simpático(a) com ele(a)s.

104. Eu tenho explosões de raiva.

105. Eu gosto de ver os outros se magoarem ou ficarem aborrecidos.

106. Eu incomodo quando não devo.

107. Eu fico zangado(a) quando os adultos me dizem o que posso ou não fazer.

108. Eu sou uma pessoa triste.

109. É difícil para mim esperar por algo que eu queira.
 110. Eu sou calmo(a) e tímido(a) e não mostro meus sentimentos.
 111. Eu faço as coisas sem pensar primeiro.
 112. Quando os outros estão preocupados, eu fico triste e preocupado(a) com eles.
 113. Eu aborreço os outros porque me meto no que não me diz respeito.

BLOCO L – SENTIMENTOS E COMPORTAMENTOS

AUTOCONTROLE

As questões 114 a 117 têm o objetivo de avaliar o quanto o/a adolescente consegue exercer controle sobre si. Referem-se ao jeito de ser do/a participante, elas devem indicar o que ele/a é normalmente. É necessário ler as opções de resposta.

AGORA VAMOS CONVERSAR SOBRE SEU JEITO DE SER. POR FAVOR, INDIQUE O QUANTO CADA UMA DAS AFIRMAÇÕES MOSTRA COMO VOCÊ É NORMALMENTE:

114. Eu consigo resistir a tentações.

Tentações, como por exemplo, por comida ou a fazer compras, e a não realizar um trabalho ou obrigação.

115. Eu tenho dificuldade em interromper maus hábitos.

Realiza hábitos que ele/a considera ruim, mas que não consegue parar.

116. Eu gostaria de ter mais autodisciplina.

Autodisciplina = Autocontrole.

117. As pessoas diriam que eu tenho uma autodisciplina rígida.

Autodisciplina = Autocontrole.

BLOCO M – SONO

AGORA VAMOS FALAR SOBRE O SEU SONO. FAREI PERGUNTAS SOBRE O SEU COMPORTAMENTO DE SONO NO ÚLTIMO MÊS. PERGUNTAREI SOBRE OS DIAS QUE VOCÊ TEM AULA/TRABALHO E NOS DIAS QUE NÃO TEM AULA/TRABALHO, COMO FINAIS DE SEMANA. RESPONDE DE ACORDO COM A SUA PERCEPÇÃO DE UMA SEMANA QUE CONTENHA SEUS HÁBITOS NORMAIS, DIAS COM E SEM AULA/TRABALHO.

Se não trabalha E não estuda vá para 126

As questões 118 a 133 referem-se ao comportamento de sono do/a adolescente em uma semana habitual no **ÚLTIMO MÊS**. Enfatizar para o/a adolescente que as questões são relacionadas ao último mês. Por exemplo: Se a entrevista estiver sendo em outubro você deve salientar e deixar claro que as questões são referentes ao mês de setembro. Também lembrar de considerar aula online como atividade escolar. Você terá uma sequência de imagens que deverá apresentá-las ao/a adolescente, para que ele/a possa responder cada pergunta.

Por favor, pense em uma escala de tempo de 24 horas (por exemplo, 23:00 ao invés de 11:00 da noite).

118a. SE ESTUDA: Quantos dias por semana você tem aula?

Preencher o número de dias que o/a adolescente estuda. Quando ele/a não estudar,

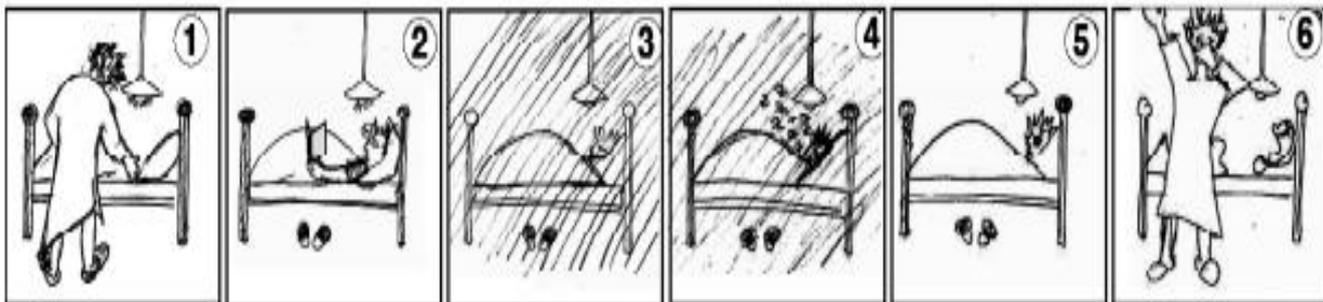
preencher (8) NSA no campo correspondente

118b. SE TRABALHA: Quantos dias por semana você trabalha?

Preencher o número de dias que o/a adolescente trabalha. Quando ele/a não trabalhar, preencher (8) NSA no campo correspondente.

Mostre a “Figura 2” para o/a adolescente e fale:

Para responder as próximas perguntas, pense nos dias que você tem aula/trabalho:



****Atenção: Em todas as questões de horário, cuide a escala de 24h. Caso o/a adolescente referir que vai dormir à meia noite, preencher 0:0. Caso ele/a não saiba referir, o ignorado deve ser marcado como 09:09.**

Mostrar imagem 1 da Figura 2:

119. Que horas você vai para a cama?

Estamos interessados em saber o horário que o/a adolescente deita na cama e não o horário que ele/a dorme. Este horário será questionado logo abaixo.

Como você pode ver na imagem 2, da Figura 2, algumas pessoas permanecem algum tempo acordadas depois de se deitar.

Mostrar imagem 3 da Figura 2:

120. Que horas você está pronto(a) para dormir?

Relembrar que tem pessoas que permanecem algum tempo acordadas, seja vendo televisão, lendo um livro ou mexendo no celular. Desta forma, queremos saber o horário que ele/a decide dormir.

Mostrar imagem 4 da Figura 2:

121. Quantos minutos você necessita para adormecer?

Queremos saber o tempo que ele/a leva entre decidir dormir até de fato pegar no sono.

Mostrar imagem 5 da Figura 2:

122. Que horas você acorda?

Queremos saber o horário que o/a adolescente desperta e não o horário que ele/a levanta da cama.

Mostrar imagem 6 da Figura 2:

123. Depois de acordar, após quantos minutos você se levanta?

Queremos saber quanto tempo o/a adolescente permanece na cama entre acordar até se levantar.

124. Você usa o despertador nos dias de escola/trabalho ou seus pais te

acordam?

O objetivo da pergunta é saber se o/a adolescente desperta sozinho/a ou se precisa de auxílio externo (despertador ou que alguém o/a chame). Se a resposta for (0) Não, ir para pergunta 126.

SE SIM:

125. Você acorda regularmente antes do despertador ou antes de lhe chamarem?
Queremos saber se o/a adolescente desperta antes de ser chamado pelos pais ou antes do despertador tocar.

Agora, para responder as próximas perguntas, pense nos dias livres, ou seja, sem aula/sem trabalho:

A partir de agora aparecerá a mesma sequência de perguntas, porém com foco nos dias livres do/a adolescente.

Mostrar imagem 1 da Figura 2:

126. Que horas você vai para a cama?

Como você pode ver na imagem 2 da Figura 2, algumas pessoas permanecem algum tempo acordadas depois de se deitar.

Mostrar imagem 3 da Figura 2:

127. Que horas você está pronto(a) para dormir?

Mostrar imagem 4 da Figura 2:

128. Quantos minutos você necessita para adormecer?

Mostrar imagem 5 da Figura 2:

129. Que horas você acorda?

Mostrar imagem 6 da Figura 2:

130. Depois de acordar, após quantos minutos você se levanta?

131. Seu tempo de despertar (Imagem 5 da Figura 2) é devido ao uso de um despertador ou seus pais lhe acordando?

O objetivo da pergunta é saber se o/a adolescente desperta sozinho/a ou se precisa de auxílio externo (despertador ou que alguém o/a chame).

132. Existem razões especiais pelas quais você não pode escolher livremente os seus horários de sono em dias livres?

Queremos saber se tem algo que faça com que o/a adolescente não possa fazer seus horários de sono em dias livres, como por exemplo, dormir e acordar conforme sua vontade. Se a resposta por (0) Não, haverá um pulo para a pergunta 134.

SE SIM:

133. Qual?

Marcar o motivo referido pelo/a adolescente. Por exemplo, ele/a pode precisar cuidar de algum familiar, de algum animal de estimação ou tem um *hobbie*, como praticar alguma atividade física. Se a resposta for (3) Outro(s) motivo(s), preencher qual na questão que segue.

BLOCO N – CORTISOL

SE VOCÊ PERMITIR, NÓS IREMOS COLETAR UMA AMOSTRA DO SEU CABELO

PARA MEDIRMOS A QUANTIDADE DE CORTISOL NELA. O CORTISOL É UMA MOLÉCULA QUE PODE ESTAR RELACIONADO COM O ESTRESSE QUE VOCÊ VIVENCIOU E ACUMULOU NOS ÚLTIMOS MESES. PARA QUE ESSA MEDIDA SEJA FEITA ADEQUADAMENTE, PRECISAMOS SABER ALGUMAS INFORMAÇÕES SOBRE O SEU CABELO. APÓS, VOU COLETAR UMA PEQUENA MECHA DO SEU CABELO.

****Atenção: Estas perguntas serão feitas, mesmo em caso de recusa do corte de cabelo.**

134. Você pintou o cabelo, fez reflexos/luzes ou outros tratamentos na raiz do cabelo nos últimos 3 meses?

Essa pergunta é simples e o/a adolescente deve responder apenas (1) Sim ou (0) Não. Caso necessário, lembre que o período recordatório dessa questão é 3 meses e ajude ele/a a contar. Se a resposta for (0) Não, ir para a pergunta 137.

SE SIM:

135. Quando foi a última vez?

Registre o período referido pelo/a participante, de acordo com as opções de resposta: (1) No último mês, (2) Entre 1 a 2 meses atrás ou (3) Entre 2 e 3 meses atrás.

SE SIM:

136. Qual o tipo de tratamento foi feito? (Pode assinalar mais de uma opção)

Registre a resposta do/a participante de acordo com as opções de resposta. Caso o/a participante tenha feito outro tipo de tratamento no cabelo que as alternativas anteriores não contemplem, selecione a opção (19) Outro.

136a. Qual?

Preencher o outro tipo de tratamento feito pelo/a entrevistado.

137. Em média, quantas vezes por semana você lava o cabelo?

Registrar o número de vezes por semana que o/a entrevistado lava o cabelo. Será considerado lavagem de cabelo quando usar shampoo ou sabonete no cabelo.

138. Quando foi a última vez que você lavou o cabelo?

Se o/a participante lavou o cabelo no domingo e hoje é terça-feira, você deve anotar 2 dias atrás. Sempre conte o dia da entrevista. Caso o/a participante tenha lavado o cabelo no dia da entrevista, coloque 0.

139. Quando foi a última vez que você cortou o cabelo?

Adequar a resposta do/a participante de acordo com as opções de resposta.

BLOCO O – ESTRESSE (INSTRUMENTO DASS-21)

As questões 140 a 146 referem-se a um instrumento que avalia o quanto algumas situações aplicam-se na vida do(a) adolescente durante a ÚLTIMA SEMANA. Cada item recebe uma pontuação específica.

Mostrar “Opção de resposta 3”:

PENSANDO NA SUA VIDA, DURANTE A ÚLTIMA SEMANA, O QUANTO ESTAS SITUAÇÕES QUE VOU LER APLICARAM-SE A SUA VIDA:

140. Achei difícil me acalmar.

141. Tive a tendência de reagir de forma exagerada às situações.

142. Senti que estava sempre nervoso(a).

143. Senti-me agitado(a).
 144. Achei difícil relaxar.
 145. Fui intolerante com as coisas que me impediam de continuar o que eu estava fazendo.
 146. Senti que estava um pouco emotivo(a)/sensível demais.

BLOCO P – EVENTOS ESTRESSANTES

VOCÊ E SEUS PAIS

POR FAVOR, RESPONDA SE O QUE ESTÁ ESCRITO NAS FRASES ABAIXO ACONTECE NA SUA CASA: NUNCA, RARAMENTE, ÀS VEZES OU FREQUENTEMENTE. AQUI, O TERMO "PAIS" SE REFERE AOS ADULTOS QUE CUIDAM DE VOCÊ EM CASA. DESDE O INÍCIO DA PANDEMIA...

Nesse questionário, queremos saber se os pais exercem controle sobre a vida do/a adolescente, se sabem o que ele/a faz, com quem anda e aonde vai. As opções de resposta devem ser lidas, sendo elas **NUNCA, RARAMENTE, ÀS VEZES OU FREQUENTEMENTE.**

Tempo livre significa o tempo em que o/a adolescente não está na escola ou realizando tarefas escolares ou domésticas:

147. **Você tem que dizer a seus pais com quem você se encontra no seu tempo livre.** *Ler opções*
 148. **Seus pais lhe perguntam sobre o que você faz no seu tempo livre.** *Ler opções*
 149. **Quando você sai no seu tempo livre, seus pais perguntam aonde você vai.** *Ler opções*

SOCIEDADE BRASILEIRA

NESTA PARTE NÓS QUEREMOS SABER O QUANTO VOCÊ CONCORDA OU DISCORDA DAS SEGUINTE FRASES:

Aqui, queremos saber a opinião do/a adolescente sobre a sociedade brasileira. As opções de resposta são DISCORDO FORTEMENTE; DISCORDO; NÃO CONCORDO, NEM DISCORDO; CONCORDO E CONCORDO FORTEMENTE.

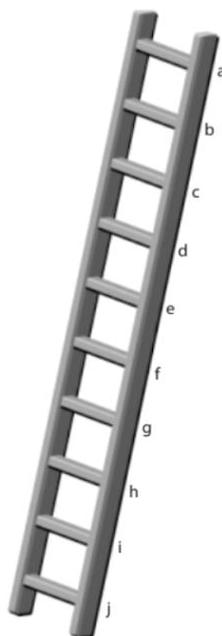
150. **Em geral, você acha a sociedade justa.** *Ler opções*
 151. **Em geral, o sistema político brasileiro funciona como deveria.** *Ler opções*
 152. **A sociedade brasileira precisa ser radicalmente reestruturada.** *Ler opções*
 Por “reestruturada” entende-se mudada, transformada.

ESTADO SOCIAL SUBJETIVO

Mostre a “Figura 1” para o/a adolescente e fale:

“PENSE NESTA ESCADA PARA MOSTRAR ONDE AS PESSOAS ESTÃO NO BRASIL. NO TOPO DA ESCADA ESTÃO AS PESSOAS EM MELHOR SITUAÇÃO - AQUELAS QUE TÊM MAIS DINHEIRO, A MELHOR EDUCAÇÃO, E OS MELHORES EMPREGOS. NA PARTE DE BAIXO DA ESCADA ESTÃO AS PESSOAS EM PIOR SITUAÇÃO - QUE TÊM MENOS DINHEIRO, QUE ESTUDAM POR MENOS TEMPO, NÃO TÊM UM BOM EMPREGO OU ESTÃO DESEMPREGADAS. QUANTO MAIS

ALTO VOCÊ ESTIVER NESSA ESCADA, MAIS PERTO ESTARÁ DAS PESSOAS EM MELHOR SITUAÇÃO. QUANTO MAIS BAIXO VOCÊ ESTIVER, MAIS PRÓXIMO VOCÊ ESTARÁ DAS PESSOAS EM PIOR SITUAÇÃO.”



153. Onde você se colocaria nesta figura, DURANTE A PANDEMIA? Qual a letra do degrau onde você pensa estar neste momento de sua vida em relação a outras pessoas no Brasil.

Nesse momento o/a adolescente deve apontar e, caso você não tenha certeza de para qual degrau ele/a apontou, peça que ele/a diga a letra correspondente. Caso você identifique qual letra corresponde à resposta do/a adolescente, anote no computador e passe para a próxima pergunta.

5. CONFIDENCIAL DO ADOLESCENTE

Antes de entregar o questionário confidencial ao adolescente, deve-se perguntar para a mãe se ele/a sabe ler e escrever. Caso ele/a não saiba, por ter dificuldade de aprender ou contar, deve-se perguntar o motivo e registrar no diário de campo. Se a mãe referir que ele/a **não é alfabetizado porque tem uma deficiência/doença mental**, por ter dificuldade de aprender ou se referir que está em escola especial (Alfredo Dub, Apae e Cerenepe), não se deve entregar o questionário confidencial, nem fazê-lo em forma de entrevista.

Se a mãe disser que o/a adolescente **não se alfabetizou (ou se alfabetizou mal)**, por exemplo, por ter tido diversas evasões escolares ou ter vivido na zona rural, deve-se realizar o confidencial em forma de entrevista e, portanto, solicitar para ficar sozinha com o/a adolescente. Para a entrevista, um tablet e um questionário devem ser utilizados. A entrevistadora deverá ler as perguntas e as opções de respostas na sua cópia (questionário em papel) e o/a adolescente acompanha e responde no tablet. A entrevistadora deve mostrar o local onde o/a adolescente deve marcar sua resposta. **NÃO ESQUEÇA DE COLOCAR O NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO NO ESPAÇO PRÓPRIO.**

CRITÉRIOS PARA O/A ADOLESCENTE NÃO RESPONDER AO QUESTIONÁRIO CONFIDENCIAL:

1) Adolescentes portadores de deficiência intelectual (se a mãe/responsável disser

que o filho é deficiente ou que não tem condições de responder). Anote no final do questionário qual o motivo para ele/a não responder (deficiente mental ou não alfabetizado) – ao lado do parêntese (onde marcaríamos se fosse uma recusa).

2) Adolescentes cegos. Anote no final do questionário (ao lado do parêntese onde marcaríamos se fosse uma recusa) que ele/a é cego. Mas faça com ele o Questionário do Adolescente.

3) Adolescentes surdos que não leem. Anote no final do questionário (ao lado do parêntese onde marcaríamos se fosse uma recusa) que ele/a é surdo/a. Se ele/a utiliza a linguagem de sinais, peça para um familiar, que também a utilize, fazer somente o Questionário do Adolescente.

INSTRUÇÃO DO QUESTIONÁRIO:

Este questionário é secreto. O seu nome não aparecerá nele. Se você tiver alguma dúvida, chame a entrevistadora. Ela irá ajudar você sem olhar as suas respostas. Leia as perguntas com atenção e marque um X na resposta que você achar melhor. Não há resposta certa ou errada, queremos a sua opinião.

BLOCO A - CIGARROS

1. Nos últimos 30 dias, quantos dias você fumou?

Está sendo perguntado quantos dias o/a adolescente fumou nos últimos 30 dias. Quem responder que já fumou, mas nos últimos 30 dias não fumou nenhum dia, deve responder "não fumei nos últimos 30 dias". Quem responder que não fuma, deve preencher "nunca fumei cigarros".

2. Nos dias em que você fumou, quantos cigarros você geralmente fumou por dia?

A pergunta é sobre número de cigarros fumados por dia, de uma maneira geral, naqueles dias que o/a adolescente fumou. Quem responder que não fuma, deve preencher "nunca fumei cigarros".

BLOCO B – BRIGAS E VIOLÊNCIA

COISAS QUE PODERIAM TER ACONTECIDO NA SUA VIDA

****Atenção: Para todas essas perguntas, caso o/a adolescente relate que não ocorreu no último ano, a orientação é preencher 0.**

3. Nos últimos doze meses, você roubou em lojas, supermercados, vendas?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses roubou em lojas, supermercados, vendas.

SE SIM:

4. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

5. Nos últimos doze meses, você estragou ou destruiu propriedades dos outros de propósito (por exemplo: janelas, carros, iluminação pública)?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses estragou ou destruiu propriedades dos outros de propósito (por exemplo: janelas, carros, iluminação pública).

SE SIM:

6. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

7. Nos últimos doze meses, você arrombou carros para tentar roubar objetos?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses a vida arrombou carros para tentar roubar objetos.

SE SIM:

8. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

9. Nos últimos doze meses, você roubou carros ou motos?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses roubou carros ou motos.

SE SIM:

10. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

11. Nos últimos doze meses, você vendeu drogas ilegais a alguém?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses vendeu drogas ilegais a alguém.

SE SIM:

12. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

13. Nos últimos doze meses, você arrombou casas ou prédios para roubar?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses arrombou casas ou prédios para roubar.

SE SIM:

14. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

15. Nos últimos doze meses, você bateu em outras pessoas com a intenção de machucá-las? (NÃO incluir irmãos, irmãs, nem brincadeiras de luta e chutes em jogos)

Estamos somente interessados se nos últimos 12 meses ele/a bateu em alguém com a intenção de machucá-lo.

SE SIM:

16. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

17. Nos últimos doze meses, você teve alguma briga mais séria causando ferimento em outras pessoas?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses teve alguma briga mais séria causando ferimento em outras pessoas.

18. Nos últimos doze meses, você vendeu objetos que pertenciam a outras pessoas ou que sabia que eram roubados?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses vendeu objetos que pertenciam a outras pessoas ou que sabia que eram roubados.

SE SIM:

19. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

20. Nos últimos doze meses, você roubou dinheiro ou objetos que alguém estava carregando ou usando?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses roubou dinheiro ou objetos que alguém estava carregando ou usando. Se a resposta for “não”, ir para a pergunta 24.

SE SIM:

21. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

22. Nos últimos doze meses, neste(s) roubo(s) de dinheiro ou outros objetos, você fez ameaças ou usou força e violência contra a outra pessoa?

Importante que o/a adolescente indique se neste(s) roubo(s) de dinheiro ou outros objetos fez ameaças ou usou força e violência contra a outra pessoa.

SE SIM:

23. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

24. Nos últimos doze meses, você colocou fogo ou tentou incendiar objetos de propósito (por exemplo: uma escola, uma parada de ônibus, uma casa, etc.)?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses colocou fogo ou tentou incendiar objetos de propósito (por exemplo: uma escola, uma parada de ônibus, uma casa, etc.)?

SE SIM:

25. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

26. Nos últimos doze meses, você carregou uma faca ou outra arma para se proteger ou brigar?

Importante que o/a adolescente indique nos últimos 12 meses você carregou uma faca ou outra arma para te proteger ou brigar.

SE SIM:

27. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

28. Nos últimos doze meses, você usou arma contra outra pessoa?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses usou arma contra outra pessoa.

SE SIM:

29. Quantas vezes isso aconteceu?

O/A adolescente deve escrever o número de vezes.

30. Nos últimos doze meses, você participou de alguma quadrilha, facção ou gangue?

Importante que o/a adolescente indique se nos últimos 12 meses participou de alguma quadrilha, facção ou gangue.

Após o/a adolescente acabar de preencher o questionário confidencial, perguntar se ele/a ficou com alguma dúvida e se conseguiu responder tudo.

Se o/a adolescente ficou com dúvidas ou não conseguiu preencher tudo, tentar esclarecer as dúvidas e estimulá-lo a responder as perguntas que estão em branco, por exemplo, dizendo: "VOCÊ QUER QUE EU EXPLIQUE ALGUMA PERGUNTA?", completando: "PORQUE É IMPORTANTE PARA NÓS QUE VOCÊ RESPONDA TUDO E SEU NOME NÃO VAI APARECER".

**** AGRADEÇA A COLABORAÇÃO DO/A JOVEM ****

SEÇÃO IV

Artigos resultantes da pesquisa

ARTIGO 1

Publicado na revista Cadernos de Saúde Pública

**Exploring the relationship between ultra-processed food consumption and gut
microbiota at school age in a Brazilian birth cohort**

**Explorando a relação entre o consumo de alimentos ultraprocessados e a
microbiota intestinal na faixa etária escolar em uma coorte de nascimentos
brasileira**

**Exploración de la relación entre el consumo de alimentos ultraprocessados y el
microbiota intestinal en niños de edad escolar de una cohorte de nacimientos
brasileña**

Short title: **Ultra-processed food and gut microbiota in a Brazilian cohort**

*Etiene Dias Alves*¹
Marina Xavier Carpena^{1,2}
*Aluísio J. D. Barros*³
*Elena M. Comelli*⁴
Lorena López-Domínguez^{4,5}
*Robert H. J. Bandsma*⁴
*Iná da Silva dos Santos*³
*Alicia Matijasevich*⁶
*Juliana dos Santos Vaz*⁷
*Romina Buffarini*¹
*Isabel Oliveira Bierhals*⁶
*Maria Carolina Borges*¹
*Luciana Tovo-Rodrigues*³

Correspondence

E. D. Alves
Universidade Federal de Pelotas.
Rua Marechal Deodoro 1160, Pelotas, RS 96050-500, Brasil.
etienediasnutri@gmail.com

¹ *Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.*

² *Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, Brasil.*

³ *Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.*

⁴ *Temerty Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, Canada.*

⁵ *Translational Medicine Program, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada.*

⁶ *Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.*

⁷ *Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.*

Artigo submetido em 22 de Maio de 2024. Submissão da versão final em 16 de Outubro de 2024. Aprovado em 6 de Novembro de 2024. Publicado *online* em 31 de Abril de 2025.

Abstract

Dietary patterns significantly impact health outcomes and gut microbiota composition. However, longitudinal studies associating ultra-processed food consumption with gut microbiota composition, especially among adolescents in low- and middle-income countries, are lacking. This study aimed to explore this association using data collected from 364 participants at ages 6, 11, and 12 years from the 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort. Microbiota data was obtained at age 12 after 16S rRNA gene sequencing of self-collected fecal samples. Linear or logistic regression models evaluated the relationship between age groups and gut microbiota outcomes (alpha diversity, beta diversity and relative abundances at the phylum and genus levels), considering dietary covariates and demographic, socioeconomic, health-related, and behavioral factors. No significant associations between ultra-processed food consumption and alpha diversity were observed after multiple testing corrections, and there was no strong evidence linking ultra-processed food consumption and beta diversity, with unweighted metrics explaining little variance at ages 11 and 12. Nominal associations were found between ultra-processed food and relative abundances of *Actinobacteria* ($p = 0.032$) and *Proteobacteria* ($p = 0.045$) (phyla), *Bacteroides* ($p = 0.037$ at age 6; $p = 0.015$ at age 11) and *Peptostreptococcus* ($p = 0.025$ at age 6; $p = 0.010$ at age 11) (genera). However, these associations lost statistical significance after adjustments for multiple comparisons. These findings highlight the need for more longitudinal studies to better understand the complex interaction between ultra-processed food intake and gut microbiota composition in adolescent populations in low- and middle-income countries.

Introduction

Habitual dietary intake plays an important role in shaping the unique and stable profile of an individual's gut microbiome ¹, influencing its abundance and diversity ^{2,3,4}. The gut microbiota is pivotal in various physiological processes, including metabolism and immune function ⁵, and may play a role in the etiology of several diseases, such as obesity and type 2 diabetes mellitus ^{6,7}.

Ultra-processed foods are products primarily derived from food substances and industrial ingredients, characterized as processed and packaged as ready-to-eat items ⁸. Its use has been linked to a number of health issues ⁹ including obesity, diabetes, and non-alcoholic fatty liver disease in both adults and children ^{10,11,12,13}. Notably, the consumption of ultra-processed food consumption is rising in middle- and high-income countries ^{14,15} attributed to their convenience and extended shelf life due to high levels of processing ⁸.

Adolescence is marked by profound changes in physical, mental, social, and lifestyle transformations ¹⁶. This stage presents a critical opportunity for promotion and sustaining health dietary practices ¹⁷, such as preventing consumption of ultra-processed food consumption, which is essential for short- and long-term health, in the light of the global obesity crisis ¹⁷. The composition of gut microbiota in adolescents and potential impact of ultra-processed food consumption on this microbiota are not well elucidated.

Investigation regarding the gut microbiota and its association with ultra-processed food largely targets adult populations from high-income countries, primarily using cross-sectional design ^{18,19,20}. Existing studies in adult cohorts have shown that ultra-processed food consumption correlates with alterations in gut microbiota composition ²¹. Evidence suggest that individuals with higher ultra-processed food intake exhibit a less diverse microbiota, characterized by distinct variations in

predominant phyla^{18,22,23}. For instance, at genus level, a study in a sample of senior subjects, revealed that higher ultra-processed food consumption was positively associated with relative abundance of *Alloprevotella*, *Negativibacillus*, *Prevotella* and *Sutterella*²⁴, corroborating the findings of two other studies with adult samples^{20,25}. The findings also revealed that diets high in energy density and low in fiber, often associated with ultra-processed food consumption, are linked to a microbiota profile with increased *Firmicutes* and reduced *Bacteroidetes* at phylum level, correlating with a heightened risk of obesity²⁶.

Research involving healthy children and adolescents², particularly those from low- and middle-income countries, is essential to understanding of the effects of ultra-processed food consumption on gut microbiota across different life stages and in varied populations. Additionally, long-term consequences of ultra-processed food intake on gut microbiota composition remain uncertain. Therefore, this study aimed to explore the association of consumption of ultra-processed food at three distinct moments (ages 6, 11, and 12 years) in relation to microbiota composition at age 12, in a subsample of participants from the 2004 Pelotas Birth Cohort, Brazil.

Methods

Sample

The 2004 Pelotas (Brazil) birth cohort is a longitudinal, population-based, prospective study. It included all births from January 1st to December 31st from 2004 identified in the city's maternity hospitals, comprising 4,231 newborns in the perinatal period^{27,28}. A total of nine follow-ups have been carried out so far: perinatal, at 3, 12, 24, 48 months, 6, 11, 15 and 18 years old. This study analyzed data from cohort participants who participated in follow-ups at 6 and 11 years of age, and a subset

followed at 12 years old ²⁹.

In 2017, a subsample of 1,303 participants from the 2004 cohort born between September and December was selected for follow-up. From this cohort sub-sample, 497 participants were randomly selected within strata of body mass index (BMI) for age z-scores to include in the microbiome-referred sub-study participants across the whole distribution of BMI. Exclusion criteria were severe cognitive impairment, due to potential difficulties in sample collection or response to questionnaire, pregnancy or postpartum period of six months at the time of the interview. In total, 366 participants provided stool samples. More details on sample selection can be found in the Supplementary Figure 1 and have been described in more detail elsewhere ^{29,30}.

Questionnaires and the stool samples were collected at the participant's homes, in Pelotas, Brazil. The adolescents, with the help of their mothers or guardians, collected stool samples after explanation by the interviewers, using a Norgen Biotek® plastic tube and a collection kit as previously described ^{29,30}.

Fecal samples processing

Following collection, the samples were sent to the Centre for the Analysis of Genome Evolution & Function (CAGEF) at University of Toronto for molecular and bioinformatics analyses. Of the 366 samples collected, one could not be shipped to Canada due to participant ethical authorization issues, and another failed during amplification and sequencing, resulting in a total of 364 samples available for analysis.

DNA was isolated using the ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA; Product No. D4300, <https://www.zymoresearch.com>). The V3V4 region of the 16S rRNA gene was then tripled with barcoded primers 338F and 806R to enable multiplex sequencing ^{31,32}. The products were normalized, purified with Ampure

XP beads, and sequenced on the Illumina MiSeq platform (Illumina; <https://www.illumina.com/>) using V3 chemistry (2 x 300 bp).

For quality control, a single-species (*Pseudomonas aeruginosa* DNA), a mock community (Zymo Microbial Standard), and a negative control without a DNA template were included. Sequence data were processed using the UNOISE pipeline in USEARCH v11.0.667 and vsearch v2.10.4^{33,34,35}. Sequences were trimmed at the 3' ends based on a Q15 quality threshold using cutadapt v1.18. They were then filtered for quality using criteria such as a maximum expected error of 1.0, and length constraints of 100 to 600 base pairs. Following this, sequences underwent de-replication, singleton removal, denoising, and chimera filtering using the unoise3 command. Operational Taxonomic Units (OTU) were assigned at 99% identity, and taxonomy was determined with the SINTAX algorithm and RDP database version 16, with a confidence threshold of 0.8³⁶.

OTU sequences were aligned using QIIME1 (v1.9.1), a version that has since been updated. The comprehensive protocol is detailed in a previously published source²⁹.

Gut microbiota analysis

Alpha diversity (Chao1, Simpson's, and Shannon Entropy) and beta diversity metrics (Weighted and Unweighted UniFrac distances) were calculated using the QIIME2 software³⁷.

Taxa with more than 5% of zeros were analyzed for presence/absence associations in a binary model using hurdle analysis, where non-zero counts were transformed into 1. Taxa with at least 95% of observations were analyzed using their relative abundance in quantitative model and the data was transformed and normalized

as presented elsewhere³⁸. The transformation consisted of calculating the proportions of zero for each taxon and then applied an inverse rank normal transformation to the data, using the *qnorm* function of the R program (<https://www.r-project.org/>).

To better understand the relationship between ultra-processed food and the microbiota, we performed association analysis at phylum and genus levels. Relative abundance of the phyla widely detected in the human gut (former *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria*) were evaluated. Those phyla had their nomenclature recently reviewed: *Actinomycetota*, *Bacteroidota*, *Bacillota* and *Pseudomonadota*, respectively³⁹. In this manuscript, we chosen to describe the data using the previous nomenclature to facilitate comparison with earlier published studies. Only genera present in more than 20% of the sample were included in the relative abundance analysis.

Food consumption and ultra-processed food

This study collected dietary data from participants at ages 6, 11, and 12 using food frequency questionnaires (FFQ) with a 12-month recall period, which embeds a more holistic approach to assess diet quality, rather than focus on isolated nutrients. At age 6, the FFQ included 54 items, completed by the mother or guardian, and was validated based on three 24-hour dietary recalls. For the 11 and 12-year follow-ups, the FFQ expanded to 89 items⁴⁰. At 11, the respondent was the adolescent's mother or guardian, and at 12 years, it was the adolescent. The FFQ inquired about the frequency and portion size of each food item, with portion sizes based on standard Brazilian household measures and visually presented to participants. This approach allowed a detailed assessment of the participants' dietary habits over these periods⁴¹.

Participants indicated their consumption frequency for various food items

ranging from 'never or less than once a month' to 'five or more times a day'. These frequencies were then converted into annual consumption rates and divided by 365.25 to estimate daily intake. The amount in grams (g) of each food was calculated according to the frequency of daily consumption and the reported portion size. Portions were adjusted by halving or increasing by 50% depending on whether they were smaller or larger than the standard portion, respectively. All foods were then categorized into one of four levels of processing according to the NOVA classification⁴². The foods investigated in the FFQs are presented in Supplementary Material (Box S1).

Among the assessed foods, 18 were classified as ultra-processed food at 6 years old, while at ages 11 and 12, this classification was extended to 26 items. The proportion in grams from each category was then calculated in relation to the total food consumption. The use of grams is justified as it reflects absolute intake, correlating more directly with the body's physical impact. To evaluate the effect of food consumption on microbiota, absolute quantity could be more pertinent, as gastrointestinal effects, such as carbohydrate fermentation and additive absorption, are likely influenced more by the total amount of food consumed than by the proportion of calories. For the present analysis, ultra-processed food consumption, measured in grams, was divided into tertiles⁴³.

Covariates

The covariates used for model adjustment were selected based on a theoretical framework, prioritizing variables with established evidence in the literature regarding their association with ultra-processed food consumption and the gut microbiota. The covariates encompassed maternal and participants characteristics obtained in the perinatal assessment: maternal age (≤ 24 years, 25-34 years, ≥ 35 years), parity (1, 2-3, or

≥ 4 live births), total family income (in quintiles), child sex (female/male), gestational age (≤ 36 weeks, 37-41 weeks), type of delivery (vaginal/cesarean section), and birth weight (< 2500 g, 2500-3499g, > 3500 g).

Additional variables were breastfeeding duration (< 12 months, 12-24 months, > 24 months), as recorded at the 12-month follow-up; the participant's skin color (white, brown, black, or other), as reported by the mother at the 6-year follow-up; antibiotic use within the 6 months previous to the interview, ascertained at the 12-year follow-up (yes/no); and BMI distributed in tertiles. The consumption of other food categories from the NOVA classification (minimally processed foods, processed culinary ingredients, and processed foods), was also incorporated into the analyses. The regression models were adjusted simultaneously for these variables.

Statistical analyses

Linear regression models were employed to evaluate the relationship between tertiles of ultra-processed food consumption and alpha diversity indices (Chao1 Diversity Index, Simpson Diversity Index, and Shannon Entropy). The results were presented as β coefficients with a 95% confidence interval (95%CI). The beta diversity was measured using Unweighted UniFrac and Weighted UniFrac distance matrices from OTU tables generated in QIIME2⁴⁴. The analysis of variance was evaluated by 999 permutations (PERMANOVA) tests, the effects were evaluated using *adonis* (in the *vegan* package, in RStudio)⁴⁵.

Regarding the relative abundance outcomes, associations between ultra-processed food consumption and abundance at phylum level were assessed using linear regression models. For taxa classified as present or absent according to the criteria outlined (binary model), logistic regression was employed. Conversely, for taxa where

relative abundance was treated as a continuous variable (quantitative model), linear regression models were utilized to evaluate the associations.

All the analyses were conducted separately for each time point (at ages 6, 11, and 12 years). Crude and adjusted models were employed to ascertain the associations between the exposures (ultra-processed foods) and outcomes (gut microbiota composition). In all adjusted models, both maternal and adolescent covariables were included. False Discovery Rate (FDR) of 0.05 was used to correct the p-values from the adjusted (main) models for each table and account or the multiple testing burden.

All analyses were conducted using STATA version 16.0 software (<https://www.stata.com>), except for those involving beta-diversity, as described above.

Ethical aspects

The 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort microbiome study was approved by Research Ethics Committee of School of Medicine at the Federal University of Pelotas (registration number 1.896.438) and by the National Research Ethics Committee of the Ministry of Health (registration: 2.372.760). The participant's mothers or guardians signed the informed consent form and the adolescent the assent form. The study was approved by the University of Toronto's (Protocol #: 00036176) and the Hospital for Sick Children Research Ethics Board (1000059180).

The study was registered at the Brazilian National System for Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge Management (protocol IDs A0C82E7 and R79C01C). Shipment of samples from the Federal University of Pelotas to the University of Toronto was conducted under a Material Transfer Agreement, in compliance with Brazilian ethical regulations.

Results

Participants

A total of 364 participants underwent assessment in the microbiome sub-study (Supplementary Figure 1). All participants possessed data from the microbiome (12 years), as well as from the 6- and 11-year follow-ups, rendering them eligible for inclusion in this investigation. Table 1 describes the characteristics of the included sample.

During perinatal period, almost half of mothers were younger than 24 years old (47.8%) and 56.8% reported having had two or more previous deliveries (Table 1). More than half of participants are male (52.5%) and had self-reported white skin color (68%). Most participants were born between the 37th and 41st weeks of gestation (92.8%), by vaginal delivery (50.8%), weighing between 2,500 and 3,499 grams (61.8%), and were breastfed for less than 12 months (62.2%) (Table 1). The mean BMI was 17.10 kg/m² (Standard deviation - SD = 3.40) at 6 years old, 19.97 kg/m² (SD = 5.25) at 11 years old and 21.49 kg/m² (SD = 5.41) at 12 years old (data not show).

Ultra-processed food consumption characterization

Table 2 presents the median (interquartile range - IQR) of daily food consumption in grams according to the level of food processing. At the age of 6 years, the median daily consumption of ultra-processed food was 1,023.01 g (IQR: 655.13 – 1,664.10), at 11 years it was 644.67 g (IQR: 418.72-1,001.94), and at 12 years it decreased to 541.87 g (IQR: 327.76 - 852.63).

Gut microbiota diversity and composition characterization

The relative abundance of taxa observed in the samples has been previously

documented²⁹. The most prevalent genus was *Bifidobacterium*, detected in 94.8% of participants, while the least common genus was *Megasphaera*, observed in 20.0% of participants (Table 3). Table 4 illustrates the average alpha diversity indices stratified by the covariates, the mean and standard deviation of the indexes, respectively, are Chao1 = 367.107, SD = 99.75; Simpson Evenness: Mean = 0.14, SD = 0.05; Shannon Entropy: Mean = 1.82, SD = 0.10. Table 5 illustrate the relative abundance of phyla stratified by the covariates.

Ultra-processed food consumption and gut microbiota composition

Table 6 presents the associations between ultra-processed food consumption and alpha diversity indices. In the crude analysis, a significant association was observed between ultra-processed food consumption and the Chao1 index for the highest tertile at age 11 ($\beta = 29.819$; 95% CI: 4.87, 54.77) and for both tertiles at age 12 ($p = 0.016$). Shannon entropy was also associated with highest tertile of consumption at age 11 ($\beta = 0.028$; 95% CI: 0.001, 0.05). After adjusting for covariates, just the association with the third tertile at age 11 persisted for both metrics. No significant associations between ultra-processed food consumption and alpha diversity were found at ages 6, 11, and 12 after correction for multiple testing.

Table 7 and Figure 1 display the results of the PERMANOVA analysis for beta diversity metrics. A significant association was observed between ultra-processed food consumption and the Unweighted UniFrac metric at ages 11 ($p=0.007$) and 12 ($p=0.001$), accounting for 0.9% and 1.1% of the variation, respectively. No significant association was found for the Weighted UniFrac metric.

Table 8 presents crude and adjusted analyses of relative abundance at phylum level. Ultra-processed food consumption tertiles at 11 years of age were nominally

associated with the phyla *Actinobacteria* and *Proteobacteria*. The former ($p = 0.032$) exhibited higher abundance in the highest ultra-processed food consumption tertile, while the latter ($p = 0.045$) showed a decrease in abundance among ultra-processed food consumers.

Table 9 reports the nominal associations between ultra-processed food consumption and relative abundances of genera for adjusted results. Supplementary Table 1 provides a comprehensive list of included genera, along with results from the crude and adjusted regression models. The genera with associations in more than one assessment were *Bacteroides* and *Peptostreptococcus*. Ultra-processed food consumption was inversely associated with the relative abundance of *Bacteroides* at both 6 and 11 years of age. In contrast, *Peptostreptococcus* exhibited a nominal association with ultra-processed food consumption at both occasions, although the direction of the relationship was not consistent. However, none of these associations remained statistically significant after adjusting for multiple testing.

Discussion

This study used a population-based birth sub-sample to examine how ultra-processed food consumption in childhood and early adolescence affects the gut microbiota of Brazilian adolescents. We found no significant associations between ultra-processed food consumption and alpha diversity after correction, nor strong evidence linking it to beta diversity. However, nominal associations were observed between ultra-processed food consumption and the abundances of *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroides*, and *Peptostreptococcus* at various occasions.

The impact of ultra-processed food consumption on gut microbiome diversity is a actively debated in the literature. Regarding alpha diversity, our research revealed an

association between ultra-processed food and elevated mean alpha diversity indices (Chao1 and Shannon Entropy) prior to adjusting for covariates at ages 11 and 12. However, subsequent incorporation of covariates, as well as antibiotic usage, substantially attenuated the strength of this association. The multiple tests corrections rendered the effects on alpha diversity measures non-significant. The lack of association between ultra-processed food consumption and alpha diversity is in accordance to previous studies^{18,45,46}. These studies were carried out with women between 18 and 40 years old¹⁸, institutionalized older men⁴⁶ and men and women aged between 31 and 50 years⁴⁶, with a cross-sectional design, and only variables such as race, BMI and age were used. In contrast, other studies have reported a negative association between high ultra-processed food consumption and alpha diversity^{20,22,47}, showing reduced diversity among individuals consuming unhealthy foods like fried products, sugary drinks, processed meats, and ready-made meals, compared to those who consume raw fruits and fish. However, these studies are cross-sectional, focused on adults, and adjusted for only a limited number of confounders, such as sex^{20,22}, BMI^{20,22}, age, smoking, physically activity²⁰ and energy intake²². Despite this, one study found a negative correlation between consumption of fried products and sugary drinks and alpha diversity indices after adjusting for diet, drugs, smoking, and diseases⁴⁷. Hence, the association between ultra-processed food and gut microbiota diversity remains a subject of ongoing inquiry in the scientific literature.

For beta diversity, which reflects differences in species composition among samples, the significance observed at 11 and 12 years of age was accompanied by overlapping patterns among tertiles of ultra-processed food consumption, suggesting no clear distinction in gut microbiota composition across tertiles of ultra-processed food consumption. The small R^2 value further indicates a limited explanatory power,

suggesting that other factors may play a larger role in influencing microbial composition. This finding aligns with previous observational studies in Spanish adults (n = 359) ²², healthy French adults (n = 862) ²⁰ and older subjects aged 55-75 years (n = 645) ²⁴, which reported no differences in beta diversity between ultra-processed food consumption groups.

No associations remained statistically significant after correction to analysis of relative abundance, but nominal associations were identified between ultra-processed food consumption, as well as the *Actinobacteria* phylum and the *Bacteroides* genus. While the literature lacks extensive studies investigating the abundance of the *Actinobacteria* in relation to ultra-processed food consumption, our findings are supported by an observational study ²². Following sex-stratified analyses, researchers noted an increase in taxa abundance at both class and phylum levels *Actinobacteria* among individuals with highest daily ultra-processed food consumption, as assessed via FFQ. Additionally, high abundance of this phylum has been linked to a high-fat, low-fiber diet in other study that aimed to investigate the relationship between diet and enterotypes in 98 individuals ⁴. Finally, an animal model study ⁴⁸ involving young female mice (n = 16) fed a ultra-processed food diet sourced from a fast food chain for six weeks demonstrated a rise in abundance of *Actinobacteria* compared to controls during postnatal development.

Among the genera, the most consistent finding was the association between ultra-processed food consumption and *Bacteroides* at 6 and 11 years. Our results showed a statistically significant reduction in *Bacteroides* abundance among individuals in the intermediate (second tertile) and highest ultra-processed food consumption groups. These findings align with a cross-sectional study of 59 women (mean age 28.0 ± 6.6 years) ¹⁸, which found a negative correlation between *Bacteroides* abundance and ultra-

processed food consumption based on the NOVA classification. However, this contrasts with other cross-sectional study in Spanish adults, where higher abundance at this phylum was observed in men in the highest tertile of UPF consumption ²². The *Bacteroides* genus, composed primarily of gram-negative bacteria, is a key component of the human microbiota and plays a crucial role in maintaining microbial balance ⁴⁹. These bacteria help digest complex polysaccharides, such as dietary fibers, potentially reducing nutrient availability for other bacteria and influencing microbial competition and diversity ⁴⁹. *Bacteroides* has been linked to intestinal inflammation by modulating pro-inflammatory cells ⁵⁰, contributing to conditions like inflammatory bowel disease and metabolic disorders, including obesity and type 2 ^{51,52}.

Given that ultra-processed food are typically high in energy, added sugars, salt, saturated and trans fats, and low in fiber, protein, and micronutrients ⁴², they may induce unfavorable shifts in microbiota composition, promoting the growth of inflammatory bacteria associated with conditions such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and metabolic disorders^{12,54}. This suggests that impact of ultra-processed food consumption on *Actinobacteria* and *Bacteroides* abundance is complex and likely modulated by overall diet quality, nutrient intake, and microbiome health. Further research is needed to clarify these relationships. Since our results were not significant after multiple comparisons, further speculation on this association would be premature.

Notably, our study differs from previous ones regarding population origin, design, and age demographics. The microbiome during childhood may differ significantly from its composition during adulthood, particularly concerning diversity and composition ⁵⁴. However, the literature in this age range is scarce. In a cross-sectional study conducted with 30 children aged between 1 and 6, the authors found that European children had lower richness (Chao1 index) compared to children living in

rural areas of Africa, whose habit is to consume foods rich in fiber ², revealing the need for more studies covering childhood and adolescence.

Finally, not only did we use a different population origin, but also, we adjusted our statistical models for several maternal and child variables that were not included in previous models, even with clear evidence of association with microbiome ⁵⁵. Notably, most existing research has been conducted in high income countries ^{2,22,24}, which may differ in factors influencing ultra-processed food consumption and gut microbiota from low-middle income countries ⁵⁶. Behavioral and economic factors in these different contexts could lead to varying confounding structures. For example, in high-income countries, higher ultra-processed food consumption is often linked to higher BMI ⁵⁷ and lower socioeconomic status ⁵⁹. Conversely, in our study, higher ultra-processed food consumption was more common among adolescents from lower socioeconomic backgrounds, but with lower BMI (Supplementary Table 2). The inconsistency between our findings and those previously reported might be due to differences in adjustment or even potential differential confounding structures across populations. Therefore, the inconsistency in reported findings mainly underscores the need for further and larger longitudinal studies in diverse populations evaluating ultra-processed food consumption and microbiome composition with adjustment for potential confounders (including the ones related to birth and perinatal well-being).

To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the longitudinal relationship between ultra-processed food consumption and gut microbiota in adolescents. This study has several strengths. The first is its longitudinal methodology with data from multiple follow-ups since birth, enhancing the reliability of our findings and reducing reverse causality biases. Further, we thoroughly adjusted various potential confounders, including birth, perinatal-related, socioeconomic,

anthropometric, and dietary factors. The sample size is also higher than most studies published investigating determinants of the microbiota ^{2,22,23}. Lastly, our research addresses a significant gap in the current literature by focusing on a population from a low- and middle-income countries, a group that has been comparatively underrepresented in existing studies.

However, our study has some limitations. The first is the reliance on FFQ for the collection of habitual dietary information. Although FFQs are advantageous due to their cost-benefit ratio, being practical and capable of providing quantitative estimates of consumption, they are a widely used tool in epidemiological studies ⁵⁹, they are susceptible to measurement errors, since they depend on the respondent's recall ability. Additionally, while our study benefits from a larger sample size compared to most research in this field, it is conceivable that even larger sample sizes might be required to adequately power the analysis of some associations. Furthermore, despite our efforts to account for several potential confounding factors in the models, residual confounding may still introduce bias into our results. Literature indicates that gut microbiota is influenced by various factors, including environmental conditions like exposure to pollutants and the presence of household pets, which can affect the abundance and presence of certain taxa. Additionally, given the limited research on gut microbiota in adolescents, age-related factors such as hormonal changes during adolescence, sleep patterns, lifestyle, risk behaviors, and stress may also play a significant role.

Although adjustments for multiple testing revealed no statistically significant associations in diversity and relative abundance metrics, our results indicate that ultra-processed food consumption may influence gut microbiome composition. Specifically, ultra-processed food intake appears to affect the relative abundance of *Actinobacteria* and *Bacteroides* in adolescents. The research underscores the need for future studies

with larger sample sizes, from varied geographic and demographic regions to further explore how ultra-processed food affect gut microbiota diversity and abundance across different age groups and settings. Mainly due to the role that frequent consumption of foods of this type can have as atherogenic triggers in processes such as dyslipidemia, hypertension and obesity, which represent an emerging public health issue.

Table 1 – Description of the sample according to household, maternal, and cohort participants characteristics from the perinatal Period to age 12. The 2004 Pelotas birth cohort study, Brazil (N =364).

Covariables	
Perinatal and maternal characteristics	N (%)
Mother's age (years) (n = 364)	
≤ 24	174 (47.8%)
25 – 34	148 (40.6%)
≥ 35	42 (11.5%)
Gestational age (n = 362)	
< 36 weeks	26 (7.2%)
37-41 weeks	336 (92.8%)
Type of delivery (n = 364)	
Vaginal	185 (50.8%)
Caesarean	179 (49.2%)
Birth weight (n = 364)	
< 2500 g	31 (8.5%)
2500-3499g	225 (61.8%)
> 3500 g	108 (29.7%)
Duration of breastfeeding (months) (n = 362)	
< 12	225 (62.2%)
12-24	64 (17.7%)
> 24	73 (20.2%)
Parity (n = 363)	
1	157 (43.3%)
2-3	151 (41.6%)
4 or more	55 (15.2%)
Household income (quintiles) (n = 364)	
1st quintile (lower)	80 (22.0%)
2nd quintile	71 (19.5%)
3rd quintile	68 (18.7%)
4th quintile	77 (21.2%)
5th quintile	68 (18.7%)
Participant's characteristics	
Sex (n = 364)	
Male	192 (52.8%)
Female	172 (47.3%)
Skin color (n = 363)	
White	247 (68.0%)
Black	45 (12.4%)
Brown	64 (17.6%)
Others	7 (1.9%)
Use of antibiotics in the last 6 months at age 12 (n = 363)	
No	285 (78.5%)
Yes	78 (21.5%)

Table 2 – Median of daily food intake (in grams) consumed by cohort participants at 6, 11 and 12 years of age, according to the level of food processing. The 2004 Pelotas birth cohort study, Brazil.

NOVA classification	6 years old (n = 354)	11 years old (n = 364)	12 years old (n = 364)
Ultra processed food			
1st tertile			
Median (g)	540.74	312.24	234.37
Interquartile range (g)	421.11 – 618.86	226.35 – 419.96	154.50 – 328.37
2nd tertile			
Median (g)	920.20	644.76	542.98
Interquartile range (g)	795.43 – 1,053.12	583.03 – 750.33	454.86 – 620.98
3rd tertile			
Median (g)	1,582.62	1,289.42	1,036.50
Interquartile range (g)	1,376.18 – 2,113.78	1,007.68 – 1,764.45	859.17 – 1,449.71
In natura			
Median (g)	1,476.96	1,732.59	1,357.72
Interquartile range (g)	1,121.87 – 1,989.43	1,206.89 – 2,298.84	1,004.43 – 1,927.74
Processed culinary ingredients			
Median (g)	10.95	16.18	7.5
Interquartile range (g)	0 - 51.26	4.27 – 32.70	0.49 – 23.84
Processed food			
Median (g)	103.28	134.41	91.00
Interquartile range (g)	52.53 - 164.52	96.60 – 170.50	59.37 – 136.45

Table 3 – Description of the taxa included and the model to which they belong.

Phylum	Genus	Model	Mean (SD)	Frequency N (%)
<i>Actinobacteria</i>	-	Q	0 (0.996)	-
<i>Bacteroidetes</i>	-	Q	0 (0.996)	-
<i>Firmicutes</i>	-	Q	0 (0.996)	-
<i>Proteobacteria</i>	-	Q	0 (0.996)	-
-	<i>Bacteroides</i>	Q	0 (0.996)	-
-	<i>Parabacteroides</i>	Q	0 (0.991)	-
-	<i>Prevotella</i>	Q	0 (0.992)	-
-	<i>Alistipes</i>	Q	0 (0.989)	-
-	<i>Clostridium_Sensu_Stricto</i>	Q	0 (0.996)	-
-	<i>Anaerostipes</i>	Q	0 (0.996)	-
-	<i>Blautia</i>	Q	0 (0.996)	-
-	<i>Clostridium_xlva</i>	Q	0 (0.996)	-
-	<i>Coprococcus</i>	Q	0 (0.992)	-
-	<i>Dorea</i>	Q	0 (0.996)	-
-	<i>Fusicatenibacter</i>	Q	0 (0.994)	-
-	<i>Roseburia</i>	Q	0 (0.996)	-
-	<i>Ruminococcus2</i>	Q	0 (0.996)	-
-	<i>Intestinibacter</i>	Q	0 (0.988)	-
-	<i>Romboutsia</i>	Q	0 (0.993)	-
-	<i>Clostridium_IV</i>	Q	0 (0.996)	-
-	<i>Faecalibacterium</i>	Q	0 (0.996)	-
-	<i>Gemmiger</i>	Q	0 (0.989)	-
-	<i>Oscillibacter</i>	Q	0 (0.995)	-
-	<i>Lachnospiracea_incertae_sedis</i>	Q	0 (0.994)	-
-	<i>Ruminococcus</i>	Q	0 (0.993)	-
-	<i>Erysipelotrichaceae_incertae_sedis</i>	B	-	140 (38.5%)
-	<i>Methanobrevibacter</i>	B	-	229 (62.9%)
-	<i>Methanosphaera</i>	B	-	75 (20.6%)
-	<i>Actinomyces</i>	B	-	176 (48.4%)
-	<i>Rothia</i>	B	-	75 (20.6%)
-	<i>Bifidobacterium</i>	B	-	345 (94.8%)
-	<i>Collinsella</i>	B	-	344 (94.5%)
-	<i>Eggerthella</i>	B	-	164 (45.1%)
-	<i>Gordonibacter</i>	B	-	95 (43.4%)
-	<i>Olsenella</i>	B	-	158 (43.4%)
-	<i>Senegalimassilia</i>	B	-	197 (54.1%)
-	<i>Slackia</i>	B	-	238 (65.4%)
-	<i>Butyrivimonas</i>	B	-	279 (76.7%)
-	<i>Odoribacter</i>	B	-	335 (21.4%)
-	<i>Porphyromonas</i>	B	-	78 (21.4%)
-	<i>Paraprevotella</i>	B	-	162 (44.5%)
-	<i>Lactobacillus</i>	B	-	222 (61.0%)
-	<i>Streptococcus</i>	B	-	343 (94.2%)
-	<i>Christensenella</i>	B	-	78 (21.4%)
-	<i>Mogibacterium</i>	B	-	91 (25.0%)

-	<i>Eubacterium</i>	B	-	306 (84.1%)
-	<i>Butyrivibrio</i>	B	-	133 (36.5%)
-	<i>Clostridium_xlvb</i>	B	-	334 (91.8%)
-	<i>Eisenbergiella</i>	B	-	177 (48.6%)
-	<i>Howardella</i>	B	-	129 (35.4%)
-	<i>Peptococcus</i>	B	-	94 (25.8%)
-	<i>Peptoniphilus</i>	B	-	87 (24.0%)
-	<i>Peptostreptococcus</i>	B	-	85 (23.4%)
-	<i>Terrisporobacter</i>	B	-	91 (25.0%)
-	<i>Anaerofilum</i>	B	-	171 (47.0%)
-	<i>Anaerotruncus</i>	B	-	303 (83.2%)
-	<i>Flavonifractor</i>	B	-	289 (79.4%)
-	<i>Intestinimonas</i>	B	-	136 (37.4%)
-	<i>Pseudoflavonifractor</i>	B	-	77 (21.2%)
-	<i>Catenibacterium</i>	B	-	177 (48.6%)
-	<i>Clostridium_XVIII</i>	B	-	304 (83.5%)
-	<i>Holdemanella</i>	B	-	247 (67.9%)
-	<i>Holdemania</i>	B	-	169 (46.4%)
-	<i>Turcibacter</i>	B	-	315 (86.5%)
-	<i>Phascolarctobacterium</i>	B	-	280 (76.9%)
-	<i>Allisonella</i>	B	-	150 (41.2%)
-	<i>Dialister</i>	B	-	230 (63.2%)
-	<i>Megamonas</i>	B	-	91 (25.0%)
-	<i>Megasphaera</i>	B	-	71 (20.0%)
-	<i>Mitsuokella</i>	B	-	83 (22.8%)
-	<i>Veillonella</i>	B	-	259 (71.2%)
-	<i>Victivallis</i>	B	-	235 (64.6%)
-	<i>Parasutterella</i>	B	-	257 (70.6%)
-	<i>Sutterella</i>	B	-	232 (63.7%)
-	<i>Bilophila</i>	B	-	315 (76.9%)
-	<i>Desulfovibrio</i>	B	-	280 (76.9%)
-	<i>Campylobacter</i>	B	-	90 (24.7%)
-	<i>Haemophilus</i>	B	-	218 (59.9%)
-	<i>Akkermansia</i>	B	-	235 (64.6%)

B: binary model; Q: quantitative model; SD: standard deviation.

Table 4 - Average alpha diversity indices (standard deviation - SD), according to covariates in a subsample of the Pelotas 2004 Birth Cohort.

Covariables	Chao1		Simpson Evenness		Shannon (ln)	
	Average (SD)	p-value	Average (SD)	p-value	Average (SD)	p-value
Perinatal and maternal characteristics						
Sex (N=364)		0.231		0.326		0.618
Male	373.0 (7.05)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
Female	360.5 (7.77)		0.1 (0.04)		1.8 (0.1)	
Skin color (N=363)		0.0001		0.196		0.006
White	352.8 (93.75)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
Black	418.3 (100.01)		0.1 (0.06)		1,8 (0.1)	
Brown	381.4 (107.51)		0.1 (0.04)		1.8 (0.1)	
Others	433.0 (90.87)		0.2 (0.05)		1.9 (0.1)	
Mother's age (N=364)		0.008		0.874		0.051
≤ 24	380.3 (94.77)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
25 - 34	347.7 (99.88)		0.1 (0.05)		1,8 (0.1)	
≥ 35	380.6 (110.20)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
Gestational age (N=362)		0.118		0.533		0.070
≤ 36 weeks	396.8 (101.49)		0.1 (0.03)		1.9 (0.1)	
37-41 weeks	365.0 (99.33)		0.1 (0.04)		1.8 (0.1)	
Type of delivery (N=364)		0.0005		0.714		0.006
Vaginal	384.8 (104.57)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
Caesarean	348.8 (91.25)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
Birth weight (N=364)		0.964		0.726		0.892
< 2500 g	364.8 (113.18)		0.1 (0.04)		1.8 (0.1)	
2500-3499 g	366.4 (100.65)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
> 3500 g	369.2 (94.59)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
Duration of breastfeeding (months) (N=362)		0.100		0.943		0.144
< 12	368.6 (93.71)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
12-24	384.7 (106.75)		0.4 (0.04)		1.8 (0.1)	
> 24	349.0 (109.43)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
Parity (N=363)		0.005		0.109		0.466
1	361.0 (93.58)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
2-3	358.1 (99.71)		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	
4 or more	407.0		0.1 (0.05)		1.8 (0.1)	

Household income (quintiles) (N=364)	(108.14)	0.001	0.572	0.087
1th quintile (lower)	389.4 (106.97)		0.1 (0.04)	1.8 (0.1)
2th quintile	384.8 (110.11)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
3th quintile	376.1 (99.05)		0.1 (0.04)	1.8 (0.1)
4th quintile	353.5 (86.37)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
5th quintile	328.8 (82.27)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
Adolescent characteristics				
Follow-up 6 years				
Grams of in natura (N=354)		0.675	0.889	0.301
Less than or equal to median	364.8 (7.87)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
Greater than to median	369.3 (7.16)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
Grams of ingredients (N=354)		0.003	0.701	0.021
Less than or equal to median	351.7 (96.52)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
Greater than to median	382.8 (7.68)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
Grams of processed food (N=354)		0.044	0.309	0.103
Less than or equal to median	356.3 (93.10)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
Greater than to median	377.7 (105.52)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
BMI (tertiles) (N=339)		0.0005	0.824	0.007
1st tertile (lower)	387.0 (104.87)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
2st tertile	376.3 (97.42)		0.1 (0.04)	1.8 (0.1)
3st tertile	337.8 (94.46)		0.1 (0.05)	1.7 (0.1)
Follow-up 11 years				
Grams of in natura (N=364)		0.018	0.252	0.281
Less than or equal to median	354.7 (98.71)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
Greater than or equal to median	379.4 (99.36)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
Grams of ingredients (N=364)		0.016	0.796	0.091
Less than or equal to median	354.5 (95.18)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
Greater than or equal to median	379.6 (102.82)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)
Grams of processed food (N=364)		0.022	0.608	0.019
Less than or equal to median	355.2 (340.43)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)

Greater than or equal to median	379.2(97.12)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)	
BMI (tertiles) (N=363)		<0.001		0.614	0.001
1st tertile (lower)	389.2 (103.63)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)	
2st tertile	379.6 (96.98)		0.1 (0.04)	1.8 (0.1)	
3st tertile	331.9 (89.13)		0.1 (0.05)	1.7 (0.1)	
Follow-up 12 years					
Grams of in natura (N=364)		0.089		0.409	0.495
Less than or equal to median	348.7 (91.79)		0.1 (0,05)	1.8 (0.1)	
Greater than to median	371.4 (101.19)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)	
Grams of ingredients (N=364)		0.088		0.643	0.353
Less than or equal to median	358.2 (99.18)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)	
Greater than to median	376.1 (99.79)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)	
Grams of processed food (N=364)		0.007		0.191	0.177
Less than or equal to median	352.9 (94.30)		0.1 (0.13)	1.8 (0.1)	
Greater than to median	381.2 (103.21)		0.1 (0.13)	1.8 (0.1)	
BMI (tertiles) (N=357)		0.0001		0.585	0.005
1st tertile (lower)	389.6 (104.84)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)	
2st tertile	376.3 (91.82)		0.1 (0.04)	1.8 (0.1)	
3st tertile	336.8 (95.94)		0.1 (0.05)	1.7 (0.1)	
Use of antibiotics in the last 6 months at age 12 (N=363)		0.019		0.958	0.086
No	373.4 (99.34)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)	
Yes	343.5 (98.93)		0.1 (0.05)	1.8 (0.1)	

BMI: body mass index; SD: standard deviation.

Table 5 - Relative abundance of gut microbiome, according to covariates a in a subsample of the 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort.

Covariables	Actinobacteria		Bacteroidetes		Firmicutes		Proteobacteria	
	Mean (SD)	P value	Mean (SD)	P value	Mean (SD)	P value	Mean (SD)	P value
Perinatal and maternal characteristics								
Sex (N=364)		0.810		0.432		0.803		0.156
Male	-0.012 (0.07)		0.039 (1.03)		-0.012 (1.06)		-0.070 (0.96)	
Female	0.013 (0.08)		-0.043 (0.96)		0.014 (0.92)		0.078 (1.03)	
Skin color (N=363)		0.242		0.604		0.191		0.131
White	-0.065 (1.01)		-0.037 (0.98)		0.066 (0.98)		-0.030 (0.96)	
Black	0.240 (1.05)		-0.004 (0.97)		-0.077 (0.91)		0.224 (1.02)	
Brown	0.082 (0.91)		0.15 (1.12)		-0.216 (1.13)		0.047 (1.08)	
Others	-0.120 (0.728)		-0.111 (0.66)		0.241 (0.63)		-0.650 (1.18)	
Mother's age (N=364)		0.081		0.439		0.847		0.111
≤ 24	0.029 (0.95)		0.046 (0.95)		-0.057 (0.91)		0.005 (1.09)	
25 - 34	-0.063 (0.98)		0.016 (1.03)		0.017 (1.04)		-0.052 (0.97)	
≥ 35	0.307 (1.12)		-0.182 (0.88)		0.009 (0.92)		0.296 (0.94)	
Gestational age (N=362)		0.044		0.437		0.195		0.559
≤ 36 weeks	0.385 (0.16)		0.144 (0.92)		-0.242 (0.80)		0.108 (1.11)	
37-41 weeks	-0.021 (0.05)		-0.014 (1.00)		0.021 (1.01)		-0.011 (0.99)	
Type of delivery (N = 364)		0.764		0.234		0.149		0.425
Vaginal	0.015 (0.91)		0.061 (0.97)		-0.074 (0.94)		0.041 (1.02)	
Caesarean	-0.016 (0.08)		-0.063 (1.02)		0.077 (1.04)		-0.042 (0.98)	
Birth weight (N=364)		0.694		0.519		0.313		0.385
< 2500 g	-0.054 (1.21)		0.182 (0.98)		-0.257 (0.98)		0.087 (1.03)	
2500-3499g	0.035 (0.95)		-0.0006 (1.01)		0.014 (1.02)		-0.057 (0.99)	
> 3500 g	-0.058 (1.02)		-0.0511 (0.97)		0.045 (0.94)		0.093 (0.99)	
Duration of breastfeeding (N=362)		0.068		0.574		0.896		0.030
< 12 months	0.084 (0.99)		-0.020 (1.01)		0.010 (1.00)		-0.069 (0.94)	
12-24 months	-0.234 (0.96)		-0.061 (0.98)		0.023 (1.01)		0.301 (1.17)	
> 24 months	-0.061 (1.02)		0.103 (0.98)		-0.046 (1.00)		-0.031 (0.96)	
Parity (N=363)		0.236		0.394		0.047		0.707
1	-0.046 (1.02)		-0.070 (0.98)		0.105 (0.98)		0.014 (0.99)	
2-3	-0.038 (0.94)		0.033 (1.00)		-0.006 (0.99)		-0.044 (0.96)	
4 or more	0.204 (1.06)		0.129 (1.04)		-0.281 (1.03)		0.082 (1.12)	

Household income (quintiles) (N=364)	0.007	0.116	0.007	0.803
1th quintile (lower)	0.284 (0.92)	0.222 (0.97)	-0.337 (0.90)	0.053 (1.02)
2th quintile	0.046 (0.96)	0.069 (1.05)	-0.097 (1.07)	0.027 (0.96)
3th quintile	0.129 (0.93)	-0.184 (0.99)	0.143 (0.95)	-0.096 (1.19)
4th quintile	-0.268 (0.93)	0.0009 (1.00)	0.095 (1.02)	-0.067 (0.90)
5th quintile	-0.117 (1.17)	-0.151 (0.92)	0.215 (0.93)	0.081 (0.96)
Adolescent characteristics				
Follow-up 6 years				
Grams of in natura (N=354)	0.927	0.452	0.350	0.890
Less than or equal to median	-0.002 (1.04)	0.027 (1.01)	-0.038 (0.98)	0.0007 (0.94)
Greater than to median	-0.012 (0.97)	-0.052 (0.99)	0.061 (1.00)	0.015 (1.05)
Grams of ingredients (N=354)	0.966	0.236	0.459	0.164
Less than or equal to median	-0.005 (1.02)	0.049 (1.04)	0.027 (1.01)	-0.065 (1.03)
Greater than to median	-0.009 (0.08)	-0.076 (0.95)	0.051 (0.97)	0.083 (0.95)
Grams of processed food (N=354)	0.163	0.029	0.095	0.891
Less than or equal to median	-0.080 (0.07)	0.103 (0.99)	-0.076 (1.01)	0.0009 (0.99)
Greater than to median	0.067 (1.02)	-0.128 (0.99)	0.099 (0.96)	0.015 (1.00)
BMI (tertiles) (N=339)	0.333	0.458	0.735	0.376
1st tertile (lower)	0.064 (1.01)	-0.071 (0.94)	0.050 (0.948)	-0.018 (1.03)
2st tertile	0.009 (0.96)	-0.033 (1.01)	0.014 (0.96)	-0.058 (0.94)
3st tertile	-0.098 (1.00)	0.087 (1.02)	-0.051 (1.06)	0.120 (1.02)
Follow-up 11 years				
Grams of in natura (N=364)	0.416	0.218	0.102	0.293
Less than or equal to median	-0.043 (1.02)	-0.065 (0.91)	0.086 (0.96)	0.055 (0.89)
Greater than to median	0.042 (0.07)	0.064 (1.02)	-0.085 (1.02)	-0.055 (1.09)
Grams of ingredients (N=364)	0.083	0.071	0.030	0.818
Less than or equal to median	-0.091 (1.04)	0.095 (1.06)	0.114 (1.03)	0.012 (0.94)
Greater than to median	0.090 (0.07)	0.094 (0.92)	-0.112 (0.95)	-0.012 (1.05)
Grams of processed food (N=364)	0.024	0.162	0.040	0.416
Less than or equal to median	-0.117 (1.05)	-0.073 (0.93)	0.106 (0.07)	-0.042 (0.99)
Greater than to median	0.118 (0.92)	0.074 (1.06)	-0.107 (1.01)	0.043 (1.00)
BMI (tertiles) (N=363)	0.097	0.297	0.409	0.615
1st tercile (lower)	0.088 (0.98)	-0.029 (0.90)	-0.016 (0.90)	0.018 (1.07)
2st tercile	0.070 (0.97)	-0.082 (0.98)	0.093 (0.98)	-0.071 (0.85)
3st tercile	-0.159 (1.02)	0.111 (1.09)	-0.076 (1.09)	0.052 (1.06)
Follow-up 12 years				
Grams of in natura (N=364)	0.691	0.746	0.757	0.006

Less than or equal to median	-0.043 (0.94)	0.035 (0.95)	-0.033 (0.93)	0.294 (0.97)	
Greater than to median	0.010 (1.01)	-0.008 (1.01)	0.008 (1.01)	-0.069 (0.99)	
Grams of ingredients (N=364)	0.061		0.094	0.022	0.427
Less than or equal to median	-0.097 (1.01)	-0.087 (0.97)	0.118 (0.97)	0.041 (0.97)	
Greater than to median	0.098 (0.98)	0.088 (1.01)	-0.119 (1.01)	-0.042 (1.02)	
Grams of processed food (N=364)	0.118		0.948	0.308	0.363
Less than or equal to median	-0.082 (1.02)	-0.003 (0.94)	0.054 (0.93)	0.048 (0.98)	
Greater than to median	0.081 (0.97)	0.003 (1.05)	-0.053 (1.06)	-0.047 (1.02)	
BMI (tertiles) (N=357)	0.142		0.319	0.544	0.699
1st tercile (lower)	0.052 (1.01)	-0.015 (0.95)	-0.016 (0.95)	-0.021 (1.03)	
2st tercile	0.102 (0.92)	-0.082 (1.03)	0.074 (1.00)	-0.059 (0.94)	
3st tercile	-0.139 (1.05)	0.109 (1.00)	-0.067 (1.04)	0.048 (1.01)	
Use of antibiotics in the last 6 months at age 12 (N=363)	0.070		0.881	0.381	0.791
No	0.047 (0.98)	0.008 (1.01)	-0.028 (1.00)	0.009 (1.01)	
Yes	-0.184 (0.12)	-0.010 (0.93)	0.083 (0.98)	-0.024 (0.95)	

BMI: body mass index; SD: standard deviation.

Table 6 - Crude and adjusted linear regression showing the association of ultra-processed food consumption at ages 6, 11, and 12 years with gut microbiota composition (alpha diversity indices). The 2004 Pelotas birth cohort study, Brazil.

Exposure: Ultra-processed food consumption	Crude model		Adjusted model ^a		FDR p-value
	Beta# (95%CI)	p-value**	Beta (95%CI)	p-value**	
Outcome: Chao1					
6 years		0.339 ^a		0.551 ^a	0.620
1st tertile	Ref		Ref		
2nd tertile	5.898 (-19.70; 31.49)		-8.528 (-33.65; 16.59)		
3rd tertile	18.745 (-6.84; 44.34)		5.284 (-19.77; 30.34)		
11 years		0.016^a		0.039^a	0.176
1st tertile	Ref		Ref		
2nd tertile	-3.507 (-28.46; 21.45)		-10.584 (-35.57; 14.4)		
3rd tertile	29.819 (4.87; 54.77)		21.072 (-4.46; 46.61)		
12 years		0.016^a		0.257 ^a	0.463
1st tertile	Ref		Ref		
2nd tertile	25.899 (0.95; 50.85)		18.201 (-6.82; 43.22)		
3rd tertile	35.397 (10.45; 60.35)		18.411 (-6.83; 43.65)		
Outcome: Shannon_e (ln)					
6 years		0.523 ^a		0.459 ^a	0.590
1st tertile	Ref		Ref		
2nd tertile	0.01 (-0.02; 0.04)		0.01 (-0.02; 0.04)		
3rd tertile	0.015 (-0.01; 0.04)		0.018 (-0.01; 0.05)		
11 years		0.020^a		0.037^a	0.176
1st tertile	Ref		Ref		
2nd tertile	-0.008 (-0.03; 0.02)		-0.014 (-0.04; 0.01)		
3rd tertile	0.028 (0.001; 0.05)		0.022 (-0.01; 0.05)		
12 years		0.096 ^a		0.459	0.590
1st tertile	Ref		Ref		
2nd tertile	0.018 (-0.01; 0.04)		0.01 (-0.02; 0.04)		
3rd tertile	0.029 (0.02; 0.06)		0.018 (-0.01; 0.05)		
Outcome: Simpson (ln)					
6 years		0.945		0.177	0.398
1st tertile	Ref		Ref		
2nd tertile	0.007 (-0.09; 0.11)		0.006 (-0.10; 0.11)		
3rd tertile	-0.01 (-0.11; 0.09)		-0.010 (-0.11; 0.09)		
11 years		0.248		0.177	0.398
1st tertile	Ref		Ref		
2nd tertile	-0.07 (-0.17; 0.03)		-0.084 (-0.19; 0.02)		
3rd tertile	0.003 (-0.09; 0.10)		0.001 (-0.11; 0.11)		
12 years		0.783		0.846	0.846
1st tertile	Ref		Ref		

2nd tertile	0.033 (-0.07; 0.13)	0.029 (-0.07; 0.13)
3rd tertile	0.007 (0.09; 0.11)	0.023 (-0.08; 0.13)

FDR = False Discovery Rate; 95%CI: 95% confidence interval; Ref = Reference.

Note: n = 334. Values in bold indicate p-value < 0.05.

*Models adjusted for perinatal variables (gestational age, type of delivery, birth weight, parity, total family income, sex, skin color), breastfeeding duration, other sources of consumption in the NOVA classification, BMI and use of antibiotics 6 months before the interview at age 12.

** p-value for the test Parm.

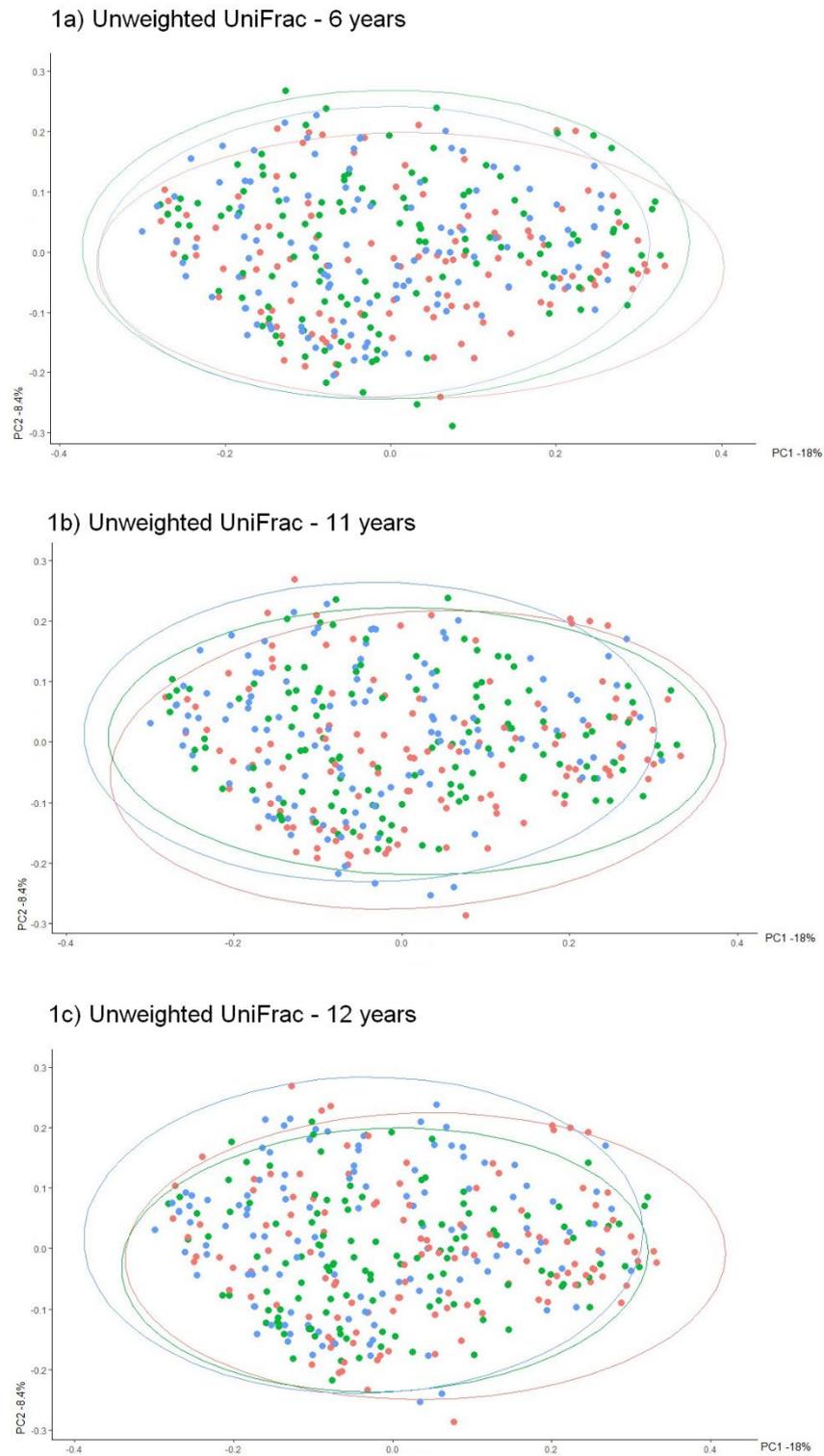
Table 7 – Comparison of gut Microbiota beta diversity with ultra-processed food consumption variables Using PERMANOVA Test.

Variable	DF	Unweighted UNIFRAC		Weighted UNIFRAC	
		R ²	p-value	R ²	p-value
UPF consumption at 6 years	2	0.004	0.598	0.007	0.119
UPF consumption at 11 years	2	0.009	0.007	0.008	0.164
UPF consumption at 12 years	2	0.011	0.001	0.011	0.069

DF: degree of freedom.

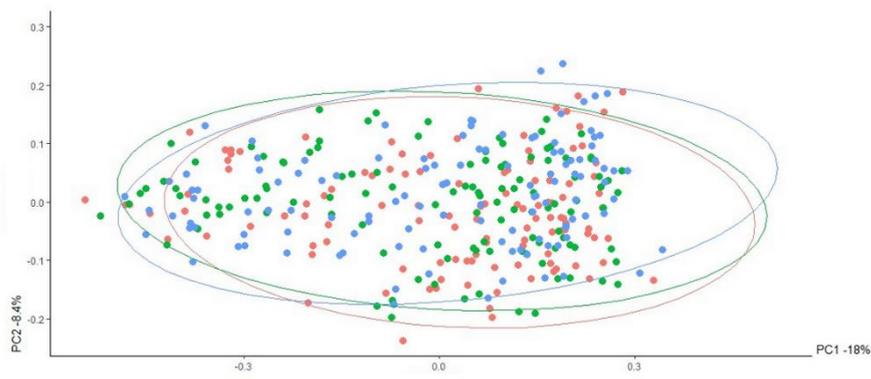
Note: significance was set at $p < 0.05$.

Figure 1 - Principal coordinates analysis (PCoA) based on weighted and unweighted UniFrac distances for different levels of ultra-processed foods consumption in a sample aged 6, 11 and 12 years.

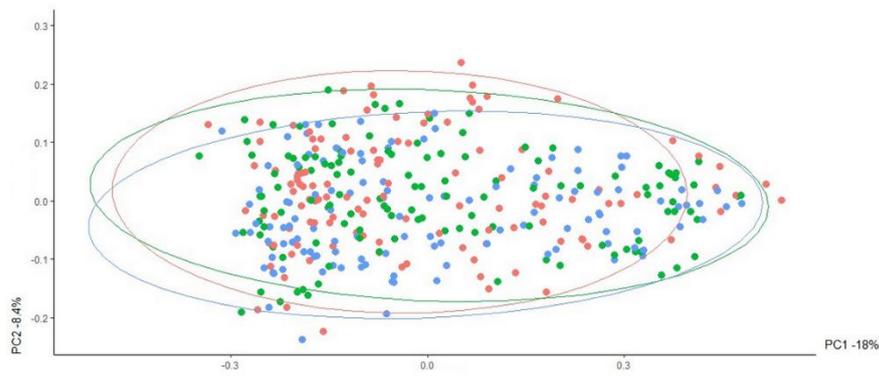


(continues)

1d) Weighted UniFrac - 6 years



1e) Weighted UniFrac - 11 years



1f) Weighted UniFrac - 12 years

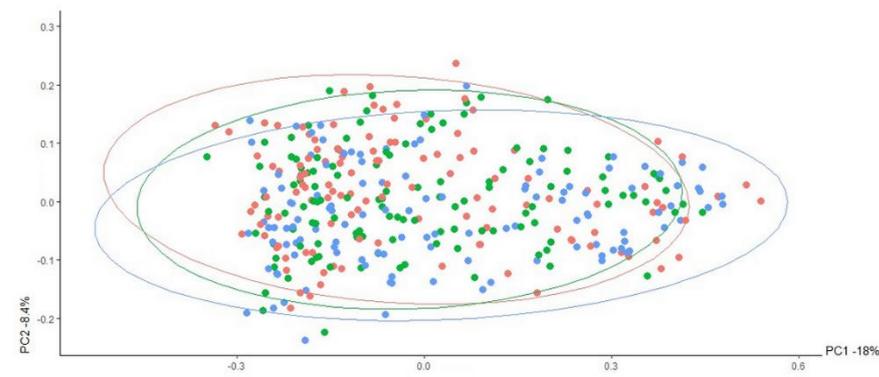


Table 8 - Results of the association between ultra-processed food consumption and relative abundance at the phylum level using linear regressions at ages 6, 11, and 12 years. The 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study, Brazil.

Actinobacteria	6 years	11 years	12 years
Crude model			
Ultra-processed food consumption (p-value*)	0.205	0.006	0.025
1st tertile	Ref	Ref	Ref
2nd tertile	0.076 (-0.18; 0.33)	0.041 (-0.21; 0.29)	0.703 (-0.18; 0.32)
3rd tertile	0.228 (-0.03; 0.07)	0.369 (0.12; 0.62)	0.330 (0.08; 0.58)
Adjusted model **			
Ultra-processed food consumption (p-value*/FDR)	0.499 ^a / 0.626	0.032 ^a / 0.090	0.196* / 0.784
1st tertile	Ref	Ref	Ref
2nd tertile	0.027 (-0.23; 0.29)	0.049 (-0.21; 0.31)	0.049 (-0.21; 0.31)
3rd tertile	0.146 (-0.11; 0.41)	0.325 (0.60; 0.59)	0.228 (-0.03; 0.49)
Bacteroidetes			
Crude			
Ultra-processed food consumption (p-value*)	0.553	0.900	0.555
1st tertile	Ref	Ref	Ref
2nd tertile	0.007 (0.25; 0.26)	0.005 (-0.25; 0.26)	0.068 (-0.18; 0.32)
3rd tertile	-0.122 (-0.38; 0.13)	-0.048 (-0.30; 0.20)	0.139 (-0.11; 0.39)
Adjusted model **			
Ultra-processed food consumption (p-value*/FDR)	0.499 ^a / 0.626	0.436 ^a / 0.550	0.941 ^a / 0.941
1st tertile	Ref	Ref	Ref
2nd tertile	0.027 (-0.23; 0.29)	-0.078 (-0.45; 0.09)	0.046 (-0.22; 0.31)
3rd tertile	0.146 (-0.11; 0.41)	-0.178 (-0.45; 0.09)	0.034 (-0.23; 0.30)
Firmicutes			
Crude			
Ultra-processed food consumption (p-value*)	0.746	0.926	0.145
1st tertile	Ref	Ref	Ref
2nd tertile	-0.077 (-0.33; 0.18)	0.024 (-0.23; 0.28)	-0.066 (-0.32; 0.18)
3rd tertile	0.016 (-0.24; 0.27)	-0.027 (-0.28; 0.23)	-0.243 (-0.49; 0.01)
Adjusted model **			
Ultra-processed food consumption (p-value*/FDR)	0.626 ^a / 0.626	0.550 ^a / 0.550	0.792* / 0.941
1st tertile	Ref	Ref	Ref
2nd tertile	-0.088 (-0.35; 0.18)	0.126 (-0.14; 0.39)	-0.036 (-0.30; 0.23)
3rd tertile	0.040 (-0.22; 0.30)	0.135 (-0.14; 0.41)	-0.092 (-0.36; 0.17)
Proteobacteria			
Crude			
Ultra-processed food consumption (p-value*)	0.245 ^a	0.052*	0.376 ^a
1st tertile	Ref	Ref	Ref
2nd tertile	0.024 (-0.23; 0.28)	-0.308 (-0.56; -0.06)	-0.065 (-0.32; 0.19)
3rd tertile	-0.175 (-0.43; 0.08)	-0.121 (-0.37; 0.13)	-0.177 (-0.43; 0.07)
Adjusted model **			
Ultra-processed food consumption (p-value*/FDR)	0.208 ^a / 0.626	0.045 ^a / 0.090	0.414* / 0.828
1st tertile	Ref	Ref	Ref

2nd tertile	0.014 (-0.29; 0.26)	-0.344 (-0.62; -0.07)	-0.006 (-0.28; 0.27)
3rd tertile	-0.220 (-0.49; 0.05)	-0.139 (-0.42; 0.14)	-0.164 (-0.44; 0.11)

Ref = Reference; FDR: false discovery rate.

* P-value for the test Parm;

** Model adjusted for perinatal variables (gestational age, type of delivery, birth weight, parity, total family income, sex, skin color), breastfeeding duration, other sources of consumption in the NOVA classification, BMI and use of antibiotics 6 months before the interview at age 12.

Table 9 - Nominal results of the associations between ultra-processed food consumption and relative abundance at the genus level at ages 6, 11, and 12 years. The 2004 Pelotas Birth Cohort Study, Brazil.

Taxa (model)	Adjusted model*		
	Beta/OR (95% CI)	p-value**	FDR p-value
Exposure: Ultra-processed food consumption at 6 years			
G_Bacteroides*** (Q)		0.037	0.666
1st tertile	Ref		
2nd tertile	-0.133 (-0.37; 0.11)		
3rd tertile	-0.315 (-0.56; -0.07)		
G_Porphyrromonas (Q)		0.045	0.674
1st tertile	Ref		
2nd tertile	0.424 (0.21; 0.85)		
3rd tertile	0.817 (0.44; 1.53)		
G_Murdochiella (Q)		0.006	0.540
1st tertile	Ref		
2nd tertile	0.253 (0.11; 0.59)		
3rd tertile	0.748 (0.37; 1.50)		
G_Peptostreptococcus*** (Q)		0.025	0.666
1st tertile	Ref		
2nd tertile	0.510 (0.25; 1.04)		
3rd tertile	1.348 (0.72; 2.53)		
G_Allisonella (Q)		0.036	0.666
1st tertile	Ref		
2nd tertile	2.204 (1.21; 4.02)		
3rd tertile	1.539 (0.85; 2.80)		
G_Megamonas (B)		0.032	0.666
1st tertile	Ref		
2nd tertile	1.794 (0.91; 3.55)		
3rd tertile	2.408 (1.25; 4.65)		
Exposure: Ultra-processed food consumption at 11 years			

G_Bacteroides*** (Q)		0.015	0.428
1st tertile	Ref		
2nd tertile	-0.254 (-0.50; -0.01)		
3rd tertile	-0.354 (-0.60; -0.11)		
G_Roseburia (B)		0.019	0.428
1st tertile	Ref		
2nd tertile	0.245 (-0.02; 0.51)		
3rd tertile	-0.123 (-0.40; 0.15)		
G_Butyricimonas (B)		0.010	0.428
1st tertile	Ref		
2nd tertile	1.861 (0.98; 3.54)		
3rd tertile	2.925 (1.44; 5.96)		
G_Peptostreptococcus*** (B)		0.010	0.428
1st tertile	Ref		
2nd tertile	0.704 (0.34; 1.45)		
3rd tertile	1.919 (0.99; 3.72)		
G_Pseudoflavonifractor (B)		0.030	0.428
1st tertile	Ref		
2nd tertile	0.547 (0.28; 1.08)		
3rd tertile	0.371 (0.17; 0.80)		
Exposure: Ultra-processed food consumption at 12 years			
G_Ruminococcus2 (B)		0.047	0.495
1st tertile	Ref		
2nd tertile	0.167 (-0,10; 0.43)		
3rd tertile	0.341 (0.07; 0.61)		
G_Methanobrevibacter (B)		0.009	0.495
1st tertile	Ref		
2nd tertile	2.256 (1.25; 4.07)		
3rd tertile	2.149 (1.86; 3.89)		
G_Senegalimassilia (B)		0.032	0.495
1st tertile	Ref		

2nd tertile	1.037 (0.57; 1.88)
3rd tertile	2.080 (1.12; 3.85)

OR = Odds Ratio; 95%CI = 95% confidence interval; FDR = false discovery rate; Q: Quantitative model (assessed using linear regression, with results expressed as beta coefficients); Ref = Reference; B: Binary model (assessed using binary logistic regression, with results expressed as OR).

* Model adjusted for perinatal variables (gestational age, type of delivery, birth weight, parity, total family income, sex, skin color), breastfeeding duration, other sources of consumption in the NOVA classification, BMI and use of antibiotics 6 months before the interview at age 12.

** P-value for the Test Parm

*** Genus nominally associates in more than one follow-up assessment.

References

1. Leeming ER, Johnson AJ, Spector TD, Le Roy CI. Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients*. 2019;11(2862)doi:10.3390/nu11122862
2. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *PNAS*. 2010;107(1091-6490 (Electronic))(33)doi:10.1073/pnas.1005963107
3. Perler BK, Friedman ES, Wu GD. The Role of the Gut Microbiota in the Relationship Between Diet and Human Health. *Annu Rev Physiol*. 2023;85(1):449-468. doi:10.1146/annurev-physiol-031522-092054
4. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334(6052)(1095-9203 (Electronic))doi:10.1126/science.1208344
5. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2016/06/01 2016;16(6):341-352. doi:10.1038/nri.2016.42
6. Sikalidis AK, Maykish A. The Gut Microbiome and Type 2 Diabetes Mellitus: Discussing A Complex Relationship. *Biomedicines*. 2020;8(1)(1):8. doi:10.3390/biomedicines8010008
7. Singer-Englar T, Barlow G, Mathur R. Obesity, diabetes, and the gut microbiome: an updated review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;13(1):3-15. doi:10.1080/17474124.2019.1543023
8. Monteiro CA, Levy RB, Claro RM, Castro IRRd, Cannon G. A new classification of foods based on the extent and purpose of their processing. *Cad Saude Publica*. 2010;26doi:10.1590/S0102-311X2010001100005
9. Elizabeth L, Machado P, Zinöcker M, Baker P, Lawrence M. Ultra-Processed Foods and Health Outcomes: A Narrative Review. *Nutrients*. 2020;12(7):1955. doi:10.3390/nu12071955
10. Henney AE, Gillespie CS, Alam U, Hydes TJ, Cuthbertson DJ. Ultra-Processed Food Intake Is Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2023;15(10):2266. doi:10.3390/nu15102266
11. Lane MM, Davis JA, Beattie S, et al. Ultraprocessed food and chronic noncommunicable diseases: A systematic review and meta-analysis of 43 observational studies. *Obes Rev*. 2021;22(1467-789X (Electronic))(3)doi:10.1111/obr.13146
12. Valicente VM, Peng CH, Pacheco KN, et al. Ultraprocessed Foods and Obesity Risk: A Critical Review of Reported Mechanisms. *Adv Nutr*. 2023;(2156-5376 (Electronic))doi:10.1016/j.advnut.2023.04.006
13. Delpino FM, Figueiredo LM, Bielemann RM, et al. Ultra-processed food and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Int J Epidemiol*. 2022;(1464-3685 (Electronic))doi:10.1093/ije/dyab247
14. Juul F, Parekh N, Martinez-Steele E, Monteiro CA, Chang VW. Ultra-processed food consumption among US adults from 2001 to 2018. *AJCN*. 2022;115(1):211-221. doi:10.1093/ajcn/nqab305
15. Neri D, Steele EM, Khandpur N, et al. Ultraprocessed food consumption and dietary nutrient profiles associated with obesity: A multicountry study of children and adolescents. *Obes Rev*. 2022;23:e13387. doi:10.1111/obr.13387
16. Sawyer SM, Azzopardi PS, Wickremarathne D, Patton G. The age of adolescence. *Lancet Child Adolesc*. 2018;2(3):223-228. doi:10.1016/S2352-4642(18)30022-1
17. OMS. Global Nutrition Report: Shining a Light to Spur Action on Nutrition. Bristol: Development Initiatives Poverty Research Ltd.
18. Fernandes AE, Rosa PWL, Melo ME, et al. Differences in the gut microbiota of women according to ultra-processed food consumption. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2022;33(1590-3729 (Electronic))(1)doi:10.1016/j.numecd.2022.09.025
19. Niu J, Xu L, Qian Y, et al. Evolution of the Gut Microbiome in Early Childhood: A Cross-Sectional Study of Chinese Children. Original Research. *Frontiers in Microbiology*. 2020-April-03

2020;11doi:10.3389/fmicb.2020.00439

20. Partula V, Mondot S, Torres MJ, et al. Associations between usual diet and gut microbiota composition: results from the Milieu Intérieur cross-sectional study. *Am J Clin Nutr.* 2019;1(1938-3207 (Electronic))(109)doi:10.1093/ajcn/nqz029
21. Brichacek AA-O, Florkowski M, Abiona E, Frank KM. Ultra-Processed Foods: A Narrative Review of the Impact on the Human Gut Microbiome and Variations in Classification Methods. *Nutrients.* 2024;16(11)(2072-6643 (Electronic))doi:10.3390/nu16111738
22. Cuevas-Sierra A, Milagro F, Aranaz P, Martínez J, Riezu-Boj J. Gut Microbiota Differences According to Ultra-Processed Food Consumption in a Spanish Population. *Nutrients.* 2021;13(2072-6643 (Electronic))(8)doi:10.3390/nu13082710
23. Davis SC, Yadav JS, Barrow SD, Robertson BA-O. Gut microbiome diversity influenced more by the Westernized dietary regime than the body mass index as assessed using effect size statistic. *Microbiolyopen.* 2017;6(2045-8827 (Electronic))(4)doi:10.1002/mbo3.476
24. Atzeni A, Martínez M, Babio N, et al. Association between ultra-processed food consumption and gut microbiota in senior subjects with overweight/obesity and metabolic syndrome. *Front.* 2022;(2296-861X (Print))doi:10.3389/fnut.2022.976547
25. Tian TA-O, Zhang X, Luo T, Wang DA-O, Sun Y, Dai J. Effects of Short-Term Dietary Fiber Intervention on Gut Microbiota in Young Healthy People. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy.* 2021;14(1178-7007 (Print))doi:10.2147/DMSO.S313385
26. Indiani CMdSP, Rizzardi KF, Castelo PM, Ferraz LFC, Darrieux M, Parisotto TM. Childhood Obesity and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota: A Systematic Review. *Childhood Obesity.* 2018/12/01 2018;14(8):501-509. doi:10.1089/chi.2018.0040
27. Santos IS, Barros AJ, Matijasevich A, Domingues MR, Barros FC, Victora CG. Cohort Profile: The 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *Int J Epidemiol.* 2010;40(6):1461-1468. doi:10.1093/ije/dyq130
28. Santos IS, Barros AJ, Matijasevich A, et al. Cohort profile update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. Body composition, mental health and genetic assessment at the 6 years follow-up. *Int J Epidemiol* 2014;(1464-3685 (Electronic))doi:10.1093/ije/dyu144
29. López-Domínguez L, Bourdon C, Hamilton J, et al. Childhood growth trajectory patterns are associated with the pubertal gut microbiota. *medRxiv.* 2023:2023.06.20.23291663. doi:10.1101/2023.06.20.23291663
30. Carpena MX, Barros AJ, Comelli EM, et al. Accelerometer-based sleep metrics and gut microbiota during adolescence: Association findings from a Brazilian population-based Birth cohort. *Sleep Medicine.* 2024;(1878-5506 (Electronic))doi:10.1016/j.sleep.2023.12.028
31. Caporaso JG, Lauber C, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 2012;6(1751-7370 (Electronic))(8)doi:[10.1038/ismej.2012.8](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8)
32. Kozich JJ, Si W, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *App Environ Microbiol.* 2013;79(1098-5336 (Electronic))(17)doi:[10.1128/aem.01043-13](https://doi.org/10.1128/aem.01043-13)
33. Edgar RC. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *bioRxiv.* 2016:081257. doi:10.1101/081257
34. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods.* 2013/10/01 2013;10(10):996-998. doi:10.1038/nmeth.2604
35. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* 2016;(2167-8359 (Print))doi:10.7717/peerj.2584
36. Wang Q, G.M. G, J.M. T, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *App Environ Microbiol.* 2007;(0099-2240 (Print))doi:10.1128/AEM.00062-07
37. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology.* 2019/08/01

2019;37(8):852-857. doi:10.1038/s41587-019-0209-9

38. Hughes DA, Bacigalupe R, Wang J, et al. Genome-wide associations of human gut microbiome variation and implications for causal inference analyses. *Nature*. 2020;(2058-5276 (Electronic))
39. Oren A, Garrity GM. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021;71(10)doi:10.1099/ijsem.0.005056
40. Schneider BC, Motta JVdS, Muniz LC, et al. Desenho de um questionário de frequência alimentar digital autoaplicado para avaliar o consumo alimentar de adolescentes e adultos jovens: coortes de nascimentos de Pelotas, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2016;19
41. Pinheiro ABV, Lacerda EMdA, Benzecry EH, Gomes MCdS, Costa VMd. *Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras*. 5ª ed. Atheneu; 2008.
42. Ultra-processed foods, diet quality, and health using the NOVA classification system (FAO) 48p (2019).
43. Costa CdS, Assunção MCF, Loret de Mola C, et al. Role of ultra-processed food in fat mass index between 6 and 11 years of age: a cohort study. *International Journal of Epidemiology*. 2020;50(1):256-265. doi:10.1093/ije/dyaa141
44. Xia Y, Sun J. Statistical Testing of Beta Diversity. *Bioinformatic and Statistical Analysis of Microbiome Data: From Raw Sequences to Advanced Modeling with QIIME 2 and R*. Springer; 2023:397-433.
45. Shikany JM, Demmer RT, Johnson AJ, et al. Association of dietary patterns with the gut microbiota in older, community-dwelling men. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2019;110(1938-3207 (Electronic))(4)
46. Malinowska AM, Kok DE, Steegenga WT, Hooiveld GJ, Chmurzynska A. Human gut microbiota composition and its predicted functional properties in people with western and healthy dietary patterns. *European journal of nutrition*. 2022;61(8):3887-3903. doi:10.1007/s00394-022-02928-6
47. Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science*. 2016;(1095-9203 (Electronic))doi:10.1126/science.aad3369
48. Travinsky-Shmul T, Beresh O, Zaretsky J, et al. Ultra-Processed Food Impairs Bone Quality, Increases Marrow Adiposity and Alters Gut Microbiome in Mice. *Foods*. 2021;10(12):3107.
49. Zafar H, Saier MHJ. Gut Bacteroides species in health and disease. *Gut Microbes*. 2021;(1949-0984 (Electronic))doi:10.1080/19490976.2020.1848158
50. Leite AZ, Rodrigues NC, Gonzaga MI, et al. Detection of Increased Plasma Interleukin-6 Levels and Prevalence of *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus* in the Feces of Type 2 Diabetes Patients. *Front Immunol*. 2017;(1664-3224 (Print))doi:10.3389/fimmu.2017.01107
51. Xu Z, Jiang W, Huang W, Lin Y, Chan FKL, Ng SC. Gut microbiota in patients with obesity and metabolic disorders — a systematic review. *Genes & Nutrition*. 2022/01/29 2022;17(1):2. doi:10.1186/s12263-021-00703-6
52. Deli CK, Fatouros IG, Poullos A, et al. Gut Microbiota in the Progression of Type 2 Diabetes and the Potential Role of Exercise: A Critical Review. *Life*. 2024;14(8):1016. doi:10.3390/life14081016
53. Vilela S, Magalhães V, Severo M, Oliveira A, Torres D, Lopes C. Effect of the food processing degree on cardiometabolic health outcomes: A prospective approach in childhood. *Clinical Nutrition*. 2022/10/01/ 2022;41(10):2235-2243. doi:[10.1016/j.clnu.2022.07.034](https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.07.034)
54. Radjabzadeh D, Boer CG, Beth SA, et al. Diversity, compositional and functional differences between gut microbiota of children and adults. *Scientific Reports*. 2020/01/23 2020;10(1):1040. doi:10.1038/s41598-020-57734-z
55. Porro M, Kundrotaitė E, Mellor DD, Munialo CD. A narrative review of the functional components of human breast milk and their potential to modulate the gut microbiome, the

consideration of maternal and child characteristics, and confounders of breastfeeding, and their impact on risk of obesity later in life. *Nutrition Reviews*. 2022;81(5):597-609. doi:10.1093/nutrit/nuac072

56. Khandpur N, Cediel G, Obando DA, Jaime PC, Parra DC. Sociodemographic factors associated with the consumption of ultra-processed foods in Colombia. *Rev Saude Publica*. 2020;25(1518-8787 (Electronic))doi:10.11606/s1518-8787.2020054001176

57. Beslay M, Srour B, Méjean C, et al. Ultra-processed food intake in association with BMI change and risk of overweight and obesity: A prospective analysis of the French NutriNet-Santé cohort. *PLoS Med*. 2020;17(8)(1549-1676 (Electronic))doi:10.1371/journal.pmed.1003256

58. Chavez-Ugalde IY, de Vocht F, Jago R, Adams J, Ong KK, Forouhi NG, et al. Ultra-processed food consumption in UK adolescents: distribution, trends, and sociodemographic correlates using the National Diet and Nutrition Survey 2008/09 to 2018/19. *Eur J Nutr* 2024; 63:2709-23.

59. Cui Q, Xia Y, Wu Q, Chang Q, Niu K, Zhao Y. A meta-analysis of the reproducibility of food frequency questionnaires in nutritional epidemiological studies. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*. 2021/01/11 2021;18(1):12. doi:10.1186/s12966-020-01078-4

ARTIGO 2

Submetido na revista Journal of Psychiatric Research

**Host genetics and gut microbiome associations: Implications for the Gut-Brain Axis in
Brazilian adolescents from the 2004 Pelotas Birth Cohort**

Etiene Dias Alves - MD, PhD student in the Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; etienediasnutri@gmail.com; 5553991194196; ORCID 0000-0002-1185-8972;

Marina Xavier Carpena - PhD, Post Doctoral Research Fellow in Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; marinacarpa_@hotmail.com; ORCID 0000-0002-4690-5791;

Laísa Camerini – PhD, Post Doctoral Research Fellow in the Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; lcamerinidarosa@gmail.com; ORCID 0000-0002-4811-7887;

Dulcinéa Blum-Menezes - PhD, Full Professor in the Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Pelotas, RS, Brazil; dulceblumen@gmail.com; ORCID 0000-0002-3484-8216;

Iná S. Santos - PhD, Full Professor in the Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; inasantos.epi@gmail.com; ORCID 0000-0003-1258-9249;

Alicia Matijasevich - PhD, Associate Professor in the Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ORCID 0000-0003-0060-1589;

Elena M Comelli - PhD, Associate Professor in the Department of Nutritional Sciences, Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, ON, Canada. Joannah and Brian Lawson Centre for Child Nutrition, Faculty of Medicine, University of Toronto, ON, Canada; ORCID 0000-0002-5201-5437;

Robert H J Bandsma - Department of Nutritional Sciences, Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, ON, Canada. Translational Medicine Program, Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada; ORCID 0000-0001-6358-4750;

Lorena López-Domínguez - PhD, Researcher in the Department of Nutritional Sciences, Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, ON, Canada; Translational Medicine Program, Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada; ORCID 0000-0002-5889-3986;

Isabel Oliveira de Oliveira – PhD, Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; ORCID 0000-0002-0068-0806;

Maria Carolina Borges - PhD, Senior Lecturer at the MRC Integrative Epidemiology Unit at the University of Bristol, Bristol, UK; Population Health Sciences, Bristol Medical School, University of Bristol, Bristol, UK. m.c.borges@bristol.ac.uk. ORCID 0000-0001-7785-4547;

Luciana Tovo-Rodrigues - PhD, Associate Professor in the Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. luciana.tovo@gmail.com. ORCID 0000-0002-8732-6059.

Correspondence

E. D. Alves

Universidade Federal de Pelotas.

Present address: Rua Marechal Deodoro 1160, Pelotas, RS 96050-500, Brasil.

etienediasnutri@gmail.com

Contributors: EMC, RHJB, ISS, AM, LLD, MCB, DBM, and LTR were responsible for conceptualization, methodology and supervision the search; EDA, MXC, MCB, DBM and LTR contributed for methodology and the investigation; EDA, LC, MXC, DBM and LTR contributed for analyzing data and interpreting results; and EMC, RHJB, ISS, AM, EDA, LC, MXC, MCB, DBM and LTR writing, review and editing the report. All authors read and approved the final manuscript.

Abstract

The intricate interplay between metabolic pathways, gut microbiota, and genetic variants plays a vital role in human health, particularly in the context of the gut-brain axis. This study aimed to replicate findings from Genome-Wide Association Studies (GWAS) in a Brazilian adolescent population derived from the 2004 Pelotas Birth Cohort. We analyzed 338 participants using 16S ribosomal RNA gene sequencing on fecal samples collected at age 12 years. Nineteen single nucleotide polymorphisms (SNPs), identified as top hits in GWAS, were assessed for their associations with gut microbiota composition through logistic and linear models, adjusted for sex and ten principal components of ancestry. Among the variants, the rs736744 SNP in the *NTRK2* gene demonstrated an association with the presence of the genus *Oxalobacter* (OR = 0.59; 95% CI: 0.35–0.99). However, this association did not retain statistical significance after correction for multiple comparisons. In silico functional analysis indicated that this variant is situated within enhancer-promoter regions in the brain and exhibits histone modifications in the fetal intestine. Furthermore, network analysis revealed enrichment nervous system function, immune and inflammatory response. Overall, our findings suggest a potential link between the *NTRK2* gene and *Oxalobacter* in the context of the gut-brain axis, highlighting the need for further research to explore the underlying biological mechanisms and their implications for adolescent health.

Key-words: Gut microbiota; Adolescents; Genetic Variants; Operational Taxonomic Units (OTU); 16S rRNA.

Highlights:

- Gut-Brain Axis Connection
- *NTRK2* Gene and *Oxalobacter* Association
- Functional and Network Analysis Insights

INTRODUCTION

The gut microbiota is a complex community of microorganisms that colonizes the gastrointestinal tract, exhibiting vast qualitative diversity and exerting significant influence on human health and metabolism (Neish, 2009). Recent studies have highlighted associations between gut microbiota composition and various health conditions and diseases, including cardiovascular diseases, inflammatory disorders, immune dysregulation, obesity, diabetes mellitus, and neurodegenerative disorders, mediated through the gut-brain axis (Lukáčová, Ambro, Dubayová, & Mareková, 2023; Michels et al., 2022; Mulder, Aarts, Arias Vasquez, & Bloemendaal, 2023). Thus, understanding the factors that influence gut microbiota composition and the effects of these changes is important for clarifying disease development.

Several environmental factors shape microbiota composition, such as delivery method (vaginal or cesarean), breastfeeding practices, sex, age, diet, body composition, and medication use (Hopkins, Sharp, & Macfarlane, 2002; Turnbaugh et al., 2009). While the importance of environmental influences on gut microbiota composition is well established (Gacesa et al., 2022), growing evidence indicates that host genetics also play a significant role (Blekhman et al., 2015; Goodrich et al., 2016). Understanding the interplay between host genetics and gut microbiota is essential for elucidating the underlying mechanisms that link microbiota to human health, including their implications for mental health and behavior.

Genome-wide association studies (GWAS) have demonstrated the impact of host genetics on gut microbiota composition. These studies serve as powerful tools for identifying genetic variants associated with specific bacterial taxa, providing knowledge into the genetic architecture of the host and the molecular mechanisms that influence gut microbiota composition (Bonder et al., 2016; Hughes et al., 2020; Kurilshikov et al., 2021; Lopera-Maya et al., 2022; Rühlemann et al., 2021; Scepanovic et al., 2019). Although several *loci* were not replicated in the different studies, among those reported, genetic variants in the vicinity of *LCT* (Lactase) and *ABO* (Alpha 1-3-N-Acetylgalactosaminyltransferase and Alpha 1-3-

Galactosyltransferase) were replicated (Goodrich et al., 2016; Kurilshikov et al., 2021; Lopera-Maya et al., 2022). They were associated respectively with the genus *Bifidobacterium* and several others genus including *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Faecalicatena*, *Collinsella*, and *Bifidobacterium* (Goodrich et al., 2016; Kurilshikov et al., 2021; Lopera-Maya et al., 2022). A recently published multi-ancestry GWAS involving 18,340 individuals (comprising children and adults) from 24 cohorts identified 31 loci influencing 38 distinct microbiome taxa (Kurilshikov et al., 2021). Functional analyses revealed an enrichment of microbiota traits associated with genes expressed in both the terminal ileum and critical brain regions, including the substantia nigra and putamen. Additionally, a higher relative abundance of specific microbial taxa was correlated with phenotypes related to metabolic regulation, particularly those associated with obesity. These findings highlight the intricate relationships among gut microbiota, metabolic processes, and neurobiological functions, emphasizing the importance of understanding the gut-brain axis in health and disease.

However, most GWAS have primarily focused on adult populations of European descent in high-income countries (Hughes et al., 2020; Lopera-Maya et al., 2022; Rühlemann et al., 2021; Scepanovic et al., 2019), leaving a significant gap in scientific evidence for the majority of the global population. Investigating the role of host genetic factors in diverse populations is essential for understanding the molecular mechanisms governing changes in gut microbiome composition. First, variations in linkage disequilibrium patterns across diverse ancestral populations can enhance the identification of causal variants and genes influencing gut microbiota. Second, studying populations with varying geographical locations and demographic characteristics may aid in identifying environmental factors, such as diet, that could modify the effects of host genetics on microbiota composition (Gacesa et al., 2022; Patel, Patel, Chakraborty, & Gosai, 2023).

In addition to genetic variants, epigenetic mechanisms—such as DNA methylation and histone modifications—may also influence gut microbiota composition by modulating host gene expression related to immunity, epithelial barrier function, and microbial sensing (Bashiardes, Zilberman-Schapira, & Elinav, 2016; Stiemsma & Michels, 2018). These mechanisms are

responsive to environmental exposures, including diet, antibiotic use, and early-life colonization, and may partially mediate the effects of such exposures on microbial communities. Given that adolescence is a period of dynamic epigenetic remodeling, incorporating epigenetic perspectives may enhance the understanding of host–microbiome interactions.

This study seeks to assess whether the results from the most extensive gut microbiota GWAS are replicated in adolescents from a Brazilian population-based birth cohort, while offering functional information to deepen our understanding of the identified associations.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Participants

The 2004 Pelotas Birth Cohort (Brazil) is a longitudinal, population-based, and prospective study. It included all births that occurred in the urban area of the municipality, from January 1 to December 31, 2004, totaling 4,231 newborns in the perinatal period (Santos et al., 2011; Santos et al., 2014). All participants were reassessed at the ages of 3 months (n=3,985; 95.7% retention), 12 months (n=3,907; 94.3%), 24 months (n=3,869; 93.5%), 48 months (n=3,799; 92.0%), 6 years (n=3,722; 90.2%), 11 years (n=3,566; 86.6%), 15 years (n=1,949; 48.5%), and 18 years (n=3,489; 85.0%) (Santos et al., 2014; Tovo-Rodrigues et al., 2023). For the present study, we included in the analysis the participants with data of gut microbiota from a subsample collected at 12 years old and genetic information, obtained from saliva samples collected at 6 years old. More details about these data and participants are described below.

Subsample Selection

In 2017, cohort participants were invited to take part in a sub-study of the gut microbiome. For this, a stratified sample based on anthropometric characteristics, and composed by participants born between September and December 2004 was selected (Peres et al., 2014).

A random subsample was selected from 1,303 adolescents in the cohort. From this group, a stratified sampling strategy was employed selected within strata of body mass index (BMI) for

age z-scores across the whole distribution of BMI. Exclusion criteria included severe cognitive impairment, pregnancy, or having given birth within six months prior to the interview. A total of 497 adolescents were randomly selected, and 409 were invited to participate in the microbiome sub-study. Ultimately, stool samples were collected from 366 participants, yielding a follow-up rate of 75.6%. Further details on the sampling procedures are available in previous (Carpena et al., 2024; López-Domínguez et al., 2023).

In the interview from substudy, trained interviewers administered a questionnaire on health, socioeconomic, and demographic issues besides biological sample collection. The interviews at 6 years of age were conducted at the Epidemiological Research Center of the Federal University of Pelotas (UFPel), and the interviews for the sub-study took place at the participant's residence.

Genotype data

At the age of 6, saliva sample was collected from the participants using the commercial DNA Oragene Genotek® – 250 kit (Santos et al., 2014). Genomic DNA was extracted following the manufacturer's instructions. DNA samples were genotyped using the Infinium Global Screening Array 2 (Illumina). Quality control of SNPs and samples was conducted in six steps using the PLINK software v1.9. The steps were as follows: 1) Removal of markers and individuals with 2% or more missing data; 2) Check for sex inconsistency based on the estimated F value: males > 0.8 and females < 0.2 ; 3) Removal of markers from non-autosomal chromosomes and those with a minor allele frequency (MAF) below 1%; 4) Removal of markers not in Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) with a *p-value* $> 1 \times 10^{-6}$; 5) Removal of individuals with a high or low heterozygosity rate (± 3 standard deviations); 6) Removal of individuals with a high degree of relatedness (kinship coefficient > 0.2). After filtering the genotyped dataset according to quality control standards, the imputation process was carried out based on Phase 3 of the 1000 Genomes Project as a reference panel (McVean et al., 2012), using SHAPEIT 2 (O'Connell et al., 2014), and MINIMAC3 (Delaneau, Zagury, & Marchini, 2013). After imputation, autosomal variants were filtered to include only those with less than 2%

missing genotypes, a minor allele frequency of at least 0.01, an imputation quality (r^2) greater than 0.3, and a Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) p-value greater than 1×10^{-6} . Following the application of these quality control filters, 11,811,746 variants were retained.

Gut Microbiota data

One stool sample was collected at home, where the participants received collection instructions by the research team. DNA extraction, sequencing, annotation and provision of bioinformatics data were performed at the Centre for the Analysis of Genome Evolution & Function (CAGEF) at University of Toronto. Out of the 366 samples collected, one could not be shipped to Canada due to ethical authorization issues with the participant, and another failed during amplification and sequencing, leaving a total of 364 samples available for analysis. Briefly, DNA was extracted using the ZymoBIOMICS DNA Miniprep kit, the V3-V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was sequenced on the Illumina MiSeq system and the Operational Taxonomic Units (OTU) sequences were identified in QIIME1 (Caporaso et al., 2012).

For quality control, were included a single-species sample (*Pseudomonas aeruginosa* DNA), a mock community (Zymo Microbial Standard), and a negative control without template DNA (Edgar, 2013, 2016). Sequence data were processed using the UNOISE pipeline in USEARCH v11.0.667 and search v2.10.4. Operational Taxonomic Units (OTU) were assigned at 99% identify, and taxonomy was conducted using the Ribosomal Database Project (RDP) database version 16 (Wang, Garrity, Tiedje, & Cole, 2007), with a confidence threshold of 0.8. The comprehensive protocol are described elsewhere (López-Domínguez et al., 2023).

To calculate the relative abundance from the OTUs observed in the sample, each OTU's count was divided by the sum of all OTU counts in a given sample and multiplied by 100. To operationalize the microbiota variables, previously published methodology was used (Hughes et al., 2020). Briefly, to address the challenge posed by a high prevalence of zeros prominent in microbiota data, which can complicate linear modeling and data transformation, we calculated the zero proportion for each taxon. Taxa with more than 5% of zeros were analyzed for

presence/absence associations in a binary model using hurdle analysis, where non-zero counts were transformed into 1. Taxa with at least 95% of observations were analyzed using their relative abundance in a quantitative model, and transformed using inverse rank-based transformation, using the `qnorm` function of the R software version 2024.04.2+764 (<https://www.r-project.org/>). The data from the quantitative model was incorporated in the regression models as continuous values.

Data Analyses

Selection of SNPs and gut microbiota traits from GWAS

We used the largest available GWAS database to select SNPs and gut microbiota traits to further investigate in our study. The reference GWAS sample was composed of 18,340 individuals from 24 cohorts. These individuals were of predominant European ancestry (75% Europeans and 25% from other ancestries - multi ancestry cohorts, East Asian, Afro Americans, Hispanics, and Middle East) and average ages between 4 and 62 years old. Among the cohorts included, seven distinct fecal DNA extraction methods were utilized alongside three different regions of the 16S rRNA gene (v1-v2, v3-v4, and v4). The taxonomy assignment was conducted using the SILVA database (release 128) at the genus level (Quast et al., 2013).

The SNPs reported as significantly associated with one or more microbiota traits in the reference GWAS sample (N=31 SNPs, $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$) (Kurilshikov et al., 2021) were selected for analysis in our study. All SNPs were successfully identified in the 2004 Pelotas Birth Cohort dataset. Taxa reported by the reference GWAS but absent from the 2004 Pelotas dataset (N=12) were excluded from the analyses. The inclusion criteria justification is detailed in Supplementary Table 1. Notably, for a bacterium previously classified as belonging to the genus *Erysipelatoclostridium* by Yutin and Galperin (2014), we identified an equivalent genus *Clostridium XVIII* and incorporated it in our analyses. Following the exclusion criteria, a total of 19 comparisons (SNPs vs. taxa) were included, as outlined in Supplementary Table 1.

Statistical Analyses

We employed linear and logistic regression models, under additive genetic model, to assess the associations between SNPs and both continuous variables (i.e., relative abundance traits, quantitative traits) and dichotomous variables (presence/absence traits), respectively. These association analyses were conducted utilizing PLINK software, version 1.90 (Purcell et al., 2007), adjusting for sex and ten principal components of ancestry to correct for population stratification. For the association analysis, sex and the first ten principal components of ancestry, that explaining as much of the total variance as possible, were included as covariables in adjusted analyses to correct for population stratification. Principal component analysis (PCA) was based on the whole genomic dataset and was performed used PLINK software (Purcell et al., 2007). Statistical significance was defined as a p-value < 0.05, indicating suggestive significance. To address the issue of multiple testing, a False Discovery Rate (FDR) (Benjamini & Hochberg, 1995) of 0.05 was applied.

In silico Functional Analyses

To provide further insight into the putative regulatory function significant or nominally significant variant in this study, we assessed Regulome DB v2.2 (35) (Dong et al., 2023) and HaploReg v4.2 – Broad Institute (Ward & Kellis, 2012). The assembly GRCh37 was used as a reference. Gene annotation was obtained from National Center for Biotechnology Information (NCBI) at the address: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. RegulomeDB v2.2 is a database that integrates a large collection of regulatory information from SNPs with known and predicted regulatory elements derived from genomic sequencing or GWAS studies. The RegulomeDB v2.2 variant classification refers to the supporting evidence for a given location or variant: the more supporting data is available, the more likely it is to be functional and therefore receive a higher score (with 1 being highest and 7 being lowest score) (Dong et al., 2023). HaploReg v4.2 is a tool for exploring annotations of the noncoding genome in variants, chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations. Information on the chromatin state and protein

binding annotation from the Roadmap Epigenomics and The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) projects are functional evidence integrated in this dataset (Ward & Kellis, 2012). Gene protein, RNA expression and tissues expression data were collected through the Human Protein Atlas (Sjöstedt et al., 2020) database.

Protein-protein Interaction Network

To further investigate the biological role of the associated or nominally associated gene, we constructed a protein-protein interaction (PPI) network using the STRING database v12.0 (Szklarczyk et al., 2023). The gene ID (homo sapiens) was designated as the seed gene, and interactions were selected based on high-confidence evidence from curated databases and experimental data, applying a medium confidence threshold (0.4). The analysis was confined to a maximum of 20 first-shell interactors to prioritize biologically relevant connections while minimizing noise.

To explore the functional implications of the PPI network, we conducted functional enrichment analysis, identifying significantly overrepresented biological processes and KEGG pathways. Enrichment significance was assessed using an FDR of ≤ 0.05 , with an enrichment strength cutoff of ≥ 0.01 and a minimum of three genes required per term. In parallel, we applied k-means clustering to the PPI network to identify distinct functional modules, facilitating the investigation of specific clusters of interactions potentially relevant to the gene's biological context.

Ethical Aspects

The 2004 Pelotas Birth Cohort follow-ups were approved by the Research Ethics Committee of School of Medicine at the Federal University of Pelotas (1.896.438) and by the National Research Ethics Committee (CONEP) of the Ministry of Health (2.372.760). DNA analyses with genomic data were approved by CONEP (2.556.542). The participants' mothers or guardians signed the informed consent form at each follow-up and the adolescent, the assent

form. The microbiome sub study was approved by the University of Toronto's Protocol #: 00036176) and the Hospital for Sick Children Research Ethics Board (1000059180).

The study was registered at the National (Brazilian) System for Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge Management (SisGen) under protocol IDs A0C82E7 and R79C01C.

RESULTS

The sample comprises 338 participants with both genomic information and valid microbiota sequencing data. Table 1 provides details on the maternal and individual characteristics of these participants. Predominantly, the included participants were white (66.9%) and male (51.5%). Most adolescents were delivered vaginally (50.9%), had birth weights ranging from 2,500 to 3,499 grams (61.8%), and were born to mothers aged between 25 and 34 years at delivery (65.7%). Overall, participants' characteristics were similar between the subsample and the remaining cohort, except for slight differences in the distribution of skin color ($p = 0.025$).

Table 2 lists taxa incorporated into the analysis, specifying the model utilized for each and their distribution within the sample. Within the binary model, the most prevalent taxon was the genus *Odoribacter* ($N = 313$; 92.6%), while the least prevalent was the genus *Oxalobacter* ($N = 32$; 9.5%).

Table 3 displays the results of linear and logistic regression models investigating the association between host SNPs and gut microbiota taxa. Our findings revealed an association between variant rs736744 and the presence of the genus *Oxalobacter*. Specifically, the C allele of this SNP was associated with a reduced odds of having the *Oxalobacter* (OR = 0.59, 95% CI 0.35; 0.99) compared to the T allele. However, following corrections for multiple testing, this association did not retain statistical significance.

In silico Functional analyses

This variant is located within an intronic region of the *NTRK2* (Neurotrophic Receptor

Tyrosine Kinase 2) gene on chromosome 9. In silico analyses showed that rs736744 is located in a region marked by enhancer histone modifications in neuron-cultured cells and brain regions according to HaploReg. Additionally, this region shows DNase accessibility in the fetal adrenal gland and exhibits histone modifications in the fetal intestine, suggesting potential regulatory roles in these tissues (Supplementary Table 2 and 3). RegulomeDB assigns a rank of 5 to this variant, indicating minimal evidence of functionality.

Protein-Protein Interaction Network

The PPI network revealed that *NTRK2* interacts with numerous proteins involved in a diverse range of biological processes (Figure 1). Table 4 and Supplementary Table 4 and 5 provide a detailed summary of the key enriched biological processes within the network. Processes implicated in nervous system function were prominent, particularly the nerve growth factor signaling pathway. Additional processes involved in immune function and inflammatory responses were also identified, including the B-cell receptor signaling pathway and phagocytosis, as well as metabolic processes, such as insulin signaling and the regulation of feeding behavior.

KEGG pathway enrichment analysis uncovered a wide array of pathways associated with the *NTRK2* network, including neurotrophins signaling, bacterial invasion of epithelial cells, growth factor signaling, hormone production, cytotoxicity, inflammatory responses, alcohol metabolism and insulin regulation (Table 4 and Supplementary Table 4 and 5).

The clustering analysis revealed three principal modules within the network. The first cluster was predominantly associated with the neurotrophins signaling pathway, driven by transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity involving SH2 domain interactions. The second cluster was also related to neurotrophins signaling, specifically through *NTRK2*-mediated activation of *PLCG1* signaling. The third cluster involved interactions with *ADORA2A*, implicating adenosine receptor signaling in the network's broader regulatory landscape.

DISCUSSION

This study investigated whether variants identified as genome-wide significant in the largest GWAS published to date were also evident in a cohort of Brazilian adolescents derived from the 2004 Pelotas Birth Cohort Study. Our findings indicate that certain SNPs, specifically the rs736744 variant in the *NTRK2* gene, might influence the gut microbiota of Brazilian adolescents, particularly regarding the genus *Oxalobacter*. Although we observed a nominal association, these findings suggest broader implications, highlighting the complex interactions between the gut microbiome and brain function, known as the gut-brain axis.

The *Oxalobacter* genus, within the phylum *Pseudomonadota* (formerly *Proteobacteria*), consists of oxalate-degrading bacteria essential for preventing kidney stone formation by limiting oxalate absorption (Ticinesi, Nouvenne, & Meschi, 2019). Oxalate, an antinutrient that complexes with calcium, is regulated by intestinal and renal mechanisms, with commensal bacteria like *Oxalobacter* playing a key role in its degradation (Hatch, 2017). Elevated systemic oxalate levels significantly increase the risk of nephrolithiasis, underscoring the importance of oxalate homeostasis (Holmes, Goodman, & Assimos, 2001). Moreover, elevated oxalate levels are linked to oxidative stress and inflammation (Wilson et al., 2018), suggesting that *Oxalobacter*-mediated oxalate degradation could mitigate general inflammatory effects.

The rs736744 variant is situated within the *NTRK2* gene, which encodes a receptor of the neurotrophic tyrosine kinase family. Upon neurotrophin binding, this membrane-bound receptor activates via autophosphorylation and triggers the MAPK pathway, promoting cell differentiation and playing critical roles in neurogenesis, axon growth, and dendritic development. Although *NTRK2* is predominantly expressed in the brain, it is also present across a variety of tissues and cell types throughout the body (Kawamura et al., 2009), including fetal intestine, indicating potential modulation of gene expression during development, as suggested by our *in silico* analyses. Our network analysis indicates that the observed association between *NTRK2* and the bacterial genus *Oxalobacter* may point to a multifaceted interaction, mainly linked with nervous system. The identification of immune-related pathways, including the B-cell receptor signaling pathway and phagocytosis, highlights *NTRK2*'s role in modulating immune cell activity and inflammatory responses. This aligns with accumulating evidence that

neurotrophic factors, such as those mediated by *NTRK2*, play an integral role in immune system regulation, one of the potential signaling pathways of gut-brain axis (Muhammad et al., 2022). The immune system, particularly B cells, plays a vital role in the gut-brain axis by enabling communication between gut microbiota and the central nervous system. B cells produce antibodies and signaling molecules that can influence neuroinflammation, thereby affecting brain function and behavior (Ahn, Abu-Rub, & Miller, 2021). Therefore, dysregulation of B cell activity in the gut may disrupt the microbiome and contribute to mental health issues through mechanisms involving the gut-brain axis.

Neurotrophic factors mediated by *NTRK2* have been implicated in various aspects of cognitive function, emotional regulation, and neurodevelopmental disorders (Ibrahim et al., 2022). This suggests that variations in *NTRK2* may not only affect gut microbiota composition but also indirectly influence brain health and behavior. Our research aligns with existing literature that has established a connection between the gut microbiome and psychiatric disorders, as well as substance use disorders and obesity—two conditions that are closely linked to mental health problems (Mulder et al., 2023; Schür et al., 2016). Functional enrichment analyses of PPI networks underscore the role of *NTRK2* as a potential mediator of neurotrophin signaling, insulin regulation, and inflammatory responses, further implicating it in immune and metabolic processes. The observed association between *NTRK2* and the bacterial genus *Oxalobacter* suggests a regulatory pathway that may influence immune responses, neural function, and hormonal balance, ultimately impacting complex mechanisms underlying metabolic and immune dysregulation. For instance, *NTRK2* has been significantly associated with traits such as alcohol consumption and BMI regulation. GWAS of adult European populations demonstrate a strong link between *NTRK2* and increased alcohol intake (Saunders et al., 2022). Excessive alcohol consumption leads to gut dysbiosis, disrupting the balance of beneficial bacteria and elevating public health risks by contributing to chronic disease and increased healthcare costs (Chen et al., 2022; Getachew et al., 2024). *NTRK2* also plays a role in BMI regulation, as evidenced by GWAS across diverse populations, including Japanese, and Europeans (Akiyama et al., 2017; Zhu et al., 2020). Elevated BMI is linked to chronic low-

grade inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia, all of which alter gut microbiota composition (Huby et al., 2015; Qin et al., 2012). Furthermore, the involvement of *NTRK2* in neuropsychiatric disorders suggests its influence on gut-brain axis. *Oxalobacter formigenes*, a key species in the genus, synthesizes neuroactive compounds such as gamma-aminobutyric acid (GABA), whose dysregulation is implicated in psychiatric conditions like schizophrenia, ADHD, and depression (Schür et al., 2016).

Despite our study highlighting a potential role of *NTRK2* on *Oxalobacter* abundance, the opposite direction of effect compared to previous findings warrants attention. Earlier research (Kurilshikov et al., 2021) reported an increase in *Oxalobacter* abundance associated with the C allele, whereas our results suggest the opposite direction. The observed discrepancy may stem from differences in age demographics, with our adolescent cohort potentially exhibiting distinct gut microbiota profiles compared to adult populations. These variations could be influenced by developmental factors, dietary habits, and environmental contexts, particularly considering the disparities between high- and middle-income countries. Additionally, methodological differences in sample size and variable definitions may account for the differences in findings. However, both studies collectively emphasize the significance of *NTRK2* in shaping gut microbiota composition and, consequently, its implications for the gut-brain axis.

This study presents several strengths. It stands as one of the pioneering investigations exploring the relationship between genetic variants and gut microbiota composition among Brazilian adolescents participating in a population-based cohort study. Second, considering the limited research on the gut microbiome in adolescents, this study aims to fill an important gap in the literature. Third, the functional analyses enhance the depth and comprehensiveness of the findings. Finally, by presenting evidence from populations with diverse ancestry composition, this study contributes valuable insights to the field, increasing the variability in the current knowledge.

Our findings should be interpreted in the context of certain limitations. One primary limitation of this study arises from methodological differences between our investigation and

the reference GWAS. Specifically, discrepancies in taxonomy classification resulted in the exclusion of several comparisons. Another limitation concerns the operationalization of variables. While the reference study employed log transformation, we utilized inverse rank transformation, as previously described (Hughes et al., 2020). Although adjustments were made for variable distributions to accommodate linear regressions, these methodological differences may introduce variability in the results. Additionally, the relatively modest sample size represents a constraint, potentially limiting our ability to detect associations identified in the GWAS meta-analysis. Nevertheless, despite its size, our sample exceeds that of many studies conducted in Latin American countries. Furthermore, studies in mixed-ancestry populations are burgeoning, promising to enrich the scientific literature in this field. Lastly, our study sample comprises a subset of the 2004 Pelotas birth cohort, which may exhibit unique characteristics compared to the original cohort. However, upon analysis, differences were related to variations in skin color compared to entire cohort participants. To address potential population stratification, we integrated PCA into our association analyses.

In conclusion, our investigation into the relationship between gut microbiota composition and genetic variants suggests a nuanced role for genetic factors in shaping microbiota, with a nominal association between the *NTRK2* gene and *Oxalobacter*. These findings highlight the potential interactions within the gut-brain axis, emphasizing the need for future research with larger samples and refined methodologies to elucidate the complex interplay between genetics, gut microbiota, and brain health. By advancing our understanding of these relationships, we may identify novel targets for interventions aimed at improving mental health and cognitive function through dietary and microbiome-based approaches.

References

- Ahn, J., Abu-Rub, M., & Miller, R. H. (2021). B Cells in Neuroinflammation: New Perspectives and Mechanistic Insights. *Cells*, *10*(7)(2073-4409 (Electronic)). doi:10.3390/cells10071605
- Akiyama, M., Okada, Y., Kanai, M. A.-O., Takahashi, A. A.-O., Momozawa, Y., Ikeda, M., . . . Kamatani, Y. A.-O. (2017). Genome-wide association study identifies 112 new loci for body mass index in the Japanese population. *Nat Genet.*, *49*(10)(1546-1718 (Electronic)). doi:10.1038/ng.3951
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. *J. Royal Statist. Soc., Series B*, *57*, 289-300. doi:10.2307/2346101
- Blekhman, R., Goodrich, J. K., Huang, K., Sun, Q., Bukowski, R., Bell, J. T., . . . Clark, A. G. (2015). Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology*, *16*(1), 191. doi:10.1186/s13059-015-0759-1
- Bonder, M. J., Kurilshikov, A., Tigchelaar, E. F., Mujagic, Z., Imhann, F., Vila, A. V., . . . Zhernakova, A. (2016). The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nature Genetics*, *48*(11), 1407-1412. doi:10.1038/ng.3663
- Caporaso, J. G., Lauber, C. I., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., . . . Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. (1751-7370 (Electronic)). doi:10.1038/ismej.2012.8
- Carpena, M. X., Barros, A. J., Comelli, E. M., López-Domínguez, L., Alves, E. D., Wendt, A., . . . Tovo-Rodrigues, L. (2024). Accelerometer-based sleep metrics and gut microbiota during adolescence: Association findings from a Brazilian population-based birth cohort. *Sleep medicine*(1878-5506 (Electronic)). doi:10.1016/j.sleep.2023.12.028
- Chen, G., Shi, F., Yin, W., Guo, Y., Liu, A., Shuai, J., & Sun, J. (2022). Gut microbiota dysbiosis: The potential mechanisms by which alcohol disrupts gut and brain functions. *Frontiers in Microbiology*, *13*. doi:10.3389/fmicb.2022.916765
- Delaneau, O., Zagury, J. F., & Marchini, J. (2013). Improved whole-chromosome phasing for disease and population genetic studies. *Nature Methods*, *10*(1)(1548-7105 (Electronic)). doi:10.1038/nmeth.2307
- Dong, S., Zhao, N., Spragins, E., Kagda, M. S., Li, M., Assis, P., . . . Hitz, B. C. (2023). Annotating and prioritizing human non-coding variants with RegulomeDB v.2. *Nature Genetics*, *55*(5), 724-726. doi:10.1038/s41588-023-01365-3
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, *10*(10), 996-998. doi:10.1038/nmeth.2604
- Edgar, R. C. (2016). UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *bioRxiv*, 081257. doi:10.1101/081257
- Freidin, M. B., Stalteri, M. A., Wells, P. M., Lachance, G., Baleanu, A. F., Bowyer, R. C. E., . . . Williams, F. M. K. (2020). An association between chronic widespread pain and the gut microbiome. *Rheumatology (Oxford)*, *60*(8)(1462-0332 (Electronic)). doi:10.1093/rheumatology/keaa847
- Gacesa, R., Kurilshikov, A., Vich Vila, A., Sinha, T., Klaassen, M. A. Y., Bolte, L., . . . Weersma, R. (2022). Environmental factors shaping the gut microbiome in a Dutch population. *Nature*(1476-4687 (Electronic)). doi:10.1038/s41586-022-04567-7
- Getachew, B., Hauser, S. R., Bennani, S., El Kouhen, N., Sari, Y., & Tizabi, Y. (2024). Adolescent alcohol drinking interaction with the gut microbiome: implications for adult alcohol use disorder. *Advances in Drug and Alcohol Research*, *4*. doi:10.3389/adar.2024.11881
- Goodrich, J. K., Davenport, E. R., Beaumont, M., Jackson, M. A., Knight, R., Ober, C., . . . Ley, R. E. (2016). Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK

- Twins. *Cell host & microbe*(1934-6069 (Electronic)).
- Hatch, M. (2017). Gut microbiota and oxalate homeostasis. *Annals of translational medicine*(2305-5839 (Print)). doi:10.21037/atm.2016.12.70
- Holmes, R. P., Goodman, H. O., & Assimos, D. G. (2001). Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney international*(0085-2538 (Print)). doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00488.x
- Hopkins, M. J., Sharp, R., & Macfarlane, G. T. (2002). Variation in human intestinal microbiota with age. *Dig Liver Dis*(1590-8658 (Print)). doi:10.1016/s1590-8658(02)80157-8
- Huby, A. C., Antonova, G., Groenendyk, J., Gomez-Sanchez, C. E., Bollag, W. B., Filosa, J. A., & Belin de Chantemèle, E. J. (2015). Adipocyte-Derived Hormone Leptin Is a Direct Regulator of Aldosterone Secretion, Which Promotes Endothelial Dysfunction and Cardiac Fibrosis. *Circulation*, 132(22)(1524-4539 (Electronic)). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018226
- Hughes, D. A., Bacigalupe, R., Wang, J., Rühlemann, M. C., Tito, R. Y., Falony, G., . . . Raes, J. (2020). Genome-wide associations of human gut microbiome variation and implications for causal inference analyses. *Nat Microbiol.*, 5(9)(2058-5276 (Electronic)). doi:10.1038/s41564-020-0743-8
- Ibrahim, A. M., Chauhan, L., Bhardwaj, A., Sharma, A., Fayaz, F., Kumar, B., . . . Pottou, F. H. (2022). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neurodegenerative Disorders. *Biomedicines*, 10(5)(2227-9059 (Print)). doi:10.3390/biomedicines10051143
- Kawamura, K., Kawamura, N., Sato, W., Fukuda, J., Kumagai, J., & Tanaka, T. (2009). Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. *Endocrinology*, 150(8)(1945-7170 (Electronic)). doi:10.1210/en.2009-0213
- Kurilshikov, A., Medina-Gomez, C., Bacigalupe, R., Radjabzadeh, D., Wang, J., Demirkan, A., . . . Zernakova, A. A.-O. (2021). Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition. *Nature Genetics*, 53(2)(1546-1718 (Electronic)). doi:10.1038/s41588-020-00763-1
- Lopera-Maya, E. A., Kurilshikov, A., van der Graaf, A., Hu, S., Andreu-Sánchez, S., Chen, L., . . . LifeLines Cohort, S. (2022). Effect of host genetics on the gut microbiome in 7,738 participants of the Dutch Microbiome Project. *Nature Genetics*, 54(2), 143-151. doi:10.1038/s41588-021-00992-y
- López-Domínguez, L., Bourdon, C., Hamilton, J., Taibi, A., Bassani, D. G., dos Santos Vaz, J., . . . Comelli, E. M. (2023). Childhood growth trajectory patterns are associated with the pubertal gut microbiota. *medRxiv*, 2023.2006.2020.23291663. doi:10.1101/2023.06.20.23291663
- Lukáčová, I., Ambro, L., Dubayová, K., & Mareková, M. (2023). The gut microbiota, its relationship to the immune system, and possibilities of its modulation. [Črevná mikrobiota, jej vzťah k imunitnému systému a možnosti jej modulácie.]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*(1210-7913 (Print)).
- McVean, G. A., Altshuler, D. M., Durbin, R. M., Abecasis, G. R., Bentley, D. R., Chakravarti, A., . . . University of, G. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491(7422), 56-65. doi:10.1038/nature11632
- Michels, N., Zouiouich, S., Vanderbauwhede, B., Vanacker, J., Indave Ruiz, B. I., & Huybrechts, I. (2022). Human microbiome and metabolic health: An overview of systematic reviews. *Obesity reviews*, 23(4)(1467-789X (Electronic)). doi:10.1111/obr.13409
- Muhammad, F., Fan, B., Wang, R., Ren, J., Jia, S., Wang, L., . . . Liu, X. A.-O. (2022). The Molecular Gut-Brain Axis in Early Brain Development. *International journal of molecular sciences*, 23(23)(1422-0067 (Electronic)). doi:10.3390/ijms232315389

- Mulder, D., Aarts, E., Arias Vasquez, A., & Bloemendaal, M. (2023). A systematic review exploring the association between the human gut microbiota and brain connectivity in health and disease. *Molecular psychiatry*(1476-5578 (Electronic)). doi:10.1038/s41380-023-02146-4
- Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, *136*(1)(1528-0012 (Electronic)).
- O'Connell, J., Gurdasani, D., Delaneau, O., Pirastu, N., Ulivi, S., Cocca, M., . . . Marchini, J. (2014). A general approach for haplotype phasing across the full spectrum of relatedness. *PLoS Genet.*, *10*(4)(1553-7404 (Electronic)). doi:10.1371/journal.pgen.1004234
- Patel, P. G., Patel, A. C., Chakraborty, P., & Gosai, H. B. (2023). Impact of Dietary Habits, Ethnicity, and Geographical Provenance in Shaping Human Gut Microbiome Diversity. In *Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Postbiotics: Human Microbiome and Human Health* (pp. 3-27): Springer.
- Peres, K. G., Peres, M. A., Demarco, F. F., Gigante, D. P., Horta, B. L., Menezes, A. M. B., . . . Barros, A. J. D. (2014). A saúde bucal nas coortes de nascimentos de Pelotas, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, *17*. doi:10.1590/1415-790X201400010022
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., . . . Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*(0002-9297 (Print)). doi:10.1086/519795
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., . . . Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, *490*(7418), 55-60. doi:10.1038/nature11450
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Schweer, T., P., Y., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*(1362-4962 (Electronic)). doi:10.1093/nar/gks1219
- Rühlemann, M. C., Hermes, B. M., Bang, C., Doms, S., Moitinho-Silva, L., Thingholm, L. B., . . . Franke, A. (2021). Genome-wide association study in 8,956 German individuals identifies influence of ABO histo-blood groups on gut microbiome. *Nature Genetics*, *53*(2), 147-155. doi:10.1038/s41588-020-00747-1
- Santos, I. S., Barros, A. J. D., Matijasevich, A., R, D. M., Barros, F. C., & Victora, C. G. (2011). Cohort profile: the 2004 Pelotas (Brazil) birth cohort study. (1464-3685 (Electronic)). doi:10.1093/ije/dyq130
- Santos, I. S., Barros, A. J. D., Matijasevich, A., Zanini, R., Cesar, M. A. C., Camargo-Figuera, F. A., . . . Victora, C. G. (2014). Cohort Profile Update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. Body composition, mental health and genetic assessment at the 6 years follow-up. *International journal of epidemiology*, *43*(5), 1437-1437f. doi:10.1093/ije/dyu144
- Saunders, G. R. B., Wang, X., Chen, F. A.-O., Jang, S. K., Liu, M. A.-O., Wang, C. A.-O., . . . Vrieze, S. A.-O. (2022). Genetic diversity fuels gene discovery for tobacco and alcohol use. *Nature*(1476-4687 (Electronic)). doi:10.1038/s41586-022-05477-4
- Scepanovic, P., Hodel, F., Mondot, S., Partula, V., Byrd, A., Hammer, C., . . . The Milieu Intérieur, C. (2019). A comprehensive assessment of demographic, environmental, and host genetic associations with gut microbiome diversity in healthy individuals. *Microbiome*, *7*(1), 130. doi:10.1186/s40168-019-0747-x
- Schür, R. R., Draisma, L. W., Wijnen, J. P., Boks, M. P., Koevoets, M. G., Joëls, M., . . . Vinkers, C. H. (2016). Brain GABA levels across psychiatric disorders: A systematic literature review and meta-analysis of (1) H-MRS studies. *Hum Brain Mapp.*, *37*(9)(1097-0193 (Electronic)). doi:10.1002/hbm.23244
- Sjöstedt, E., Zhong, W., Fagerberg, L., Karlsson, M., Mitsios, N., Adori, C., . . . Mulder, J. A.-O. (2020). An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and

- mouse brain. *Science*, 367(6482)(1095-9203 (Electronic)). doi:10.1126/science.aay5947
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., . . . von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1):D638-D646(1362-4962 (Electronic)). doi:10.1093/nar/gkac1000
- Ticinesi, A., Nouvenne, A., & Meschi, T. (2019). Gut microbiome and kidney stone disease: not just an Oxalobacter story. *Kidney international*, 96(1)(1523-1755 (Electronic)). doi:10.1016/j.kint.2019.03.020
- Tovo-Rodrigues, L., Santos, I. S., Bierhals, I. O., Del-Ponte, B., Murray, J., Bielemann, R., . . . Matijasevich, A. (2023). Cohort Profile Update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study follow-up during adolescent years. *International journal of epidemiology*(1464-3685 (Electronic)). doi:10.1093/ije/dyad156
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L. D., A., Ley, R. E., Sogin, M. L., . . . Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228)(1476-4687 (Electronic)).
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16)(0099-2240 (Print)). doi:10.1128/AEM.00062-07
- Ward, L. D., & Kellis, M. (2012). HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D930-D934. doi:10.1093/nar/gkr917
- Wilson, G. J., Gois, P. H. F., Zhang, A., Wang, X., Law, B. M. P., Kassianos, A. J., & Healy, H. G. (2018). The Role of Oxidative Stress and Inflammation in Acute Oxalate Nephropathy Associated With Ethylene Glycol Intoxication. *Kidney international reports.*, 3(5)(2468-0249 (Electronic)). doi:10.1016/j.ekir.2018.05.005
- Yutin, N., & Galperin, M. Y. (2014). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environmental microbiology*, 15(10)(1462-2920 (Electronic)). doi:<https://doi.org/10.1111%2F1462-2920.12173>
- Zhu, Z., Guo, Y., Shi, H., Liu, C. L., Panganiban, R. A., Chung, W., . . . Liang, L. (2020). Shared genetic and experimental links between obesity-related traits and asthma subtypes in UK Biobank. *J Allergy Clin Immunol.*, 145(2)(1097-6825 (Electronic)). doi:10.1016/j.jaci.2019.09.035

Table 1 – Description of the analyzed sample and comparison with the remaining cohort participants as based on maternal and individual characteristics at birth

Variable	Included	Not included	p-value ^a
	(N = 338)	(N = 3.893)	
	N (%)	N (%)	
<i>Maternal characteristics at birth</i>			
Age (years)	338	3.889	0.256
≤ 24	75 (22.2)	724 (18.6)	
25 – 34	222 (65.7)	2.643 (67.9)	
≥ 35	41 (12.1)	522 (13.4)	
Total familiar income (quintiles)	338	3.891	0.253
1 st (lower)	60 (17.7)	812 (20.9)	
2 nd	76 (22.5)	778 (20.0)	
3 rd	59 (17.4)	757 (19.9)	
4 th	80 (23.6)	777 (20.0)	
5 th (higher)	63 (18.6)	767 (19.7)	
<i>Participant's characteristics</i>			
Sex	338	3.134	0.935
Male	174 (51.5)	1,606 (51.2)	
Female	164 (48.5)	1,528 (48.8)	
Skin color	338	3.660	0.025
White	227 (66.9)	2.499 (68.3)	
Black	43 (12.7)	439 (12.0)	
Mixed	61 (18.0)	528 (14.4)	
Others	7 (2.1)	194 (5.3)	
Type of delivery	338	3.891	0.156
Vaginal	172 (50.9)	2.136 (54.9)	
C-section	166 (49.1)	1.755 (45.1)	
Birth weight (grams)	338	3.888	0.062
< 2,500	25 (7.4)	398 (10.2)	
2,500-3,499	209 (61.8)	2.484 (63.9)	
≥ 3,500	104 (30.7)	1.006 (25.9)	

^ap-value referring to Chi-square

Table 2 – Description of outcomes based on the model used (Binary or Quantitative) in the 2004 Pelotas Birth Cohort, Brazil (N = 338).

Phylum	Taxon	Model	Mean (SD)	Frequency N (%)
<i>Actinobacteria</i>	<i>G_Bifidobacterium</i>	Q	0.007 (0.98)	-
<i>Firmicutes</i>	<i>G_Intestinibacter</i>	Q	0.003 (0.99)	-
<i>Firmicutes</i>	<i>F_Peptostreptococcaceae</i>	Q	0.0004 (0.99)	-
<i>Firmicutes</i>	<i>G_Ruminococcus</i>	Q	0.001 (0.99)	-
<i>Firmicutes</i>	<i>G_Faecalibacterium</i>	Q	0.001 (1.00)	-
<i>Firmicutes</i>	<i>G_Coproccoccus</i>	Q	0.001 (0.99)	-
<i>Firmicutes</i>	<i>G_Anaerostipes</i>	Q	0.001 (1.00)	-
<i>Firmicutes</i>	<i>G_Peptococcus</i>	B	-	88 (26.0%)
<i>Proteobacteria</i>	<i>F_Oxalobacteraceae</i>	B	-	182 (53.9%)
<i>Firmicutes</i>	<i>G_Allisonella</i>	B	-	141 (41.7%)
<i>Proteobacteria</i>	<i>G_Oxalobacter</i>	B	-	32 (9.5%)
<i>Firmicutes</i>	<i>G_Streptococcus</i>	Q	0.013 (0.98)	-
<i>Firmicutes</i>	<i>G_Clostridium_XVIII</i>	B	-	282 (83.4%)
<i>Firmicutes</i>	<i>G_Turicibacter</i>	B	-	292 (86.4%)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>G_Odoribacter</i>	B	-	313 (92.6%)
<i>Firmicutes</i>	<i>F_Peptococcaceae</i>	B	-	101 (29.9%)

For continuous variables (Quantitative model; Q), mean and standard deviation are provided. For dichotomous variables (Binary model; B), the frequency of presence of the taxon is provided.

F and G preceding taxon names indicate the classification levels family and genus; Q = quantitative model; B = Binary model; SD = Standard deviation

Table 3 - Results of linear and logistic regression models examining the association between host SNPs and gut microbiota taxa at age 12 within the included subset of the 2004 Pelotas Birth Cohort (N = 338).

Taxon	SNP	Chr: Position	Gene Consequence	EA	RA	EAf	Gene(s)	M	Adjusted effect (β /OR (95%CI))	p-value	FDR p-value
<i>G_Bifidobacterium</i>	rs7322849	13:112859829	Intergenic	T	C	0.094	4.5kb 3' of <i>RP11-315H15.2</i>	Q	$\beta = -0.72 (-2.87;1.44)$	0.514	0.727
<i>G_Bifidobacterium</i>	rs182549	2:136616754	Intronic	C	T	0.344	<i>MCM6</i>	Q	$\beta = -0.98 (-2.31;0.34)$	0.145	0.689
<i>G_Intestinibacter</i>	rs10805326	4:14324623	Intergenic	G	A	0.319	-	Q	$\beta = 4.03 (-10.65;18.71)$	0.591	0.749
<i>F_Peptostreptococcaceae</i>	rs61841503	10:17019559	Intronic	G	A	0.114	<i>CUBN</i>	Q	$\beta = -0.02 (-0.26;0.22)$	0.867	0.915
<i>G_Ruminococcus</i>	rs10769159	11:45688595	Intergenic	G	C	0.451	1.4kb 5' of <i>CHST1</i>	Q	$\beta = -0.06 (-0.21;0.09)$	0.466	0.727
<i>G_Faecalibacterium</i>	rs12320842	12:83502773	Intronic	C	G	0.155	<i>TMTC2</i>	Q	$\beta = -0.03 (-0.24;0.19)$	0.808	0.903
<i>G_Coproccoccus</i>	rs62373497	5:133035923	Intergenic	A	C	0.103	-	Q	$\beta = -0.05 (-0.30;0.20)$	0.669	0.794
<i>G_Anaerostipes</i>	rs17319026	16:55939738	Intronic	A	G	0.084	<i>CES5A</i>	Q	$\beta = 0.172 (-0.11;0.45)$	0.232	0.722
<i>G_Peptococcus</i>	rs75754569	3:17793504	Regulatory	C	G	0.111	<i>TBC1D5</i>	B	OR = 1.17 (0.71;1.93)	0.527	0.727
<i>F_Oxalobacteraceae</i>	rs4428215	3:171947435	Intronic	G	A	0.285	<i>FNDC3B</i>	B	OR = 1.17 (0.83;1.65)	0.357	0.727
<i>G_Allisonella</i>	rs602075	9:79110160	Intronic	A	G	0.168	<i>GCNT1</i>	B	OR = 1.53 (0.97;2.42)	0.073	0.462
<i>G_Oxalobacter</i>	rs736744	9:87514407	Intronic	C	T	0.444	<i>NTRK2</i>	B	OR = 0.59 (0.35;0.99)	0.047	0.447
<i>G_Streptococcus</i>	rs11110281	12:100584014	Intergenic	T	C	0.057	8.9kb 5' of <i>ACTR6</i>	B	OR = 2.27 (0.28;18.14)	0.439	0.727
<i>G_Clostridium_XVIII</i>	rs7221249	17:10177708	Intergenic	A	G	0.484	-	B	OR = 1.25 (0.81;1.94)	0.312	0.727

<i>G_Turcibacter</i>	rs555115	1:18676961	Intronic	A	G	0.217	<i>IGSF21</i>	B	OR = 0.99 (0.58;1.68)	0.967	0.967
<i>G_Odoribacter</i>	rs56081657	2:64732145	Intergenic	A	G	0.068	4.1kb 3' of <i>AC008074.4</i>	B	OR = 0.60 (0.24;1.47)	0.266	0.722
<i>F_Peptococcaceae</i>	rs7574352	2:227347681	Regulatory	T	G	0.254	-	B	OR = 0.79 (0.54;1.17)	0.245	0.722
<i>F_Peptococcaceae</i>	rs17066404	3:62432708	Intronic	G	A	0.053	<i>CADPS</i>	B	OR = 1.27 (0.59;2.70)	0.536	0.727

Chr = Chromosome; EA = effect allele; RA: Reference allele for the present study; EAF =Effect allele frequency; M = Model; OR = Odds Ratio; β = Beta. Q = quantitative model; B = Binary model; FDR = False Discovery Rate; F and G preceding taxon names indicate the classification levels family and genus.

Genome reference assembly = GRCh37.

Regression adjusted for sex and 10 first genomic principal components.

Table 4: Functional Enrichment Analysis of the PPI Network, Highlighting GO Biological Processes and KEGG Pathways:

Biological Process			
GO-term	Description	Strength	FDR p-value
GO:0007169	Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	1.6	2.96E-23
GO:0007173	Epidermal growth factor receptor signaling pathway	2.06	3.66E-08
GO:0038179	Neurotrophin signaling pathway	2.26	1.34E-07
GO:0038093	Fc receptor signaling pathway	1.96	1.62E-06
GO:1990090	Cellular response to nerve growth factor stimulus	1.9	5.81E-05
GO:0050851	Antigen receptor-mediated signaling pathway	1.52	9.04E-05
GO:0038180	Nerve growth factor signaling pathway	2.37	0.00011
GO:0032869	Cellular response to insulin stimulus	1.5	0.00011
GO:0008286	Insulin receptor signaling pathway	1.77	0.00015
GO:0038096	Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis	2.13	0.00037
GO:0007422	Peripheral nervous system development	1.65	0.00037
GO:0002223	Stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway	2.11	0.0004
GO:0002862	Negative regulation of inflammatory response to antigenic stimulus	2.02	0.00064
GO:0050852	T cell receptor signaling pathway	1.56	0.0007
GO:0033138	Positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	1.53	0.00084
GO:0050853	B cell receptor signaling pathway	1.75	0.0028
GO:0070301	Cellular response to hydrogen peroxide	1.63	0.0057
GO:0051881	Regulation of mitochondrial membrane potential	1.6	0.0067
GO:0021675	Nerve development	1.52	0.0103
GO:0007631	Feeding behavior	1.5	0.0111
GO:0001776	Leukocyte homeostasis	1.5	0.0117
KEGG Pathways			
Pathway	Description	Strength	FDR p-value
hsa04722	Neurotrophin signaling pathway	2.18	7.14E-35
hsa04014	Ras signaling pathway	1.7	3.08E-16
hsa04012	ErbB signaling pathway	2.02	1.79E-14
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	1.99	1.39E-12
hsa04935	Growth hormone synthesis, secretion and action	1.81	2.65E-11
hsa04650	Natural killer cell mediated cytotoxicity	1.8	2.68E-11
hsa05214	Glioma	1.97	6.14E-11

hsa05034	Alcoholism	1.71	9.03E-11
hsa04072	Phospholipase D signaling pathway	1.71	9.03E-11
hsa04062	Chemokine signaling pathway	1.61	4.65E-10
hsa04910	Insulin signaling pathway	1.7	2.43E-09
hsa04917	Prolactin signaling pathway	1.92	3.30E-09
hsa05220	Chronic myeloid leukemia	1.88	5.31E-09
hsa05206	MicroRNAs in cancer	1.62	6.67E-09
hsa05225	Hepatocellular carcinoma	1.61	6.77E-09
hsa01522	Endocrine resistance	1.78	1.57E-08
hsa04510	Focal adhesion	1.53	2.17E-08
hsa04926	Relaxin signaling pathway	1.65	7.48E-08
hsa04915	Estrogen signaling pathway	1.63	9.68E-08
hsa05100	Bacterial invasion of epithelial cells	1.83	2.27E-07
hsa04370	VEGF signaling pathway	1.83	7.13E-06
hsa05226	Gastric cancer	1.51	7.13E-06
hsa05224	Breast cancer	1.51	7.13E-06
hsa04664	Fc epsilon RI signaling pathway	1.76	1.10E-05
hsa05120	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	1.64	0.00058
hsa05223	Non-small cell lung cancer	1.62	0.00064

GO = Gene Ontology Term; KEGG = Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; FDR = False discovery rate.

The table presents terms with strength scores ≥ 1.5 . Additional terms are provided in Supplementary Tables 4 and 5.

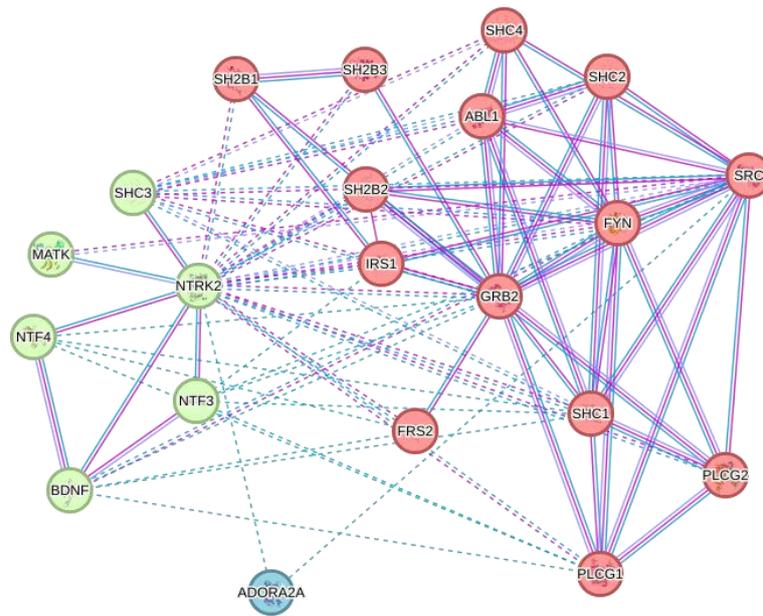


Figure 1. Protein-Protein Interaction Network for the NTRK2 Interacting Protein. Green nodes represent the neurotrophins signaling pathway cluster, specifically activated *NTRK2* signaling through *PLCG1*. Red nodes indicate the cluster involved in the neurotrophins signaling pathway associated with transmembrane receptor protein tyrosine kinase adaptor activity via the SH2 domain. Blue nodes correspond to the *ADORA2A* cluster, implicating adenosine receptor signaling. Dotted lines represent inter-cluster connections, while solid lines denote intra-cluster interactions. Blue lines indicate interactions derived from curated databases, and pink lines represent experimentally determined interactions.

Supplementary Material

Supplementary Table 1. Genetic variants and taxa identified in the original GWAS (Kurilshikov et al; 2021), detailing the statistical models employed, association results, and inclusion criteria justification in the current study.

Bacteria	rsID	Model	Adjusted effect β /OR (95%CI)	p-value	Criteria
Genus Bifidobacterium	rs182549	Q	0.1197	1.28×10^{-20}	Included
Order Gastranaerophilales	rs9864379	Q	-0.1605	4.66×10^{-8}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)
Genus Peptococcus	rs75754569	Q	0.1814	1.10×10^{-8}	Included
Family Oxalobacteraceae	rs4428215	Q	0.1256	4.88×10^{-8}	Included
Genus Intestinibacter	rs10805326	Q	0.0775	3.55×10^{-8}	Included
Genus Enterorhabdus	rs11098863	Q	-0.0966	3.06×10^{-9}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)
Genus group Eubacterium coprostanoligenes	rs17159861	Q	0.0962	1.04×10^{-8}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)
Genus Allisonella	rs602075	Q	0.1690	3.57×10^{-8}	Included
Genus Oxalobacter	rs736744	Q	0.1303	2.57×10^{-8}	Included
Genus Ruminococcaceae UCG013	rs12781711	Q	-0.066	2.55×10^{-8}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)
Family Peptostreptococcaceae	rs61841503	Q	0.0920	9.80×10^{-9}	Included
Genus Ruminococcus1	rs10769159	Q	-0.0640	5.29×10^{-9}	Included
Genus Faecalibacterium	rs12320842	Q	0.0948	7.57×10^{-9}	Included

Genus Streptococcus	rs11110281	Q	-0.1375	2.58×10^{-9}	Included
Genus Bifidobacterium	rs7322849	Q	0.1197	1.08×10^{-8}	Included
Genus Ruminococcaceae UCG009	rs8009993	Q	-0.1359	4.42×10^{-8}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)
Genus Erysipelatoclostridium	rs7221249	Q	-0.0834	4.31×10^{-9}	Included - equivalent to the <i>Clostridium</i> XVIII genus in RDP
Genus Tyzzerella3	rs67476743	Q	0.1322	3.74×10^{-9}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)
Genus Candidatus Soleaferrea	rs830151	Q	0.1946	4.26×10^{-8}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)
Genus group Ruminococcus torques	rs35866622	Q	-0.0612	2.21×10^{-8}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)
Genus Turicibacter	rs555115	B	-0.0022	3.34×10^{-8}	Included
Genus Ruminiclostridium6	rs57440956	B	-0.0335	4.07×10^{-8}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)
Genus Odoribacter	rs56081657	B	0.0008	1.17×10^{-8}	Included
Family Peptococcaceae	rs7574352	B	0.0213	1.42×10^{-9}	Included
Family Peptococcaceae	rs17066404	B	0.0032	2.98×10^{-8}	Included
Genus Enterorhabdus	rs207281	B	0.0032	3.53×10^{-8}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)
Genus Coprococcus1	rs62373497	B	0.0080	1.16×10^{-8}	Included
Family Pseudomonadaceae	rs9474033	B	Not found	3.79×10^{-8}	Included

Genus Lachnospiraceae UCG010	rs437867	B	-0.0022	3.34×10^{-8}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)
Genus Anaerostipes	rs17319026	B	Not found	4.67×10^{-8}	Included
Family Bacteroidales S24.7	rs11647069	B	0.0181	2.42×10^{-8}	Not included (taxonomy not found in 2004 Pelotas Birth Cohort Dataset)

β = Beta; OR = Odds Ratio; Q = Quantitative model; B = Binary model.

Reference: Kurilshikov A, Medina-Gomez C, Bacigalupe R, Radjabzadeh D, Wang J, Demirkan A, et al. Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition. *Nature Genetics*. 2021;53(2)(1546-1718 (Electronic)).

Supplementary table 2. *In Silico* functional information variants included in this study available in RegulomeDB v2.2 and Haploreg v4.2.

<i>SNP ID</i>	<i>RegulomeDB</i>		<i>HaploReg</i>				
	<i>Rank</i>	<i>Score</i>	Promoter Histone Marks Tissues	Enhancer Histone Marks Tissues	DNase Tissues	Motifs Changed	eQTL Hits
rs182549	1f	0.0925	-	-	-	7 altered motifs	<i>MCM6</i> in Artery Aorta; <i>MCM6</i> in Artery Tibial; <i>MCM6</i> in Esophagus Muscularis; <i>MCM6</i> in Heart Left Ventricle; <i>MCM6</i> in Nerve Tibial; <i>UBXN4</i> in Skin Sun Exposed Lower Leg; <i>DARS</i> and <i>MCM6</i> in Thyroid; <i>DARS</i> in Lymphoblastoid EUR exonlevel
rs75754569	5	0.13454	-	2 tissues	-	3 altered motifs	-
rs4428215	1b	0.955	-	-	2 tissues	1 altered motifs	-
rs10805326	5	0.58955	-	-	-	-	<i>CPEB2</i> in Heart
rs602075	1f	0.55436	-	-	-	1 altered motifs	<i>RFK</i> in Artery Tibial
rs736744	5	0.0	-	2 tissues	1 tissue	8 altered motifs	-
rs61841503	5	0.13454	-	-	-	2 altered motifs	-
rs10769159	1f	0.66703	-	-	5 tissues	7 altered motifs	<i>CHST1</i> in Colon Sigmoid <i>CHST1</i> in Esophagus Muscularis <i>CHST1</i> in Heart Left Ventricle <i>CHST1</i> in Lung <i>CHST1</i> in Nerve Tibial

rs12320842	7	0.18412	-	-	-	6 altered motifs	-
rs11110281	1f	0.55436	-	4 tissues	2 tissues	-	<i>GOLGA2B</i> in Thyroid
rs7221249	7	0.18412	-	-	-	3 altered motifs	-
rs7322849	2b	0.51348	6 tissues	9 tissues	4 tissues	4 altered motifs	-
rs555115	5	0.13454	-	1 tissue	-	-	-
							<i>AFTPH</i> in Brain Cerebellum
rs56081657	1f	0.55436	-	4 tissues	-	8 altered motifs	<i>AFTPH</i> in Brain Putamen basal ganglia
							<i>AFTPH</i> in Esophagus Muscularis
							<i>AFTPH</i> in Nerve Tibial
rs7574352	5	0.58955	-	6 tissues	-	-	-
rs17066404	4	0.60906	-	5 tissues	-	-	-
rs62373497	2b	0.81166	-	-	-	2 altered motifs	-
rs9474033	7	0.18412	-	-	-	1 altered motif	-
rs17319026	1f	0.55436	1 tissue	-	1 tissue	-	-

Single nucleotide polymorphism = SNP; CADD = combined annotation dependent depletion CADD, Expression quantitative trait loci = eQTL; *MCM6* = minichromosome maintenance complex component 6; *UBXN4* = UBX domain protein 4; *DARS* = aspartyl-tRNA synthetase 1; *CPEB2* = cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2; *RFK* = Riboflavin Kinase; *CHST1* = carbohydrate sulfotransferase 1; *GOLGA2B* = GOLGA2 Pseudogene 5; *AFTPH* = Aftiphilin.

Supplementary Table 3. Regulatory information available in Haploreg v4.2 for the SNPs rs602075 and rs736744.

<i>SNP ID</i>	<i>Gene Location</i>	Promoter Histone Marks Tissues	Enhancer Histone Marks Tissues	Histone modification	DNase Tissues	Motifs Changed	eQTL Hits
rs602075	Intronic	-	-	H3K4me1: hESC Derived CD184+ Endoderm Cultured Cells; Primary hematopoietic stem cells G-CSF-mobilized Male; Duodenum Mucosa; Fetal Intestine Large; Gastric; Stomach Mucosa H3K27ac: H1 BMP4 Derived Mesendoderm Cultured Cells; Foreskin Fibroblast Primary Cells skin01; Monocytes-CD14+ RO01746 Primary Cells H3K9ac: Stomach Mucosa	-	DMRT4	<i>RFK</i> in Artery Tibial
rs736744	Intronic	-	ESDR, BRN	H3K4me1: H9 Derived Neuronal Progenitor Cultured Cells; H9 Derived Neuron Cultured Cells; hESC Derived CD184+ Endoderm Cultured Cells; hESC Derived CD56+ Ectoderm Cultured Cells; Mesenchymal Stem Cell Derived Adipocyte Cultured Cells; Cortex derived primary cultured neurospheres; Ganglion Eminence derived primary cultured neurospheres; Foreskin Melanocyte Primary Cells; Brain; Fetal Adrenal Gland; Fetal Heart; Fetal Intestine Large; Fetal Intestine Small; SMM cell derived Skeletal Muscle Myotubes Cells H3K27ac: hESC Derived CD56+ Ectoderm Cultured Cells; Brain Cingulate Gyrus; Brain Inferior Temporal Lobe; Brain Substantia Nigra	ADRL	E2A, Hic1, Lmo2-complex, Myf, PRDM1, SIRT6, TCF12, Znf143	-

Single nucleotide polymorphism = SNP; Expression quantitative trait loci = eQTL; H3K4me1 = monomethylation of histone H3 at lysine 4; H3K27ac = Histone H3 Lysine 27 acetylation; H3K9ac = Histone H3 Lysine 9 acetylation; DMRT4 = DMRT like family; RFK = Riboflavin Kinase; ESDR = H9 Derived Neuron Cultured Cells; BRN = Brain; ADRL = Fetal Adrenal Gland;

E2A = Transcription Factor E2A; Hic1 = HIC ZBTB Transcriptional Repressor 1); Lmo2-complex = LIM Domain Only 2; Myf = Myogenic Factor; PRDM1 = PR/SET Domain 1; SIRT6 = Sirtuin 6; TCF12 = Transcription Factor 12; Znf143 = Zinc Finger Protein 143

Supplementary Table 4. Enriched pathways according to KEGG analysis.

#Term ID	Term description	Observed gene count	Background gene count	Strength	False discovery rate	Matching proteins in your network (IDs)	Matching proteins in your network (labels)
hsa04722	Neurotrophin signaling pathway	18	112	2.18	7.14e-35	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, SHC4, SH2B3, ABL1, SHC3, GRB2, MATK, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, PLCG2
hsa04014	Ras signaling pathway	12	225	1.7	3.08e-16	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SHC2,NTRK2,SHC4,ABL1,SHC3,GRB2,NTF3,SHC1,BDNF,NTF4,PLCG2
hsa04012	ErbB signaling pathway	9	81	2.02	1.79e-14	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, SHC2, SHC4, ABL1, SRC, SHC3, GRB2, SHC1, PLCG2

hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	8	77	1.99	1.39e-12	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SHC2,SHC4,SRC,SHC3,GRB2,SHC1,PLCG2
hsa04935	Growth hormone synthesis, secretion and action	8	117	1.81	2.65e-11	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SHC2,IRS1,SHC4,SHC3,GRB2,SHC1,PLCG2
hsa04650	Natural killer cell mediated cytotoxicity	8	120	1.8	2.68e-11	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SHC2,SHC4,FYN,SHC3,GRB2,SHC1,PLCG2
hsa05214	Glioma	7	71	1.97	6.14e-11	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SHC2,SHC4,SHC3,GRB2,SHC1,PLCG2
hsa04072	Phospholipase D signaling pathway	8	147	1.71	9.03e-11	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SHC2,SHC4,FYN,SHC3,GRB2,SHC1,PLCG2

hsa05034	Alcoholism	8	146	1.71	9.03e-11	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000480012	SHC2,NTRK2,SHC4,SHC3,GRB2, SHC1,BDNF,ADORA2A
hsa04062	Chemokine signaling pathway	8	186	1.61	4.65e-10	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SHC2,SHC4,SRC,SHC3,GRB2,SHC1,PLCG2
hsa04910	Insulin signaling pathway	7	132	1.7	2.43e-09	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273	SHC2,IRS1,SHC4,SHC3,GRB2,SHC1,SH2B2
hsa04917	Prolactin signaling pathway	6	68	1.92	3.30e-09	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303	SHC2,SHC4,SRC,SHC3,GRB2,SHC1
hsa05220	Chronic myeloid leukemia	6	75	1.88	5.31e-09	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303	SHC2,SHC4,ABL1,SHC3,GRB2,SHC1
hsa05206	MicroRNAs in cancer	7	159	1.62	6.67e-09	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,IRS1,SHC4,ABL1,GRB2,SHC1,PLCG2

hsa05225	Hepatocellular carcinoma	7	161	1.61	6.77e-09	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SHC2,SHC4,SHC3,GRB2, SHC1,PLCG2
hsa01522	Endocrine resistance	6	94	1.78	1.57e-08	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303	SHC2,SHC4,SRC,SHC3,GRB2,SH C1
hsa04510	Focal adhesion	7	195	1.53	2.17e-08	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303	SHC2,SHC4,FYN,SRC,SHC3,GR B2,SHC1
hsa04926	Relaxin signaling pathway	6	126	1.65	7.48e-08	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303	SHC2,SHC4,SRC,SHC3,GRB2,SH C1
hsa04915	Estrogen signaling pathway	6	133	1.63	9.68e-08	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345 ,9606.ENSP00000 401303	SHC2,SHC4,SRC,SHC3,GRB2,SH C1
hsa05100	Bacterial invasion of epithelial cells	5	70	1.83	2.27e-07	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000401303	SHC2,SHC4,SRC,SHC3,SHC1
hsa04370	VEGF signaling pathway	4	56	1.83	7.13e-06	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SHC2,SRC,PLCG2
hsa05224	Breast cancer	5	146	1.51	7.13e-06	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303	SHC2,SHC4,SHC3,GRB2,SHC1

hsa05226	Gastric cancer	5	146	1.51	7.13e-06	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303	SHC2,SHC4,SHC3,GRB2,SHC1
hsa04664	Fc epsilon RI signaling pathway	4	65	1.76	1.10e-05	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,FYN,GRB2,PLCG2
hsa04360	Axon guidance	5	176	1.43	1.50e-05	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,FYN,ABL1,SRC,PLCG2
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	6	349	1.21	1.82e-05	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455	NTRK2,IRS1,GRB2,NTF3,BDNF, NTF4
hsa05205	Proteoglycans in cancer	5	194	1.38	2.21e-05	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SRC,GRB2,FRS2,PLCG2
hsa04010	MAPK signaling pathway	5	286	1.21	0.00014	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455	NTRK2,GRB2,NTF3,BDNF,NTF4
hsa05120	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	3	65	1.64	0.00058	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SRC,PLCG2
hsa05223	Non-small cell lung cancer	3	68	1.62	0.00064	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,GRB2,PLCG2
hsa04750	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	3	92	1.49	0.0015	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SRC,PLCG2
hsa04660	T cell receptor signaling pathway	3	100	1.45	0.0018	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000376345	PLCG1,FYN,GRB2
hsa04380	Osteoclast differentiation	3	120	1.37	0.0030	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000482457	FYN,GRB2,PLCG2
hsa04611	Platelet activation	3	122	1.36	0.0030	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457	FYN,SRC,PLCG2

hsa04919	Thyroid hormone signaling pathway	3	120	1.37	0.0030	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SRC,PLCG2
hsa05130	Pathogenic Escherichia coli infection	3	187	1.18	0.0096	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680	FYN,ABL1,SRC
hsa05167	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	3	187	1.18	0.0096	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SRC,PLCG2
hsa04020	Calcium signaling pathway	3	191	1.17	0.0097	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,ADORA2A,PLCG2
hsa04015	Rap1 signaling pathway	3	201	1.15	0.0106	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000480012	PLCG1,SRC,ADORA2A
hsa05110	Vibrio cholerae infection	2	47	1.6	0.0106	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,PLCG2
hsa05131	Shigellosis	3	218	1.11	0.0130	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,SRC,PLCG2
hsa05416	Viral myocarditis	2	55	1.53	0.0133	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423	FYN,ABL1
hsa05200	Pathways in cancer	4	515	0.86	0.0155	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,ABL1,GRB2,PLCG2
hsa04520	Adherens junction	2	69	1.43	0.0196	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000362680	FYN,SRC
hsa00562	Inositol phosphate metabolism	2	72	1.42	0.0208	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,PLCG2
hsa04662	B cell receptor signaling pathway	2	78	1.38	0.0237	9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000482457	GRB2,PLCG2
hsa04540	Gap junction	2	87	1.33	0.0286	9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345	SRC,GRB2
hsa04912	GnRH signaling pathway	2	87	1.33	0.0286	9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345	SRC,GRB2
hsa04666	Fc gamma R-mediated phagocytosis	2	90	1.32	0.0293	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,PLCG2
hsa04070	Phosphatidylinositol signaling system	2	94	1.3	0.0312	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,PLCG2

hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	2	96	1.29	0.0312	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,PLCG2
hsa05231	Choline metabolism in cancer	2	95	1.3	0.0312	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000376345	PLCG1,GRB2
hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	2	101	1.27	0.0337	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,PLCG2
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	2	102	1.26	0.0337	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,PLCG2
hsa04625	C-type lectin receptor signaling pathway	2	101	1.27	0.0337	9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457	SRC,PLCG2
hsa04670	Leukocyte transendothelial migration	2	111	1.23	0.0382	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000482457	PLCG1,PLCG2
hsa05135	Yersinia infection	2	124	1.18	0.0463	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000362680	PLCG1,SRC
hsa04068	FoxO signaling pathway	2	126	1.17	0.0469	9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000376345	IRS1,GRB2

Supplementary Table 5. GO (Gene Ontology) term enrichment analysis among proteins observed in the network of interest.

#Term ID	Term description	Observed gene count	Background gene count	Strength	False discovery rate	Matching proteins in your network (IDs)	Matching proteins in your network (labels)
GO:0007169	Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	18	425	1.6	2.96e-23	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455	PLCG1, SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, SHC4, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, SHC3, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4 PLCG1, SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, SHC4, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, SHC3, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2 PLCG1, NTRK2, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, NTF4
GO:0007166	Cell surface receptor signaling pathway	20	2040	0.96	2.18e-15	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455	PLCG1, SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, SHC4, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, SHC3, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0071363	Cellular response to growth factor stimulus	11	473	1.34	1.93e-09	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455	PLCG1, NTRK2, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, NTF4

GO:0071495	Cellular response to endogenous stimulus	13	1103	1.04	1.70e-08	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455	PLCG1, NTRK2, IRS1, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4
GO:0007173	Epidermal growth factor receptor signaling pathway	6	49	2.06	3.66e-08	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303	PLCG1, ABL1, SRC, SHC3, GRB2, SHC1
GO:0035556	Intracellular signal transduction	14	1518	0.94	3.66e-08	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, SHC2, IRS1, SH2B1, SHC4, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, SHC3, GRB2, SHC1, SH2B2, PLCG2
GO:0071310	Cellular response to organic substance	15	2019	0.84	5.88e-08	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, NTRK2, IRS1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, PLCG2

GO:0048584	Positive regulation of response to stimulus	15	2131	0.82	1.09e-07	9606.ENSPO00000244007, 9606.ENSPO00000264554, 9606.ENSPO00000277120, 9606.ENSPO00000304895, 9606.ENSPO00000321221, 9606.ENSPO00000346671, 9606.ENSPO00000361423, 9606.ENSPO00000362680, 9606.ENSPO00000397297, 9606.ENSPO00000401303, 9606.ENSPO00000414303, 9606.ENSPO00000440273, 9606.ENSPO00000447241, 9606.ENSPO00000480012, 9606.ENSPO00000482457	PLCG1, SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, ADORA2A, PLCG2
GO:0038179	Neurotrophin signaling pathway	5	26	2.26	1.34e-07	9606.ENSPO00000277120, 9606.ENSPO00000362680, 9606.ENSPO00000397297, 9606.ENSPO00000414303, 9606.ENSPO00000469455	NTRK2, SRC, NTF3, BDNF, NTF4
GO:0010033	Response to organic substance	16	2692	0.75	1.45e-07	9606.ENSPO00000244007, 9606.ENSPO00000277120, 9606.ENSPO00000304895, 9606.ENSPO00000345492, 9606.ENSPO00000346671, 9606.ENSPO00000361423, 9606.ENSPO00000362680, 9606.ENSPO00000376345, 9606.ENSPO00000397297, 9606.ENSPO00000401303, 9606.ENSPO00000414303, 9606.ENSPO00000440273, 9606.ENSPO00000447241, 9606.ENSPO00000469455, 9606.ENSPO00000480012, 9606.ENSPO00000482457	PLCG1, NTRK2, IRS1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0010646	Regulation of cell communication	17	3355	0.68	2.29e-07	9606.ENSPO00000264554, 9606.ENSPO00000277120, 9606.ENSPO00000304895, 9606.ENSPO00000321221, 9606.ENSPO00000345492, 9606.ENSPO00000346671, 9606.ENSPO00000361423, 9606.ENSPO00000362680, 9606.ENSPO00000376345, 9606.ENSPO00000397297, 9606.ENSPO00000401303, 9606.ENSPO00000414303, 9606.ENSPO00000440273, 9606.ENSPO00000447241, 9606.ENSPO00000469455, 9606.ENSPO00000480012, 9606.ENSPO00000482457	SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2

GO:0023051	Regulation of signaling	17	3367	0.68	2.29e-07	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0009967	Positive regulation of signal transduction	13	1525	0.9	3.31e-07	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, ADORA2A, PLCG2
GO:0043408	Regulation of MAPK cascade	10	668	1.15	4.04e-07	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000482457	SHC2, NTRK2, SH2B3, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, FRS2, PLCG2
GO:0009966	Regulation of signal transduction	16	2978	0.7	5.19e-07	9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000480012,	SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, ADORA2A, PLCG2

9606.ENSP00000482457

GO:0042325	Regulation of phosphorylation	12	1251	0.95	5.28e-07	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	NTRK2, IRS1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0038093	Fc receptor signaling pathway	5	51	1.96	1.62e-06	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, FYN, ABL1, SRC, PLCG2
GO:0048583	Regulation of response to stimulus	17	3931	0.61	1.71e-06	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, ADORA2A, PLCG2
GO:0001932	Regulation of protein phosphorylation	11	1108	0.97	1.91e-06	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	NTRK2, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, NTF4, ADORA2A, PLCG2

GO:0050730	Regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	7	259	1.4	3.53e-06	9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000482457, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241,	SH2B3, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, PLCG2
GO:0007611	Learning or memory	7	271	1.38	4.50e-06	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241,	NTRK2, FYN, ABL1, SRC, NTF3, BDNF, NTF4
GO:0050804	Modulation of chemical synaptic transmission	8	436	1.24	4.50e-06	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241,	NTRK2, FYN, ABL1, SRC, NTF3, BDNF, NTF4, ADORA2A
GO:0008284	Positive regulation of cell population proliferation	10	945	1.0	6.22e-06	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241,	PLCG1, NTRK2, IRS1, SHC4, ABL1, SRC, MATK, NTF3, SHC1, FRS2
GO:0010941	Regulation of cell death	12	1651	0.83	7.34e-06	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241,	PLCG1, NTRK2, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0042127	Regulation of cell population proliferation	12	1669	0.83	8.08e-06	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241,	PLCG1, NTRK2, IRS1, SHC4, SH2B3, ABL1, SRC, MATK, NTF3, SHC1, FRS2, ADORA2A

						9606.ENSF00000480012	
GO:0043410	Positive regulation of MAPK cascade	8	481	1.19	8.11e-06	9606.ENSF00000264554, 9606.ENSF00000277120, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000397297, 9606.ENSF00000401303, 9606.ENSF00000447241, 9606.ENSF00000482457	SHC2, NTRK2, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, FRS2, PLCG2
GO:0060548	Negative regulation of cell death	10	1016	0.97	1.08e-05	9606.ENSF00000277120, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000397297, 9606.ENSF00000401303, 9606.ENSF00000414303, 9606.ENSF00000469455, 9606.ENSF00000480012, 9606.ENSF00000482457	NTRK2, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:1902531	Regulation of intracellular signal transduction	12	1726	0.81	1.08e-05	9606.ENSF00000264554, 9606.ENSF00000277120, 9606.ENSF00000345492, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000376345, 9606.ENSF00000397297, 9606.ENSF00000401303, 9606.ENSF00000440273, 9606.ENSF00000447241, 9606.ENSF00000482457	SHC2, NTRK2, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, SH2B2, FRS2, PLCG2
GO:0048518	Positive regulation of biological process	19	6207	0.46	1.11e-05	9606.ENSF00000244007, 9606.ENSF00000264554, 9606.ENSF00000277120, 9606.ENSF00000304895, 9606.ENSF00000321221, 9606.ENSF00000329668, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000376345, 9606.ENSF00000378485, 9606.ENSF00000397297, 9606.ENSF00000401303, 9606.ENSF00000414303, 9606.ENSF00000440273, 9606.ENSF00000447241, 9606.ENSF00000469455,	PLCG1, SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, SHC4, FYN, ABL1, SRC, GRB2, MATK, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2

						9606.ENSF00000480012, 9606.ENSF00000482457	
GO:1901214	Regulation of neuron death	7	324	1.31	1.17e-05	9606.ENSF00000277120, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000397297, 9606.ENSF00000414303, 9606.ENSF00000469455, 9606.ENSF00000480012 9606.ENSF00000244007, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000440273, 9606.ENSF00000482457 9606.ENSF00000244007, 9606.ENSF00000264554, 9606.ENSF00000277120, 9606.ENSF00000304895, 9606.ENSF00000321221, 9606.ENSF00000329668, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000376345, 9606.ENSF00000378485, 9606.ENSF00000397297, 9606.ENSF00000401303, 9606.ENSF00000414303, 9606.ENSF00000447241, 9606.ENSF00000469455, 9606.ENSF00000480012, 9606.ENSF00000482457 9606.ENSF00000277120, 9606.ENSF00000304895, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000397297, 9606.ENSF00000414303, 9606.ENSF00000469455, 9606.ENSF00000482457	NTRK2, FYN, ABL1, NTF3, BDNF, NTF4, ADORA2A PLCG1, FYN, ABL1, SRC, SH2B2, PLCG2 PLCG1, SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, SHC4, FYN, ABL1, SRC, GRB2, MATK, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0002429	Immune response-activating cell surface receptor signaling pathway	6	197	1.46	1.80e-05		
GO:0048522	Positive regulation of cellular process	18	5584	0.48	2.37e-05		
GO:0042327	Positive regulation of phosphorylation	9	826	1.01	2.44e-05		

GO:0071417	Cellular response to organonitrogen compound	8	574	1.12	2.45e-05	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000480012	NTRK2, IRS1, FYN, ABL1, SRC, GRB2, SHC1, SH2B2 PLCG1, NTRK2, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2 NTRK2, ABL1, NTF3, BDNF, NTF4, ADORA2A NTRK2, FYN, ABL1, SRC, NTF3, BDNF, NTF4, ADORA2A NTRK2, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0043067	Regulation of programmed cell death	11	1492	0.84	2.53e-05		
GO:0043523	Regulation of neuron apoptotic process	6	216	1.42	2.65e-05		
GO:0007610	Behavior	8	598	1.1	3.15e-05		
GO:0043069	Negative regulation of programmed cell death	9	911	0.97	4.74e-05		
GO:1990090	Cellular response to nerve growth factor stimulus	4	47	1.9	5.81e-05		
GO:0010243	Response to organonitrogen compound	9	963	0.94	6.97e-05		

GO:0050851	Antigen receptor-mediated signaling pathway	5	141	1.52	9.04e-05	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273	PLCG1, FYN, ABL1, SH2B2, PLCG2
GO:1902533	Positive regulation of intracellular signal transduction	9	997	0.93	9.04e-05	9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273	SHC2, NTRK2, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, FRS2, PLCG2
GO:0048731	System development	15	3867	0.56	9.37e-05	9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273	NTRK2, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, SHC3, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0032869	Cellular response to insulin stimulus	5	148	1.5	0.00011	9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273	IRS1, SRC, GRB2, SHC1, SH2B2
GO:0038180	Nerve growth factor signaling pathway	3	12	2.37	0.00011	9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012	NTF3, BDNF, NTF4
GO:0001934	Positive regulation of protein phosphorylation	8	747	1.0	0.00013	9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012	NTRK2, FYN, ABL1, SRC, NTF3, BDNF, NTF4, PLCG2
GO:0043524	Negative regulation of neuron apoptotic process	5	153	1.49	0.00013	9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012	NTRK2, NTF3, BDNF, NTF4, ADORA2A

GO:0051130	Positive regulation of cellular component organization	9	1049	0.91	0.00013	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000482457, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273	NTRK2, SH2B1, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, BDNF, PLCG2
GO:1901653	Cellular response to peptide	6	302	1.27	0.00013	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273	IRS1, FYN, SRC, GRB2, SHC1, SH2B2
GO:1901701	Cellular response to oxygen-containing compound	9	1057	0.9	0.00013	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000482457	NTRK2, IRS1, FYN, ABL1, SRC, GRB2, SHC1, SH2B2, PLCG2
GO:0008286	Insulin receptor signaling pathway	4	64	1.77	0.00015	9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303,	IRS1, GRB2, SHC1, SH2B2
GO:0043549	Regulation of kinase activity	8	778	0.98	0.00016	9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303,	NTRK2, IRS1, SH2B3, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, ADORA2A
GO:0042981	Regulation of apoptotic process	10	1462	0.81	0.00017	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303,	PLCG1, NTRK2, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, NTF4, ADORA2A
GO:0030154	Cell differentiation	14	3507	0.57	0.00021	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303,	NTRK2, SHC4, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2

						9606.ENSPP00000440273, 9606.ENSPP00000447241, 9606.ENSPP00000469455, 9606.ENSPP00000480012, 9606.ENSPP00000482457	
GO:0050731	Positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	5	194	1.38	0.00032	9606.ENSPP00000346671, 9606.ENSPP00000361423, 9606.ENSPP00000362680, 9606.ENSPP00000397297, 9606.ENSPP00000482457	FYN, ABL1, SRC, NTF3, PLCG2
GO:0007422	Peripheral nervous system development	4	84	1.65	0.00037	9606.ENSPP00000277120, 9606.ENSPP00000397297, 9606.ENSPP00000414303, 9606.ENSPP00000469455	NTRK2, NTF3, BDNF, NTF4
GO:0038096	Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis	3	21	2.13	0.00037	9606.ENSPP00000346671, 9606.ENSPP00000361423, 9606.ENSPP00000362680	FYN, ABL1, SRC
GO:0043066	Negative regulation of apoptotic process	8	891	0.93	0.00038	9606.ENSPP00000277120, 9606.ENSPP00000361423, 9606.ENSPP00000362680, 9606.ENSPP00000397297, 9606.ENSPP00000401303, 9606.ENSPP00000414303, 9606.ENSPP00000469455, 9606.ENSPP00000480012	NTRK2, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, NTF4, ADORA2A
GO:0002223	Stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway	3	22	2.11	0.00040	9606.ENSPP00000346671, 9606.ENSPP00000362680, 9606.ENSPP00000482457	FYN, SRC, PLCG2
GO:0051050	Positive regulation of transport	8	915	0.91	0.00043	9606.ENSPP00000244007, 9606.ENSPP00000304895, 9606.ENSPP00000346671, 9606.ENSPP00000361423, 9606.ENSPP00000362680, 9606.ENSPP00000397297, 9606.ENSPP00000480012, 9606.ENSPP00000482457	PLCG1, IRS1, FYN, ABL1, SRC, NTF3, ADORA2A, PLCG2
GO:0022603	Regulation of anatomical structure morphogenesis	8	920	0.91	0.00044	9606.ENSPP00000244007, 9606.ENSPP00000277120, 9606.ENSPP00000346671, 9606.ENSPP00000361423, 9606.ENSPP00000362680, 9606.ENSPP00000401303, 9606.ENSPP00000414303, 9606.ENSPP00000447241	PLCG1, NTRK2, FYN, ABL1, SRC, SHC1, BDNF, FRS2

GO:0048468	Cell development	10	1719	0.74	0.00059	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012	NTRK2, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, NTF3, BDNF, FRS2, NTF4, ADORA2A
GO:0007399	Nervous system development	11	2188	0.67	0.00061	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012	NTRK2, FYN, ABL1, SRC, SHC3, NTF3, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, ADORA2A
GO:0002862	Negative regulation of inflammatory response to antigenic stimulus	3	27	2.02	0.00064	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000362680	PLCG1, FYN, SRC
GO:0050852	T cell receptor signaling pathway	4	103	1.56	0.00070	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012	PLCG1, FYN, ABL1, PLCG2
GO:0009653	Anatomical structure morphogenesis	11	2229	0.67	0.00071	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297,	NTRK2, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, NTF4, ADORA2A
GO:0050794	Regulation of cellular process	21	11025	0.25	0.00075	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000264554, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000378485, 9606.ENSP00000397297,	PLCG1, SHC2, NTRK2, IRS1, SH2B1, SHC4, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, SHC3, GRB2, MATK, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2

						9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	
GO:000902	Cell morphogenesis	7	708	0.97	0.00084	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012 9606.ENSP00000277120,	FYN, ABL1, SRC, NTF3, BDNF, NTF4, ADORA2A
GO:0033138	Positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	4	110	1.53	0.00084	9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455	NTRK2, NTF3, BDNF, NTF4
GO:0051924	Regulation of calcium ion transport	5	266	1.25	0.0011	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, FYN, ABL1, ADORA2A, PLCG2
GO:0032502	Developmental process	16	5657	0.42	0.0013	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	NTRK2, SHC4, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, SHC3, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0044089	Positive regulation of cellular component biogenesis	6	500	1.05	0.0015	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000482457	NTRK2, ABL1, SRC, GRB2, BDNF, PLCG2

GO:0048699	Generation of neurons	8	1131	0.82	0.0017	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012	NTRK2, FYN, ABL1, NTF3, BDNF, FRS2, NTF4, ADORA2A
GO:0001922	B-1 B cell homeostasis	2	4	2.67	0.0021	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000440273	ABL1, SH2B2
GO:0065009	Regulation of molecular function	12	3085	0.56	0.0021	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	NTRK2, IRS1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, ADORA2A, PLCG2
GO:2000377	Regulation of reactive oxygen species metabolic process	4	143	1.42	0.0021	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000482457	FYN, GRB2, SHC1, PLCG2
GO:0050728	Negative regulation of inflammatory response	4	147	1.41	0.0022	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000480012	PLCG1, FYN, SRC, ADORA2A
GO:0010634	Positive regulation of epithelial cell migration	4	150	1.4	0.0024	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, ABL1, SRC, PLCG2
GO:0010976	Positive regulation of neuron projection development	4	154	1.39	0.0026	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000414303	NTRK2, FYN, ABL1, BDNF
GO:0031547	Brain-derived neurotrophic factor receptor signaling pathway	2	5	2.57	0.0027	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000414303	NTRK2, BDNF
GO:0050853	B cell receptor signaling pathway	3	50	1.75	0.0028	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000482457	ABL1, SH2B2, PLCG2
GO:0031346	Positive regulation of cell projection organization	5	347	1.13	0.0033	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000414303	NTRK2, FYN, ABL1, SRC, BDNF
GO:0006909	Phagocytosis	4	173	1.34	0.0038	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680,	FYN, ABL1, SRC, ADORA2A

						9606.ENSF00000480012	
GO:0050727	Regulation of inflammatory response	5	371	1.1	0.0044	9606.ENSF00000244007, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000480012, 9606.ENSF00000482457	PLCG1, FYN, SRC, ADORA2A, PLCG2
GO:0032101	Regulation of response to external stimulus	7	964	0.83	0.0049	9606.ENSF00000244007, 9606.ENSF00000345492, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000397297, 9606.ENSF00000480012, 9606.ENSF00000482457	PLCG1, SH2B3, FYN, SRC, NTF3, ADORA2A, PLCG2
GO:1903169	Regulation of calcium ion transmembrane transport	4	186	1.3	0.0050	9606.ENSF00000244007, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000482457	PLCG1, FYN, ABL1, PLCG2
GO:0046777	Protein autophosphorylation	4	189	1.3	0.0052	9606.ENSF00000277120, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680	NTRK2, FYN, ABL1, SRC
GO:0032102	Negative regulation of response to external stimulus	5	387	1.08	0.0053	9606.ENSF00000244007, 9606.ENSF00000345492, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000480012	PLCG1, SH2B3, FYN, SRC, ADORA2A
GO:0050798	Activated T cell proliferation	2	8	2.37	0.0053	9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423	FYN, ABL1
GO:0045859	Regulation of protein kinase activity	6	663	0.93	0.0057	9606.ENSF00000345492, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000397297, 9606.ENSF00000401303, 9606.ENSF00000480012	SH2B3, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, ADORA2A
GO:0070301	Cellular response to hydrogen peroxide	3	66	1.63	0.0057	9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680	FYN, ABL1, SRC
GO:1901888	Regulation of cell junction assembly	4	201	1.27	0.0063	9606.ENSF00000277120, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000414303	NTRK2, ABL1, SRC, BDNF
GO:0050790	Regulation of catalytic activity	10	2370	0.6	0.0067	9606.ENSF00000277120, 9606.ENSF00000304895, 9606.ENSF00000345492, 9606.ENSF00000346671, 9606.ENSF00000361423, 9606.ENSF00000362680, 9606.ENSF00000397297, 9606.ENSF00000401303, 9606.ENSF00000447241, 9606.ENSF00000480012	NTRK2, IRS1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, FRS2, ADORA2A

GO:0051881	Regulation of mitochondrial membrane potential	3	71	1.6	0.0067	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000480012	ABL1, SRC, ADORA2A
GO:0050877	Nervous system process	8	1423	0.72	0.0068	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012	NTRK2, FYN, ABL1, SRC, NTF3, BDNF, NTF4, ADORA2A
GO:0007417	Central nervous system development	7	1035	0.8	0.0070	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000364995, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000480012	NTRK2, FYN, ABL1, SRC, SHC3, FRS2, ADORA2A
GO:0030100	Regulation of endocytosis	4	209	1.25	0.0070	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000482457	ABL1, SRC, NTF3, PLCG2
GO:0050807	Regulation of synapse organization	4	209	1.25	0.0070	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000414303	NTRK2, FYN, ABL1, BDNF
GO:0051248	Negative regulation of protein metabolic process	7	1038	0.8	0.0070	9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000480012	NTRK2, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, NTF3, ADORA2A
GO:0030182	Neuron differentiation	7	1062	0.79	0.0080	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012	NTRK2, FYN, ABL1, NTF3, BDNF, NTF4, ADORA2A
GO:0051240	Positive regulation of multicellular organismal process	8	1505	0.7	0.0096	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, NTRK2, ABL1, SRC, BDNF, FRS2, ADORA2A, PLCG2
GO:0050793	Regulation of developmental process	10	2492	0.58	0.0097	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297,	PLCG1, NTRK2, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, NTF4

						9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455	
GO:0021675	Nerve development	3	85	1.52	0.0103	9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455	NTF3, BDNF, NTF4
GO:0034764	Positive regulation of transmembrane transport	4	236	1.2	0.0103	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423,	PLCG1, IRS1, ABL1, PLCG2
GO:0120036	Plasma membrane bounded cell projection organization	7	1112	0.77	0.0103	9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000329668, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423,	SH2B1, FYN, ABL1, NTF3, BDNF, NTF4, ADORA2A
GO:0019222	Regulation of metabolic process	16	6784	0.34	0.0108	9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680,	NTRK2, IRS1, SH2B1, SHC4, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, SH2B2, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0031325	Positive regulation of cellular metabolic process	11	3114	0.52	0.0109	9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000482457 9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680,	NTRK2, IRS1, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, NTF4, PLCG2
GO:0007631	Feeding behavior	3	88	1.5	0.0111	9606.ENSP00000480012 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000440273	NTRK2, FYN, ADORA2A
GO:0001776	Leukocyte homeostasis	3	90	1.5	0.0117		SH2B3, ABL1, SH2B2

GO:0048812	Neuron projection morphogenesis	5	477	0.99	0.0117	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012	FYN, NTF3, BDNF, NTF4, ADORA2A
GO:0022407	Regulation of cell-cell adhesion	5	480	0.99	0.0119	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000480012	SH2B3, FYN, ABL1, SRC, ADORA2A
GO:0044093	Positive regulation of molecular function	8	1587	0.67	0.0126	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000482457	NTRK2, IRS1, FYN, ABL1, SRC, NTF3, BDNF, PLCG2
GO:0033674	Positive regulation of kinase activity	5	494	0.98	0.0131	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297	NTRK2, IRS1, ABL1, SRC, NTF3
GO:1904427	Positive regulation of calcium ion transmembrane transport	3	96	1.47	0.0135	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, ABL1, PLCG2
GO:0048585	Negative regulation of response to stimulus	8	1612	0.67	0.0137	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000480012	PLCG1, IRS1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, BDNF, ADORA2A
GO:0032879	Regulation of localization	9	2103	0.6	0.0140	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, IRS1, FYN, ABL1, SRC, NTF3, BDNF, ADORA2A, PLCG2
GO:0031400	Negative regulation of protein modification process	5	506	0.97	0.0143	9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000480012	SH2B3, FYN, ABL1, NTF3, ADORA2A
GO:0010638	Positive regulation of organelle organization	5	508	0.97	0.0144	9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297	SH2B1, ABL1, SRC, GRB2, NTF3

GO:0048519	Negative regulation of biological process	14	5313	0.39	0.0144	9606.ENSPO0000244007, 9606.ENSPO0000277120, 9606.ENSPO0000304895, 9606.ENSPO0000345492, 9606.ENSPO0000346671, 9606.ENSPO0000361423, 9606.ENSPO0000362680, 9606.ENSPO0000397297, 9606.ENSPO0000401303, 9606.ENSPO0000414303, 9606.ENSPO0000447241, 9606.ENSPO0000469455, 9606.ENSPO0000480012, 9606.ENSPO0000482457	PLCG1, NTRK2, IRS1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0048666	Neuron development	6	840	0.83	0.0161	9606.ENSPO0000277120, 9606.ENSPO0000346671, 9606.ENSPO0000397297, 9606.ENSPO0000414303, 9606.ENSPO0000469455, 9606.ENSPO0000480012	NTRK2, FYN, NTF3, BDNF, NTF4, ADORA2A
GO:0051348	Negative regulation of transferase activity	4	274	1.14	0.0161	9606.ENSPO0000345492, 9606.ENSPO0000361423, 9606.ENSPO0000362680, 9606.ENSPO0000480012	SH2B3, ABL1, SRC, ADORA2A
GO:1901890	Positive regulation of cell junction assembly	3	104	1.43	0.0161	9606.ENSPO0000277120, 9606.ENSPO0000361423, 9606.ENSPO0000414303	NTRK2, ABL1, BDNF
GO:0030335	Positive regulation of cell migration	5	529	0.95	0.0167	9606.ENSPO0000244007, 9606.ENSPO0000361423, 9606.ENSPO0000362680, 9606.ENSPO0000397297, 9606.ENSPO0000482457	PLCG1, ABL1, SRC, NTF3, PLCG2
GO:0038083	Peptidyl-tyrosine autophosphorylation	2	18	2.02	0.0167	9606.ENSPO0000361423, 9606.ENSPO0000362680	ABL1, SRC
GO:0010035	Response to inorganic substance	5	532	0.95	0.0170	9606.ENSPO0000346671, 9606.ENSPO0000361423, 9606.ENSPO0000362680, 9606.ENSPO0000480012, 9606.ENSPO0000482457	FYN, ABL1, SRC, ADORA2A, PLCG2
GO:0043270	Positive regulation of ion transport	4	286	1.12	0.0182	9606.ENSPO0000244007, 9606.ENSPO0000361423, 9606.ENSPO0000480012, 9606.ENSPO0000482457	PLCG1, ABL1, ADORA2A, PLCG2
GO:0051239	Regulation of multicellular organismal process	10	2749	0.53	0.0182	9606.ENSPO0000244007, 9606.ENSPO0000277120, 9606.ENSPO0000345492, 9606.ENSPO0000361423, 9606.ENSPO0000362680, 9606.ENSPO0000401303, 9606.ENSPO0000414303, 9606.ENSPO0000447241, 9606.ENSPO0000480012,	PLCG1, NTRK2, SH2B3, ABL1, SRC, SHC1, BDNF, FRS2, ADORA2A, PLCG2

						9606.ENSP00000482457	
GO:2000251	Positive regulation of actin cytoskeleton reorganization	2	19	1.99	0.0182	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000397297	ABL1, NTF3
GO:2000811	Negative regulation of anoikis	2	19	1.99	0.0182	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000362680	NTRK2, SRC
GO:0007162	Negative regulation of cell adhesion	4	289	1.11	0.0186	9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000480012	SH2B3, ABL1, SRC, ADORA2A
GO:0030036	Actin cytoskeleton organization	5	547	0.93	0.0187	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000440273	ABL1, SRC, GRB2, SHC1, SH2B2
GO:0060627	Regulation of vesicle-mediated transport	5	551	0.93	0.0192	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	ABL1, SRC, NTF3, ADORA2A, PLCG2
GO:0048523	Negative regulation of cellular process	13	4736	0.41	0.0193	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000447241, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	NTRK2, IRS1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, NTF3, SHC1, BDNF, FRS2, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0070372	Regulation of ERK1 and ERK2 cascade	4	299	1.1	0.0206	9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000447241	ABL1, SRC, SHC1, FRS2
GO:0046628	Positive regulation of insulin receptor signaling pathway	2	22	1.93	0.0223	9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000362680	IRS1, SRC
GO:0007613	Memory	3	121	1.37	0.0224	9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455	NTF3, BDNF, NTF4
GO:0038095	Fc-epsilon receptor signaling pathway	2	23	1.91	0.0240	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, PLCG2

GO:0034762	Regulation of transmembrane transport	5	587	0.9	0.0243	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, IRS1, FYN, ABL1, PLCG2
GO:0010942	Positive regulation of cell death	5	590	0.9	0.0248	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000480012	PLCG1, FYN, ABL1, SRC, ADORA2A
GO:0036120	Cellular response to platelet-derived growth factor stimulus	2	24	1.89	0.0255	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000362680	FYN, SRC
GO:0001933	Negative regulation of protein phosphorylation	4	326	1.06	0.0266	9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000480012	SH2B3, ABL1, NTF3, ADORA2A
GO:0031323	Regulation of cellular metabolic process	14	5681	0.36	0.0266	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000401303, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000469455, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	NTRK2, IRS1, SH2B1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, GRB2, NTF3, SHC1, BDNF, NTF4, ADORA2A, PLCG2
GO:0051282	Regulation of sequestering of calcium ion	3	130	1.34	0.0266	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, ABL1, PLCG2
GO:0080134	Regulation of response to stress	7	1373	0.68	0.0278	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, ADORA2A, PLCG2
GO:0002092	Positive regulation of receptor internalization	2	28	1.83	0.0319	9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000482457	NTF3, PLCG2
GO:0120035	Regulation of plasma membrane bounded cell projection organization	5	635	0.87	0.0322	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000414303	NTRK2, FYN, ABL1, SRC, BDNF

GO:0045787	Positive regulation of cell cycle	4	349	1.03	0.0325	9606.ENSP00000321221, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000482457	SH2B1, ABL1, SRC, PLCG2
GO:0032148	Activation of protein kinase B activity	2	29	1.81	0.0333	9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297	SRC, NTF3
GO:0065008	Regulation of biological quality	11	3654	0.45	0.0337	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000304895, 9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000376345, 9606.ENSP00000414303, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	NTRK2, IRS1, SH2B3, FYN, ABL1, SRC, GRB2, BDNF, SH2B2, ADORA2A, PLCG2
GO:0051336	Regulation of hydrolase activity	6	1011	0.75	0.0345	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000480012	NTRK2, FYN, ABL1, SRC, NTF3, ADORA2A
GO:0002682	Regulation of immune system process	7	1438	0.66	0.0347	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000440273, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, FYN, ABL1, SRC, SH2B2, ADORA2A, PLCG2
GO:0007612	Learning	3	149	1.28	0.0355	9606.ENSP00000277120, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423	NTRK2, FYN, ABL1
GO:0050865	Regulation of cell activation	5	658	0.85	0.0361	9606.ENSP00000345492, 9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000480012	SH2B3, FYN, ABL1, SRC, ADORA2A
GO:0071560	Cellular response to transforming growth factor beta stimulus	3	151	1.27	0.0366	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680	FYN, ABL1, SRC
GO:0040012	Regulation of locomotion	6	1032	0.74	0.0374	9606.ENSP00000244007, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000397297, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	PLCG1, ABL1, SRC, NTF3, ADORA2A, PLCG2
GO:1903037	Regulation of leukocyte cell-cell adhesion	4	368	1.01	0.0375	9606.ENSP00000346671, 9606.ENSP00000361423, 9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000480012	FYN, ABL1, SRC, ADORA2A

GO:0050878	Regulation of body fluid levels	4	371	1.0	0.0382	9606.ENSPO00000345492, 9606.ENSPO00000362680, 9606.ENSPO00000480012, 9606.ENSPO00000482457	SH2B3, SRC, ADORA2A, PLCG2
GO:0098751	Bone cell development	2	32	1.77	0.0382	9606.ENSPO00000345492, 9606.ENSPO00000362680	SH2B3, SRC
GO:0002252	Immune effector process	4	375	1.0	0.0394	9606.ENSPO00000346671, 9606.ENSPO00000361423, 9606.ENSPO00000362680, 9606.ENSPO00000482457	FYN, ABL1, SRC, PLCG2
GO:0048010	Vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway	2	33	1.75	0.0396	9606.ENSPO00000346671, 9606.ENSPO00000362680	FYN, SRC
GO:0050863	Regulation of T cell activation	4	376	1.0	0.0396	9606.ENSPO00000346671, 9606.ENSPO00000361423, 9606.ENSPO00000362680, 9606.ENSPO00000480012	FYN, ABL1, SRC, ADORA2A
GO:0061138	Morphogenesis of a branching epithelium	3	162	1.24	0.0426	9606.ENSPO00000362680, 9606.ENSPO00000376345, 9606.ENSPO00000447241	SRC, GRB2, FRS2
GO:0071900	Regulation of protein serine/threonine kinase activity	4	386	0.99	0.0428	9606.ENSPO00000345492, 9606.ENSPO00000361423, 9606.ENSPO00000362680, 9606.ENSPO00000397297	SH2B3, ABL1, SRC, NTF3
GO:0001775	Cell activation	5	693	0.83	0.0429	9606.ENSPO00000346671, 9606.ENSPO00000361423, 9606.ENSPO00000362680, 9606.ENSPO00000480012, 9606.ENSPO00000482457	FYN, ABL1, SRC, ADORA2A, PLCG2
GO:0043552	Positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity	2	35	1.73	0.0433	9606.ENSPO00000304895, 9606.ENSPO00000362680	IRS1, SRC
GO:0071398	Cellular response to fatty acid	2	35	1.73	0.0433	9606.ENSPO00000304895, 9606.ENSPO00000362680	IRS1, SRC
GO:0030900	Forebrain development	4	391	0.98	0.0442	9606.ENSPO00000277120, 9606.ENSPO00000346671, 9606.ENSPO00000362680, 9606.ENSPO00000447241	NTRK2, FYN, SRC, FRS2
GO:0051896	Regulation of protein kinase B signaling	3	166	1.23	0.0445	9606.ENSPO00000277120, 9606.ENSPO00000345492, 9606.ENSPO00000362680	NTRK2, SH2B3, SRC
GO:0032743	Positive regulation of interleukin-2 production	2	36	1.72	0.0448	9606.ENSPO00000361423, 9606.ENSPO00000482457	ABL1, PLCG2
GO:0051154	Negative regulation of striated muscle cell differentiation	2	36	1.72	0.0448	9606.ENSPO00000414303, 9606.ENSPO00000447241	BDNF, FRS2

GO:1904707	Positive regulation of vascular associated smooth muscle cell proliferation	2	36	1.72	0.0448	9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000447241	SRC, FRS2
GO:0007596	Blood coagulation	3	173	1.21	0.0483	9606.ENSP00000362680, 9606.ENSP00000480012, 9606.ENSP00000482457	SRC, ADORA2A, PLCG2

ARTIGO 3

Formatado de acordo com as normas científicas do periódico Clinical Nutrition

Breastfeeding, early-life feeding practices and adolescent gut microbiota: long-term associations in a Southern Brazilian birth cohort

Etiene Dias Alves – MD, PhD student in Postgraduate Program in Epidemiology. Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil. etienediasnutri@gmail.com. ORCID 0000-0002-1185-8972;

Marina Xavier Carpena – PhD, Post Doctoral Research Fellow in the Postgraduate Program in Epidemiology. Federal University of Pelotas, Pelotas, Brasil. marinacarpa_@hotmail.com. ORCID 0000-0002-4690-5791;

Isabel Oliveira Bierhals – PhD, Post Doctoral Research Fellow in the Postgraduate Program in Epidemiology. Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil. isabelbierhals@hotmail.com. ORCID 0000-0002-8739-8669;

Alicia Matijasevich – Associate Professor in the Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. alicia.matijasevich@usp.br. ORCID 0000-0003-0060-1589;

Aluisio J D Barros – Associate Professor in the Postgraduate Program in Epidemiology. Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil. abarros.epi@gmail.com. ORCID: 0000-0002-2022-8729;

Iná S. Santos - PhD, Full Professor in the Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; inasantos.epi@gmail.com; ORCID 0000-0003-1258-9249;

Lorena López-Dominguez – PhD, Researcher in the Department of Nutritional Sciences, Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, ON, Canada; Translational Medicine Program, Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada. l.lopezdominguez@mail.utoronto.ca. ORCID 0000-0002-5889-3986;

Elena M Comelli - PhD, Associate Professor in the Department of Nutritional Sciences, Faculty of Medicine, University of Toronto, ON, Canada. Joannah and Brian Lawson Centre for Child Nutrition, Faculty of Medicine, University of Toronto, ON, Canada; University of Toronto, Toronto, Canada. elena.comelli@utoronto.ca. ORCID: 0000-0002-5201-5437;

Robert H J Bandsma - Department of Nutritional Sciences, Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, ON, Canada. Translational Medicine Program, Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada. robert.bandsma@sickkids.ca. ORCID: 0000-0001-6358-4750;

Dulcinea Blum-Menezes – PhD, Associate Professor in the Department of Microbiology and Parasitology. University of Pelotas, Pelotas, Brazil. dulceblumen@gmail.com. ORCID: 0000-0002-3484-8216;

Maria Carolina Borges - PhD, Associate Professor at the MRC Integrative Epidemiology Unit at the University of Bristol, Bristol, UK; Population Health Sciences, Bristol Medical School, University of Bristol, Bristol, UK. m.c.borges@bristol.ac.uk. ORCID 0000-0001-7785-4547;

Luciana Tovo-Rodrigues - PhD, Associate Professor in the Postgraduate Program in Epidemiology. Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil. luciana.tovo@gmail.com. ORCID 0000-0002-8732-6059.

Abstract

Breastfeeding plays a critical role in shaping the infant gut microbiome by promoting the growth of beneficial bacteria essential for intestinal health, however, its long-term impact remains poorly elucidated. This study investigates the association between breastfeeding practices and gut microbiota diversity and composition in adolescence. We analyzed data from 362 participants in the 2004 Pelotas Birth Cohort, with breastfeeding history at three months as the primary exposure. Additional exposures included breastfeeding duration and timing and type complementary food introduction. Gut microbiota was assessed at 12 years through 16S rRNA gene sequencing (V3-V4 region) of DNA from fecal samples. Alpha (Chao1, Simpson, Shannon) and beta diversity (weighted and unweighted UniFrac) metrics, alongside relative taxonomic abundances, were evaluated as primary outcomes. No significant differences were observed in microbial diversity between exclusive breastfed (EBF), mixed feeding and non-breastfed groups at three months. However, relative abundance analyses suggested associations between breastfeeding patterns at three months and specific bacterial taxa. Non-breastfed children exhibited a higher relative abundance of *Ruminococcus* ($\beta = 0.47$; 95% CI: 0.10–0.69) compared to EBF, while mixed feeding and no breastfeeding were associated with increased odds of *Eubacterium* detection at 12 years (OR = 2.21; 95% CI: 1.18–4.11). These associations did not remain significant after multiple testing correction. Additionally, early introduction of liquids (<6 months) was associated with higher *Ruminococcus* abundance ($\beta = 0.45$; 95% CI: 0.14–0.76), whereas early introduction of semi-solid foods was linked to greater odds of *Eubacterium* presence (OR = 1.882; 95% CI: 1.02–3.48). Although breastfeeding and early dietary practices may exert lasting effects on adolescent gut microbiota composition, these associations appear modest. Further research with larger cohorts and multi-omics approaches is needed to clarify the underlying mechanisms and clinical implications.

Introduction

The gut microbiota is essential for human health, modulating immune system maturation, metabolic processes, and defense against pathogens throughout life (Sekirov, Russell, Caetano, Antunes, & Finlay, 2010). The main microbial exposure happens at birth and undergoes dynamic changes through childhood shaped by multiple environmental factors (Azad et al., 2016; Bokulich et al., 2016; Penders et al., 2005). Dietary exposures play a key role in this process, beginning with breastfeeding or formula feeding and continuing with the introduction of complementary foods and the transition to a diverse solid diet (Catassi et al., 2024).

Breastfeeding is thought to play an important role in the early development of the gut microbiota (Azad et al., 2016). Breast milk contains bioactive compounds, including human milk oligosaccharides (HMOs), which act as prebiotics by promoting the growth of beneficial bacteria and enhancing the production of short-chain fatty acids (SCFAs), essential for intestinal health (Lordan et al., 2024; Moubareck, 2021). These compounds also provide essential nutrients that selectively support the proliferation of beneficial bacterial genera, such as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, which contribute to immune system modulation, pathogen inhibition, and digestive health (Forbes et al., 2018; Horta, Bahl, Martinés, Victora, & World Health, 2007; Rinne, Kalliomaki, Arvilommi, Salminen, & Isolauri, 2005; Šuligoj et al., 2020).

The World Health Organization (WHO) recommends exclusive breastfeeding (EBF) as the sole source of nutrition for the first six months of life due to its well-documented protective effects against morbidity and mortality (Ho et al., 2018; Hossain & Mahrshahi, 2022). EBF means that the infant receives only breast milk and no other liquids or solids. The gut microbiota of formula-fed infants resembles that of older children, exhibiting higher diversity compared to EBF infants, and a higher abundance of potentially pathogenic bacteria, including *Clostridium* and *Escherichia coli*, as observed in studies in Sweden and The Netherlands (Bäckhed et al., 2015; Penders et al., 2005).

The transition from EBF to complementary feeding, typically around six months of age, drives a shift in microbial composition from a milk-adapted community to a more complex and mature ecosystem, characterized by an increased presence of *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Roseburia*, *Clostridium*, and *Anaerostipes* (Palmer, Bik, DiGiulio, Relman, & Brown, 2007). The composition of the developing gut microbiota is strongly influenced by the diversity and quality of the dietary intake, with fiber-rich foods and novel protein sources—such as fruits, vegetables, and whole grains—supporting the expansion of beneficial bacteria and the production SCFAs (Fu, Zheng, Gao, & Xu,

2022; Zhang, 2022). A diverse gut microbiota in childhood has been associated with a reduced risk of obesity, allergies, and metabolic disorders later in life (Saeed, Al-Beltagi, Bediwy, El-Sawaf, & Toema, 2022).

Despite extensive research in early childhood, the long-term effects of breastfeeding and complementary feeding on gut microbiota, particularly during adolescence, remain poorly understood (Boudry et al., 2021; Bravi et al., 2016). Most studies have focused on the early years, leaving gaps in our understanding on the influence of breastfeeding on microbiota composition later in life. While some research has examined gut microbiota in children aged 40 days to 10 years old (Azad et al., 2016; Ma et al., 2020; Scheepers et al., 2015), these studies primarily address early developmental stages, with limited exploration of long-term impacts. Furthermore, much of the existing evidence is predominantly derived from high-income countries, with scarce data available for middle-income populations, such as Brazil.

This study aims to investigate the association between breastfeeding and the gut microbiota diversity and composition during adolescence. Specifically, we examine whether: (1) breastfeeding practices at three months of age modulate the gut microbiota diversity and composition at 12 years; (2) breastfeeding duration shapes gut microbiota composition; and (3) the timing and type of complementary food introduction influences the presence of specific bacterial taxa. By addressing these knowledge gaps, our findings will enhance the understanding of the long-term effects of early-life nutrition on gut microbiota, particularly in underrepresented middle-income populations.

Methodology

Study Design and Participants

The 2004 Pelotas Birth Cohort (Brazil) is a longitudinal, population-based, and prospective study. It included all newborns born to mothers who lived in urban area of Pelotas, from January 1 to December 31, 2004 totaling 4,231 newborns in the perinatal period (Santos et al., 2010; Santos et al., 2014). All participants were reassessed at various timepoints between the ages of 3 months ($n=3,985$; 95.7% retention) to 18 years ($n=3,489$; 85.0%), with different attrition rates (to review see Tovo-Rodrigues et al. (2024)). For the present study, we included participants who had breastfeeding and complementary feeding data collected at 3, 12, and 48 months. The follow-up rates of this follow-ups were 95.7%, 94.0%, and 92.0%, respectively. Gut microbiota data were collected from a substudy conducted at age 12 of the participants ($N = 366$). More details about these data and participants and data are described below.

Breastfeeding and complementary feeding indicators at 3, 12 and 48 months

At three and twelve months postpartum, the children were monitored at home, and a questionnaire was administered to the mothers or guardians by a trained interviewer. They were asked: “Is the child receiving breast milk?”, if the answer was yes, they were asked whether another food was also being offered. If the answer for the first question was no, they were asked until what age the child was breastfed. Based on the answers, the children were classified into three categories: (1) “not breastfed”, if they were not receiving breast milk at that age; (2) “exclusively breastfed”, if they were fed only breast milk, without ingestion of water or any other food; and (3) “mixed breastfeeding”, if they were receiving breast milk together with other types of milk, semi-solid or solid foods. At 48 months postpartum, the duration of breastfeeding was assessed by asking: “How long was the child breastfed?” The responses, initially recorded as continuous data, were categorized into three groups: 0–6.0 months, 6.1–12.0 months, and ≥ 12.1 months (Schneider et al., 2016).

At the 3- and 12- month follow-ups, mothers or guardians were asked to report the introduction of specific foods into the child's diet. At the 3-month follow-up, they reported whether the child had consumed a certain food in the last 24 hours. At 12 months, they responded whether foods from a predefined list were consumed “every day” or “almost every day” (Schneider et al., 2016). When the answer was affirmative, the age at which the food was introduced was recorded. Foods were classified according to their consistency as: liquids (cow's milk, powdered milk, tea, juice, yogurt, bean broth), semi-solids (porridge and soup) and solids (eggs, bread or biscuits, meat, beans [grains], rice, pasta, fruits and vegetables). The age at which complementary feeding was introduced was categorized into two groups: ≥ 6.0 months (reference category) and ≤ 5.9 months.

Subsample Selection and follow-up at 12 years old

In 2017, participants from the 2004 Pelotas Birth Cohort were invited to take part in a sub-study on the gut microbiome. The participants were selected from a subsample of 1,303 adolescents who had previously participated in an oral health sub-study (Peres et al., 2011). A female cohort participant who was pregnant was excluded. A two-step stratified sampling approach was employed, with oversampling of individuals at the extremes of the height-for-age and BMI-for-age distributions. This resulted in a final sample of 409 participants. The follow-up rate for the microbiome

sub-study was 75.6% (n = 366). Further details on the sample selection process can be found in previous publications (Alves et al., 2024; Carpena et al., 2024; López-Domínguez et al., 2023). One stool sample was self-collected by each participant at their home using the Stool Nucleic Acid Collection and Preservation Tube (Norgen Biotek® Thorold, ON, Canada). Trained interviewers administered questionnaires to participants and their parent or guardian covering health, socioeconomic, and demographic characteristics. A semi-quantitative 12-month Food Frequency Questionnaire (FFQ) was also administered through which participants indicated their frequency of consumption for several food items, with response options ranging from “never or less than once a month” to “5 or more times a day”.

Gut Microbiota data

The collected stool samples were sent to the Centre for Analysis of Genome Evolution and Function (CAGEF) at the University of Toronto, Canada, excluding one samples due to consent refusal. DNA was isolated using the ZymoBIOMICS DNA Miniprep kit and the V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified with specific primers for multiplex sequencing on the Illumina MiSeq system. OTU sequences were aligned using QIIME1 (v1.9.1), a version that has since been updated. The comprehensive protocol is detailed in previously published sources (Carpena et al., 2024; López-Domínguez et al., 2023). Alpha diversity (Chao1 diversity, Simpson's Diversity, and Shannon Evenness) and beta diversity metrics (Weighted and Unweighted UniFrac distances) were calculated using the QIIME2 software (Bolyen et al., 2019).

The taxa present in more than 20% of the sample were considered for relative abundance in this study, therefore, 79 genera and 8 phyla were included in the analyses. Taxa with at least 95% of non-zero counts were analyzed in a quantitative model (Q), after applying rank-based, inverse normal transformation. For taxa with more than 5% of zeros, the relative abundance was converted into a binary model (B) using hurdle analysis, where categories reflect presence (i.e. non-zero count) or absence (i.e. zero count). This is meant to address the challenge posed by a high prevalence of zeros prominent in microbiota data as per Hughes et al. (2020).

Confounders

We considered the following as potential confounders in our analyses: maternal characteristics at birth - total family income in quintiles (with the first quintile being the

poorest and the fifth being the wealthiest); smoking during pregnancy (yes or no); mother's age (< 24 years, 25-34 years and \geq 35 years) and participant's characteristics – sex (male or female); skin color (white, black, mixed, and others); gestational age categorized as preterm birth (\leq 37 weeks); full-term (38 to 41 weeks) and post-term birth (\geq 42 weeks); type of delivery (vaginal or c-section); birth weight in grams (<2,500; 2,500-3,499 and \geq 3,500) and use of antibiotics in the six months preceding biological sample collection at age 12 (yes or no). Daily food intake at 12-years was estimated by converting frequencies into annual consumption rates and divided by 365.25. Foods were further converted into grams and categorized into one of four levels of processing according to the NOVA classification (Monteiro et al., 2019): unprocessed or minimally processed foods, processed culinary ingredients, processed foods and ultra-processed foods.

Statistical Analyses

We used Fisher's exact test to investigate differences in characteristics between the exclusively breastfed and non-exclusively breastfed participants (never breastfed and mixed breastfeeding). Linear regression models were used to assess the relationship between breastfeeding (exclusive breastfeeding, mixed breastfeeding and no breastfeeding) and alpha diversity (Chao1 Index, Simpson Index, and Shannon Entropy). Non-normally distributed indices were log transformed (i.e. Simpson and Shannon Entropy). Coefficients were presented in beta, with 95% confidence interval (95% CI). Beta diversity was measured through distances of Unweighted UniFrac and Weighted UniFrac matrices from OTU tables generated in QIIME2 (Bolyen et al., 2019). The Adonis plugin (from the RStudio software, vegan package) was used to assess variance through 999 permutation tests (PERMANOVA). For the inverse normal transformation, we used the qnorm function in RStudio (2024.12.0+467 with R version) provided by the R package "stats".

The analyses between breastfeeding and gut microbiota composition at the phylum and genus levels were performed using linear and logistic models. For those taxa whose abundance was presented as a continuous variable (Q), linear regression was used, and for those presented as presence/absence, logistic regression was applied (B). We fitted three types of regression models: unadjusted ('crude'), adjusted for potential confounders (Adjusted^a), and additionally adjusted for four levels of processing food according to the NOVA classification (Adjusted^b). A False Discovery Rate (FDR) of 0.05 was used to adjust the p-values from each model and account for the burden of multiple testing. The analyses involving relative abundance were

performed in two stages using STATA 16.0 software (StataCorp., College Station, TX, USA). We first conducted a comprehensive association analysis between breastfeeding at three months and all selected taxa. For analyses involving breastfeeding duration and complementary food introduction, we focused only on the taxa that showed significant or nominal associations in the initial exploratory analysis.

Results

The sample comprised 362 participants with valid breastfeeding information at 3 month follow-up and gut microbiota data. Table 1 presents maternal and participant characteristics for both the full sample, and breastfeeding subgroups at 3 months: exclusive breastfeeding (N = 101), mixed breastfeeding (N = 185) and no breastfeeding (N = 76). Approximately 41.4% of participants were from families in the poorest income quintiles, predominantly from participants born at term (67.0%), via vaginal delivery (51.1%), mothers aged 24 or younger (47.5%) and who reported not having smoked during pregnancy (75.1%). Most were male (52.8%), reported being of white skin color (67.9%), born weighing between 2,500 and 3,499 grams (61.6%), and who did not report antibiotic use prior to fecal collection (78.4%). No statistical differences were found in the distribution of covariates between the subgroups.

Regarding alpha diversity metrics, we observed no significant differences in any of the three diversity indices analyzed according to breastfeeding pattern at 3 months ($P > 0.05$) (Table 2). Beta diversity results showed no statistically significant differences between the breastfed and non-breastfed groups, as indicated by the PERMANOVA analysis for both Unweighted UNIFRAC and Weighted UNIFRAC metrics. Based on the R^2 values reported, breastfeeding accounted for approximately 0.5% of the variability in beta diversity, as measured by these metrics. Supplementary Figure 1 illustrates these findings through principal coordinate analysis (PCoA).

Table 3 presents the taxa identified as associated with breastfeeding pattern at three months in the exploratory analysis ($P < 0.05$), with additional findings detailed in Supplementary Table 1. Before multiple testing corrections, breastfeeding pattern at three months was associated with the relative abundances of the genera *Eubacterium* and *Ruminococcus* (Supplementary Table 1). Infants who were not breastfed at three months exhibited a significantly higher relative abundance of *Ruminococcus* compared to those exclusively breastfed, with β estimates of 0.469 (95% CI: 0.17; 0.76) and 0.486 (95% CI: 0.19–0.78) in the first and second adjusted models, respectively. Additionally, breastfeeding pattern was associated with the presence of *Eubacterium* at 12 years of age. Both mixed breastfeeding and the absence of breastfeeding at three

months were linked to higher odds of detecting *Eubacterium* at this later time point. In adjusted models, mixed breastfeeding was associated with odds ratios (ORs) of 2.041 (95% CI: 1.07–3.90) and 2.041 (95% CI: 1.06; 3.92) in the first and second models, respectively. Similarly, the absence of breastfeeding was associated with adjusted ORs of 2.449 (95% CI: 1.07–5.61) and 2.361 (95% CI: 1.00–5.57) in the first and second models, respectively, when compared to exclusive breastfeeding. However, after correcting for multiple tests, none of these associations remained statistically significant in the exploratory analyses (Supplementary Table 1).

The two identified genera were retained for further analyses. We first examined the association between breastfeeding duration and the presence of these genera (Table 4). Infants who received exclusive or mixed breastfeeding between 6.1 and 12 months and ≥ 12.1 months had higher odds of *Eubacterium* detection at 12 years of age compared to those breastfed for six months or less, with ORs of 4.50 and 0.70 in the adjusted models, respectively. Further adjustments by variables from Adjusted^a and the foods categorized according to the NOVA classification at age 12, did not substantially impact the effect estimates. However, no clear association pattern was observed, as the confidence interval for the 6.1-12 months category included the unit. No statistically significant associations were observed for *Ruminococcus* (Table 4).

Table 5 presents the associations between the timing of complementary food introduction — group by liquids, semi-solids, and solids — and the relative abundances of *Eubacterium* and *Ruminococcus*. Variations in both the timing and type of food introduction were linked to shifts in the microbial composition of the analyzed genera. Early introduction of liquids (before six months) was significantly associated with an increased relative abundance of *Ruminococcus* at 12 years of age compared to later introduction (after six months), with β estimates of 0.452 (95% CI: 0.14–0.76) and 0.450 (95% CI: 0.13–0.77) in the first and second adjusted models, respectively. Although *Eubacterium* followed a similar trend, the associations did not reach statistical significance. For semi-solid foods, introduction before six months was positively associated with the presence of *Eubacterium* at 12 years, with an adjusted OR of 1.882 (95% CI: 1.02–3.48). Although *Ruminococcus* followed a similar direction, the associations did not reach statistical significance. No significant associations were observed between the timing of solid food introduction and the relative abundances of *Eubacterium* or *Ruminococcus* at 12 years of age.

Discussion

In this study, we explored the associations between breastfeeding pattern at the

three months and duration, and timing and type of complementary feeding with gut microbiota composition in Brazilian adolescents. Our findings suggest that breastfeeding during the first three months of life exerts a modest influence on the gut microbiota in adolescence. Although 0.5% of the variability in the gut microbiota composition in adolescence was accounted by breastfeeding in beta diversity metric, no significant differences in overall microbial diversity were detected. Children who received mixed breastfeeding or were not breastfed at three months exhibited higher relative abundances of the genera *Ruminococcus* and *Eubacterium* at 12 years of age, however these results were not sustained after multiple testing correction. Furthermore, the early introduction of liquids and semi-solid foods (before 6 months) was associated with an increased abundance of *Ruminococcus* and higher odds of *Eubacterium* detection during adolescence.

To our knowledge, this is the first study to investigate the long-term relationship between breastfeeding and gut microbiota composition, as previous research has primarily focused on early childhood (Azad et al., 2016; Ma et al., 2020). While existing literature suggests that exclusive breastfeeding and formula feeding lead to distinct microbial diversity patterns in early childhood, our analysis indicate that such changes may not persist into adolescence. Evidence indicates that mixed or formula feeding may increase microbial diversity in early life, with potential long-term effects on gut microbiota composition (Azad et al., 2016; Pannaraj et al., 2017), in samples aged between 40 days and 12 months. Azad et al. (2016) observed an inverse association between exclusive breastfeeding at three months and gut microbiota diversity in a cohort of 198 Canadian infants aged at 3 and 12 months. In contrast, Bokulich et al. (2016) found that formula-fed infants (age 12–24 months) exhibited significantly lower microbial diversity than predominantly breastfed infants, with notable differences in beta diversity. Yelverton et al. (2023) conducted a secondary analysis of randomized trial data and found that exclusive breastfeeding was significantly associated with beta diversity in 1-month-old infants, as assessed by the Bray-Curtis dissimilarity measure, even after adjusting for key covariates such as mode of delivery, maternal age, and pre-gestational BMI. This association remained robust following multiple testing correction. These findings underscore the complexity of the relationship between breastfeeding and gut microbiota diversity. It is possible that the impact of breastfeeding on microbial diversity diminishes over time (Ho et al., 2018; Sugino, Ma, Kerver, Paneth, & Comstock, 2020), with early-life influences progressively waning by adolescence (Hoskinson et al., 2023).

Our findings align with previous studies showing that formula-fed infants exhibit elevated levels of *Ruminococcus* compared to breastfed infants aged between 40 days

and 5 months (Ma et al., 2020; Odiase et al., 2023). Formula feeding has also linked to higher levels of *Streptococcus*, *Enterococcus*, and unclassified *Ruminococcaceae* as well as larger infant size, elevated serum insulin, and increased amino acid levels (Ma et al., 2020; Odiase et al., 2023; Pannaraj et al., 2017). These microbiota differences may influence growth patterns, as *Ruminococcaceae* abundance has been positively correlated with weight-for-age and length-for-age z-scores at infants (Odiase et al., 2023). Similarly, our findings suggest that the absence of breastfeeding or the practice of mixed feeding during the first three months of life is associated with a greater odd of detecting *Eubacterium* in the adolescent gut microbiota. Although research on *Eubacterium* remains limited, this result aligns with a meta-analysis of 684 infants ≤ 6 months of age, which brings together estimates from seven published studies on the microbiome (Ho et al., 2018). The results reported a sustained increase in *Eubacterium* among non-breastfed infants under six months of age. Moreover, previous studies have demonstrated that formula-fed infants exhibit an early-life enrichment of *Firmicutes*, the phylum to which both *Ruminococcus* and *Eubacterium* belong (Ponzo et al., 2019), likely driven by compositional differences between human milk and infant formula.

The observed higher abundance of both genera in early life among non-breastfed children may be explained by a complex interplay of nutritional factors, such as changes in the nutrient profile due to the transition to complementary feeding (e.g. fiber intake) (Laursen, 2021), the composition of infant formula (Bertelsen, Jensen, & Ringel-Kulka, 2016; Bode, 2012), and the early introduction of liquids which may reduce overall breast milk intake (Fialho, Lopes, Dias, & Salvador, 2014). Our findings indicate that some of these changes in the gut microbiota that were also observed by previous studies early in life may persist into adolescence; however, it is important to note that associations did not remain statistically significant after correction for multiple testing, they should be interpreted with caution. Since early-life microbial colonization is critical for immune system maturation and metabolic programming (Nash, Frank, & Friedman, 2017), deviations from the microbiota profiles associated with breastfeeding could have lasting health consequences. Additionally, these alterations in gut microbiota composition among non-breastfed infants have been linked to an increased risk of infections, obesity, and allergic diseases, emphasizing the long-term impact of early nutritional exposures on health outcomes (Ho et al., 2018; Ponzo et al., 2019). Although our study was not initially aimed at understanding the establishment of enterotypes, our findings reveal a relationship between the early introduction of liquid diets, the predominance of *Ruminococcus* in adolescence, and a potential link with Enterotype III described by Arumugam et al. (2011). This enterotype has already been

described as present in Brazilian populations. The longitudinal follow-up of this cohort may thus allow for a deeper analysis of the long-term consequences of these early dietary and epigenetic interactions.

As strengths of the study, as a longitudinal cohort with multiple follow-ups, we accounted for breastfeeding at different time points, including three months (early breastfeeding period) and later, as well as the introduction of complementary foods around six months. This comprehensive approach provides a dynamic perspective on gut microbiota development, enabling us to assess whether the effects of exclusive breastfeeding persist or are modified by complementary feeding and other exposures throughout childhood. Additionally, we incorporated a more extensive set of confounding variables than most previous studies (Azad et al., 2016; Bäckhed et al., 2015; Ho et al., 2018; Ma et al., 2020; Pannaraj et al., 2017), including maternal characteristics, mode of delivery, and antibiotic exposure. However, unmeasured factors such as detailed dietary composition, cumulative environmental exposures, and lifetime medication history may still have influenced our findings.

Conversely, our study has several limitations that should be considered when interpreting the findings. Although our study included a larger sample size than those reported in previous studies on the topic (Azad et al., 2016; Bäckhed et al., 2015; Bokulich et al., 2016; Homann et al., 2021; Koenig et al., 2011; Ma et al., 2020; Palmer et al., 2007; Pannaraj et al., 2017; Penders et al., 2005; Rinne et al., 2005; Sugino et al., 2020; Yelverton et al., 2023), limited statistical power may have restricted our ability to detect more pronounced differences in gut microbiota composition. Despite this, we were able to identify modest but consistent differences, suggesting that more robust effects could be demonstrated in future studies with even larger sample sizes. Additionally, we lacked data on exclusive breastfeeding at six months, the WHO recommended age for exclusive breastfeeding. The absence of gut microbiota data within the first year of age limits our ability to infer associations during early life. Furthermore, our analytical approach focused on common taxa, prioritizing their relevance to gut microbiota diversity and reducing the risk of false positives. However, this strategy may have overlooked rare genera or phyla that could be associated with breastfeeding and merit further investigation in future studies. These limitations highlight the need for future studies with larger cohorts, more granular control of confounding variables, and advanced analytical methodologies to refine our understanding of the long-term relationship between breastfeeding and gut microbiota composition in adolescence.

In conclusion, our findings suggest that early-life dietary factors, such as breastfeeding pattern/duration and the timing of complementary feeding, have only a

modest influence on adolescent gut microbiota, suggestively affecting the abundance of *Ruminococcus* and *Eubacterium*. Notably, the early introduction of liquids and semi-solid foods (before 6 months) showed a more consistent association with these bacterial genera than breastfeeding practices. However, no significant differences in overall microbial diversity were linked to breastfeeding. From a health perspective, these results imply that while infant feeding practices may leave a slight imprint on gut microbiota composition, their long-term impact appears limited. Further research is needed to confirm these observations and clarify how breastfeeding interacts with other factors to shape gut microbiota over time.

Acknowledgements: This article is based on data from the study “Pelotas Birth Cohort, 2004”; conducted by the Postgraduate Program in Epidemiology at Universidade Federal de Pelotas, with the collaboration of the Brazilian Public Health Association (ABRASCO). From 2009 to 2013, the Wellcome Trust supported the 2004 birth cohort study. The World Health Organization, National Support Program for Centers of Excellence (PRONEX), Brazilian National Research Council (CNPq), Brazilian Ministry of Health, and Children’s Pastorate supported previous phases of the study. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, and by grant #0002/2016/471142 from the Joanna and Brian Lawson Centre for Child Nutrition, Faculty of Medicine, University of Toronto. MCB received support from the Medical Research Council (MRC) Integrative Epidemiology Unit (MC_UU_00032/5), and the University of Bristol British Heart Foundation Accelerator Award (AA/18/7/34219). AM, AJDB and LTR received support from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). LLD is a recipient of scholarships from the National Council of Science and Technology (CONACYT), Mexico and the Peterborough K. M. Hunter Charitable Foundation. MXC received support from the WellcomeTrust (225019/Z/22/Z).

Contributors: EMC, RHJB, AJDB, ISS, AM, LLD, MCB, DBM, and LTR were responsible for conceptualization, methodology and supervision of the research; EDA, MXC, MCB, DBM and LTR contributed for methodology and the investigation; EDA, LC, IOB, MXC, DBM and LTR contributed to analyzing data and interpreting results; and EMC, RHJB, AJDB, AM, EDA, LC, MXC, MCB, DBM and LTR wrote, reviewed and edit the report. All authors read and approved the final manuscript.

Table 1. Description of the total analytical sample, as well as its breastfeeding pattern, according to maternal, and cohort participants characteristics. The 2004 Pelotas birth cohort study, Brazil.

Variable	N (%)	Exclusive Breastfeeding	Mixed breastfeeding	No breastfeeding	Fisher's exact
<i>Maternal characteristics at birth</i>					
Total familiar income (quintiles)		N = 101	N = 185	N = 76	0.489
1 st (lower)	79 (21.8)	17 (16.8)	49 (26.5)	13 (17.1)	
2 nd	71 (19.6)	21 (20.8)	30 (16.2)	20 (26.3)	
3 rd	68 (18.8)	20 (19.8)	33 (17.8)	15 (19.7)	
4 th	77 (21.2)	24 (23.8)	39 (21.1)	14 (18.4)	
5 th (higher)	67 (18.5)	19 (18.8)	34 (18.4)	14 (18.4)	
Gestational age		N = 101	N = 185	N = 76	0.919
Preterm birth	91 (25.1)	24 (23.8)	46 (24.9)	21 (27.6)	
Full-term birth	258 (71.3)	74 (73.7)	131 (70.8)	53 (69.7)	
Post-term birth	13 (3.6)	3 (3.0)	8 (69.7)	2 (2.6)	
Type of delivery		N = 101	N = 185	N = 76	0.822
Vaginal	185 (51.1)	52 (51.5)	92 (49.7)	41 (53.9)	
C-section	177 (48.2)	49 (48.5)	93 (50.3)	35 (46.1)	
Smoking during pregnancy		N = 101	N = 185	N = 76	0.085
No	272 (75.1)	80 (79.2)	130 (70.3)	62 (81.6)	
Yes	90 (24.9)	21 (20.8)	55 (29.7)	14 (18.4)	
Age (years)		N = 101	N = 185	N = 76	0.168
≤ 24	172 (47.5)	41 (40.6)	89 (48.1)	42 (55.3)	
25 – 34	148 (40.8)	44 (43.6)	74 (40.0)	30 (39.5)	
≥ 35	42 (11.6)	16 (15.8)	22 (11.9)	4 (5.3)	
<i>Participant's characteristics</i>					
Sex		N = 101	N = 185	N = 76	0.563
Male	191 (52.8)	49 (48.5)	102 (55.1)	40 (52.6)	
Female	171 (47.2)	52 (51.5)	83 (44.9)	36 (47.4)	
Skin color		N = 101	N = 185	N = 76	0.353
White	246 (67.9)	69 (68.3)	127 (68.6)	50 (65.8)	
Black	45 (12.4)	14 (13.9)	24 (13.0)	7 (9.2)	
Mixed	64 (17.7)	17 (16.8)	32 (17.3)	15 (19.7)	
Others	7 (1.9)	1 (1.0)	2 (1.1)	4 (5.3)	
Birth weight (grams)		N = 101	N = 185	N = 76	0.973
< 2,500	31 (8.6)	7 (6.9)	17 (9.2)	7 (9.2)	
2,500-3,499	223 (61.6)	63 (62.4)	113 (61.1)	47 (61.8)	
≥ 3,500	108 (29.8)	31 (30.7)	55 (29.7)	22 (28.9)	
Use of antibiotics in the last 6 months at		N = 100	N = 185	N = 76	0.788

age 12

No	283 (78.4)	76 (76.0)	147 (79.5)	60 (79.0)
Yes	78 (21.6%)	24 (24.0)	38 (20.5)	16 (21.1)

Table 2. Results of crude and adjusted linear regression testing the association of breastfeeding pattern at 3 months with gut microbiota alpha diversity at age 12 in the 2004 Pelotas Birth Cohort study, Brazil.

Indexes	Crude (N = 362)		Adjusted ^a (N = 361)		Adjusted ^b (N = 361)		FDR p value
	β (95% CI)	P value	β (95% CI)	p value	β (95% CI)	p value	
Chao1		0.215		0.406		0.466	0.622
EB	Ref		Ref		Ref		
MB	18.67 (-5.56; 42.91)		14.82 (-8.82;38.45)		12.96 (-10.45;36.37)		
NB	23.49 (-6.25; 53.23)		16.31 (-12.65;45.26)		15.63 (-13.07; 44.32)		
Simpson (Ln)		0.407		0.528		0.519	0.622
EB	Ref		Ref		Ref		
MB	-0.01 (-0.01; 0.01)		-0.01 (-0.01;0.01)		-0.01 (-0.01; 0.01)		
NB	0.01 (-0.01; 0.01)		0.01 (-0.005; 0.01)		0.01 (-0.01; 0.01)		
Shannon Evenness (Ln)		0.431		0.633		0.622	0.622
EB	Ref		Ref		Ref		
MB	0.07 (-0.02; 0.03)		0.004 (-0.02;0.03)	0.738	0.02 (-0.02; 0.03)		
NB	0.02 (-0.01; 0.05)		0.02 (-0.02; 0.04)	0.349	0.07 (-0.02;0.05)		

EB = Exclusive breastfeeding; MB = Mixed breastfeeding; NB = No breastfeeding; FDR = False Discovery Rate; Ln = natural logarithm.

^a Adjusted for sex, skin color, family income in the perinatal period, maternal education, gestational age, type of delivery, smoking during pregnancy, birth weight, mother's age, parity.

^b Adjusted model (a) with foods categorized according to the NOVA classification at age 12.

Table 3. Results of crude and adjusted regression models testing the association of breastfeeding pattern at 3 months with *Ruminococcus* and *Eubacterium* relative abundances at age 12. The 2004 Pelotas Birth Cohort study, Brazil.

Breastfeeding	Crude (N = 362)		Adjusted ^a (N = 361)		Adjusted ^b (N = 361)		FDR p value
	β /OR (95%CI)	P value	β /OR (95%CI)	P value	β /OR (95%CI)	P value	
G_Ruminococcus (Q)		0.021		0.006		0.004	0.352
EB	Ref		Ref		Ref		
MB	$\beta = 0.08$ (-0.16; 0.32)		$\beta = 0.14$ (-0.10; 0.38)		$\beta = 0.13$ (-0.11; 0.37)		
NB	$\beta = 0.40$ (0.10; 0.69)		$\beta = 0.47$ (0.17; 0.76)		$\beta = 0.49$ (0.19; 0.78)		
G_Eubacterium (B)		0.021		0.047		0.049	0.943
EB	Ref		Ref		Ref		
MB	OR = 2.21 (1.18; 4.11)		OR = 2.04 (1.07; 3.90)		OR = 2.04 (1.06; 3.92)		
NB	OR = 2.45 (1.07; 5.61)		OR = 2.36 (1.00; 5.57)		OR = 2.39 (1.00; 5.69)		

OR = Odds Ratio; EB = Exclusive breastfeeding; MB = Mixed breastfeeding; NB = No breastfeeding; FDR = False discovery rate; Q = Quantitative model; B = Binary model.

Pcorrected after FDR: 0.352 for *Ruminococcus* and 0.943 for *Eubacterium*. See supplementar Table 1.

^a Adjusted for sex, skin color, family income in the perinatal period, maternal education, gestational age, type of delivery, smoking during pregnancy, birth weight, mother's age, parity, use of antibiotics in the 6 months before collection.

^b Adjusted model (a) with foods categorized according to the NOVA classification at age 12.

Table 4. Results of crude and adjusted regression models testing the association of breastfeeding duration with *Ruminococcus* and *Eubacterium* relative abundances at age 12. The 2004 Pelotas birth cohort study, Brazil.

Exposure	Crude		Adjusted ^a		Adjusted ^b	
	β /OR (95%CI)	p-value	β /OR (95%CI)	p-value	β /OR (95%CI)	p-value
G_Ruminococcus (Q)						
Breastfeeding duration (months)		0.296		0.223		0.207
0 – 6.0	Ref		Ref		Ref	
6.1 – 12.0	0.12 (-0.20; 0.45)		0.07 (-0.26; 0.39)		0.04 (-0.28; 0.37)	
≥ 12.1	-0.12 (-0.35; 0.10)		-0.17 (-0.39; 0.05)		-0.18 (-0.40; 0.04)	
G_Eubacterium (B)						
Breastfeeding duration (months)		0.041		0.045		0.042
0 – 6.0	Ref		Ref		Ref	
6.1 – 12.0	3.79 (0.87; 16.59)		4.50 (0.98; 20.57)		4.61 (1.00; 21.20)	
≥ 12.1	0.66 (0.37; 1.17)		0.70 (0.38; 1.28)		0.70 (0.38; 1.29)	

OR = Odds Ratio; 95%CI = Confidence interval 95%; Ref = Reference; Q = Quantitative model; B = Binary model.

^a Adjusted for sex, skin color, family income in the perinatal period, maternal education, gestational age, type of delivery, smoking during pregnancy, birth weight, mother's age, parity, use of antibiotics in the 6 months before collection.

^b Adjusted model (a) with foods categorized according to the NOVA classification at age 12.

Table 5. Association between nominally associated taxa and dietary introduction of solids, semi-solids and liquids. The 2004 Pelotas Birth Cohort Study, Brazil.

	Crude		Adjusted ^a		Adjusted ^b	
	β /OR (95% CI)	p-value	β /OR (95% CI)	p-value	β /OR (95% CI)	p-value
Introduction of liquids (N = 350)						
G_Ruminococcus (Q)						
≥ 6 months	Ref		Ref		Ref	
≤ 5.9 months	0.406(0.09; 0.72)	0.012	0.452(0.14; 0.77)	0.005	0.451(0.14; 0.77)	0.005
G_Eubacterium (B)						
≥ 6 months	Ref		Ref		Ref	
≤ 5.9 months	1.787(0.82; 3.88)	0.143	1.689(0.75; 3.79)	0.204	1.640(0.73; 3.70)	0.233
Introduction of semisolids (N = 345)						
G_Ruminococcus (Q)						
≥ 6 months	Ref		Ref		Ref	
≤ 5.9 months	0.101(-0.11; 0.32)	0.355	0.136(-0.08; 0.35)	0.215	0.137(-0.08; 0.35)	0.215
G_Eubacterium (B)						
≥ 6 months	Ref		Ref		Ref	
≤ 5.9 months	1.734(0.97; 3.10)	0.063	1.882(1.02; 3.48)	0.043	1.891(1.02; 3.50)	0.043
Introduction of solids (N= 351)						
G_Ruminococcus (Q)						
≥ 6 months	Ref		Ref		Ref	
≤ 5.9 months	0.125(-0.11; 0.36)	0.299	0.128(-0.11; 0.36)	0.290	0.138(-0.10; 0.38)	0.257
G_Eubacterium (B)						
≥ 6 months	Ref		Ref		Ref	
≤ 5.9 months	1.591(0.86; 2.94)	0.138	1.759(0.92; 3.35)	0.086	1.846(0.96; 3.55)	0.066

^a Adjusted for sex, skin color, family income in the perinatal period, maternal education, gestational age, type of delivery, smoking during pregnancy, birth weight, mother's age, parity, use of antibiotics in the 6 months before collection.

^b Adjusted model (a) with foods categorized according to the NOVA classification at age 12.

References

- Ahn, J., Abu-Rub, M., & Miller, R. H. (2021). B Cells in Neuroinflammation: New Perspectives and Mechanistic Insights. *Cells*, *10*(7)(2073-4409 (Electronic)). doi:10.3390/cells100716050 (Cytokines)
- Akiyama, M., Okada, Y., Kanai, M. A.-O., Takahashi, A. A.-O., Momozawa, Y., Ikeda, M., . . . Kamatani, Y. A.-O. (2017). Genome-wide association study identifies 112 new loci for body mass index in the Japanese population. *Nat Genet.*, *49*(10)(1546-1718 (Electronic)). doi:10.1038/ng.3951
- Alves, E. D., Carpena, M. X., Barros, A. J. D., Comelli, E. M., López-Domínguez, L., Bandsma, R. H. J., . . . Tovo-Rodrigues, L. (2024). Exploring the relationship between ultra-processed food consumption and gut microbiota at school age in a Brazilian birth cohort. *Cadernos de Saúde Pública*, *41*(2):e00094424(1678-4464 (Electronic)). doi:10.1590/0102-311XEN0944240 (RNA, Ribosomal, 16S)
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., . . . Meta, H. I. T. C. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, *473*(7346), 174-180. doi:10.1038/nature09944
- Azad, M. B., Konya, T., Persaud, R. R., Guttman, D. S., Chari, R. S., Field, C. J., . . . the, C. S. I. (2016). Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *123*(6), 983-993. doi:<https://doi.org/10.1111/1471-0528.13601>
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., . . . Wang, J. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*(1934-6069 (Electronic)). doi:10.1016/j.chom.2015.04.004
- Bashiardes, S., Zilberman-Schapira, G., & Elinav, E. (2016). Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research. *Bioinform Biol Insights*.(1177-9322 (Print)). doi:10.4137/BBI.S34610
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. *J. Royal Statist. Soc., Series B*, *57*, 289-300. doi:10.2307/2346101
- Bertelsen, R. J., Jensen, E. T., & Ringel-Kulka, T. (2016). Use of probiotics and prebiotics in infant feeding. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*(1532-1916 (Electronic)). doi:10.1016/j.bpg.2016.01.0010 (Prebiotics)
- Blekhman, R., Goodrich, J. K., Huang, K., Sun, Q., Bukowski, R., Bell, J. T., . . . Clark, A. G. (2015). Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology*, *16*(1), 191. doi:10.1186/s13059-015-0759-1

- Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22(9), 1147-1162. doi:10.1093/glycob/cws074
- Bokulich, N. A., Chung, J., Battaglia, T., Henderson, N., Jay, M., Li, H., . . . Blaser, M. J. (2016). Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Science translational medicine*(1946-6242 (Electronic)). doi:10.1126/scitranslmed.aad7121
0 (Anti-Bacterial Agents)
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., . . . Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. doi:10.1038/s41587-019-0209-9
- Bonder, M. J., Kurilshikov, A., Tigchelaar, E. F., Mujagic, Z., Imhann, F., Vila, A. V., . . . Zhernakova, A. (2016). The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nature Genetics*, 48(11), 1407-1412. doi:10.1038/ng.3663
- 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. *Frontiers in Nutrition*(2296-861X (Print)). doi:10.3389/fnut.2021.629740
- Bravi, F., Wiens, F., Decarli, A., Dal Pont, A., Agostoni, C., & Ferraroni, M. (2016). Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition*(1938-3207 (Electronic)). doi:10.3945/ajcn.115.120881
- Caporaso, J. G., Lauber, C. I., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., . . . Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. (1751-7370 (Electronic)). doi:10.1038/ismej.2012.8
- Carpena, M. X., Barros, A. J., Comelli, E. M., López-Domínguez, L., Alves, E. D., Wendt, A., . . . Tovo-Rodrigues, L. (2024). Accelerometer-based sleep metrics and gut microbiota during adolescence: Association findings from a Brazilian population-based Birth cohort. *Sleep Medicine*(1878-5506 (Electronic)). doi:10.1016/j.sleep.2023.12.028
- Catassi, G., Aloï, M., Giorgio, V., Gasbarrini, A., Cammarota, G., & Ianiro, G. (2024). The Role of Diet and Nutritional Interventions for the Infant Gut Microbiome. *Nutrients*, 16(3), 400.
- Chen, G., Shi, F., Yin, W., Guo, Y., Liu, A., Shuai, J., & Sun, J. (2022). Gut microbiota dysbiosis: The potential mechanisms by which alcohol disrupts gut and brain functions. *Frontiers in Microbiology*, 13. doi:10.3389/fmicb.2022.916765
- de Moraes, A. C. F., Fernandes, G. R., da Silva, I. T., Almeida-Pititto, B., Gomes, E. P., Pereira, A. d. C., & Ferreira, S. R. G. (2017). Enterotype

May Drive the Dietary-Associated Cardiometabolic Risk Factors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. doi:10.3389/fcimb.2017.00047

- Delaneau, O., Zagury, J. F., & Marchini, J. (2013). Improved whole-chromosome phasing for disease and population genetic studies. *Nature Methods*, 10(1)(1548-7105 (Electronic)). doi:10.1038/nmeth.2307
- Dong, S., Zhao, N., Spragins, E., Kagda, M. S., Li, M., Assis, P., . . . Hitz, B. C. (2023). Annotating and prioritizing human non-coding variants with RegulomeDB v.2. *Nature Genetics*, 55(5), 724-726. doi:10.1038/s41588-023-01365-3
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10), 996-998. doi:10.1038/nmeth.2604
- Edgar, R. C. (2016). UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *bioRxiv*, 081257. doi:10.1101/081257
- Fialho, F. A., Lopes, A. M., Dias, I. M. A. V., & Salvador, M. (2014). FATORES ASSOCIADOS AO DESMAME PRECOCE DO ALEITAMENTO MATERNO. *Revista Cuidarte*, 5, 670-678.
- Forbes, J. D., Azad, M. B., Vehling, L., Tun, H. M., Konya, T. B., Guttman, D. S., . . . Investigators, f. t. C. H. I. L. D. S. (2018). Association of Exposure to Formula in the Hospital and Subsequent Infant Feeding Practices With Gut Microbiota and Risk of Overweight in the First Year of Life. *JAMA Pediatrics*, 172(7), e181161-e181161. doi:10.1001/jamapediatrics.2018.1161
- Fu, J., Zheng, Y., Gao, Y., & Xu, W. (2022). Dietary Fiber Intake and Gut Microbiota in Human Health. *Microorganisms*(2076-2607 (Print)). doi:10.3390/microorganisms10122507
- Gacesa, R., Kurilshikov, A., Vich Vila, A., Sinha, T., Klaassen, M. A. Y., Bolte, L., . . . Weersma, R. (2022). Environmental factors shaping the gut microbiome in a Dutch population. *Nature*(1476-4687 (Electronic)). doi:10.1038/s41586-022-04567-7
- Getachew, B., Hauser, S. R., Bennani, S., El Kouhen, N., Sari, Y., & Tizabi, Y. (2024). Adolescent alcohol drinking interaction with the gut microbiome: implications for adult alcohol use disorder. *Advances in Drug and Alcohol Research*, 4. doi:10.3389/adar.2024.11881
- Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature medicine*(1546-170X (Electronic)). 0 (Biomarkers)
- Goodrich, J. K., Davenport, E. R., Beaumont, M., Jackson, M. A., Knight, R.,

- Ober, C., . . . Ley, R. E. (2016). Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell host & microbe*(1934-6069 (Electronic)).
- Hatch, M. (2017). Gut microbiota and oxalate homeostasis. *Annals of translational medicine*(2305-5839 (Print)). doi:10.21037/atm.2016.12.70
- Ho, N. T., Li, F., Lee-Sarwar, K. A., Tun, H. M., Brown, B. P., Pannaraj, P. S., . . . Kuhn, L. (2018). Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. *Nature Communications*, 9(1), 4169. doi:10.1038/s41467-018-06473-x
- Holmes, R. P., Goodman, H. O., & Assimos, D. G. (2001). Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney international*(0085-2538 (Print)). doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00488.x
0 (Calcium, Dietary)
0 (Oxalates)
- Homann, C. M., Rossel, C., Dizzell, S., Bervoets, L., Simioni, J., Li, J., . . . Stearns, J. (2021). Infants' First Solid Foods: Impact on Gut Microbiota Development in Two Intercontinental Cohorts. *Nutrients*(2072-6643 (Electronic)). doi:10.3390/nu13082639
0 (RNA, Ribosomal, 16S)
- Hopkins, M. J., Sharp, R., & Macfarlane, G. T. (2002). Variation in human intestinal microbiota with age. *Dig Liver Dis*(1590-8658 (Print)). doi:10.1016/s1590-8658(02)80157-8
0 (Fatty Acids)
0 (RNA, Ribosomal, 16S)
- Horta, B. L., Bahl, R., Martínés, J. C., Victora, C. G., & World Health, O. (2007). Evidence on the long-term effects of breastfeeding : systematic review and meta-analyses. In. Geneva: World Health Organization.
- Hoskinson, C., Dai, D. L. Y., Del Bel, K. L., Becker, A. B., Moraes, T. J., Mandhane, P. J., . . . Turvey, S. E. (2023). Delayed gut microbiota maturation in the first year of life is a hallmark of pediatric allergic disease. *Nature Communications*, 14(1), 4785. doi:10.1038/s41467-023-40336-4
- Hossain, S., & Mhrshahi, S. (2022). Exclusive Breastfeeding and Childhood Morbidity: A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health*(1660-4601 (Electronic)). doi:10.3390/ijerph192214804
- Huby, A. C., Antonova, G., Groenendyk, J., Gomez-Sanchez, C. E., Bollag, W. B., Filosa, J. A., & Belin de Chantemèle, E. J. (2015). Adipocyte-Derived Hormone Leptin Is a Direct Regulator of Aldosterone Secretion, Which Promotes Endothelial Dysfunction and Cardiac Fibrosis. *Circulation*, 132(22)(1524-4539 (Electronic)). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018226
0 (Leptin)
4964P6T9RB (Aldosterone)
- Hughes, D. A., Bacigalupe, R., Wang, J., Rühlemann, M. C., Tito, R. Y., Falony, G., . . . Raes, J. (2020). Genome-wide associations of human gut

- microbiome variation and implications for causal inference analyses. *Nat Microbiol.*, 5(9)(2058-5276 (Electronic)). doi:10.1038/s41564-020-0743-8
- Ibrahim, A. M., Chauhan, L., Bhardwaj, A., Sharma, A., Fayaz, F., Kumar, B., . . . Pottou, F. H. (2022). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neurodegenerative Disorders. *Biomedicines*, 10(5)(2227-9059 (Print)). doi:10.3390/biomedicines10051143
- Kawamura, K., Kawamura, N., Sato, W., Fukuda, J., Kumagai, J., & Tanaka, T. (2009). Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. *Endocrinology*, 150(8)(1945-7170 (Electronic)). doi:10.1210/en.2009-0213
- 0 (Brain-Derived Neurotrophic Factor)
- 0 (Nerve Growth Factors)
- 145172-44-7 (neurotrophin 5)
- EC 2.7.1.- (Phosphatidylinositol 3-Kinases)
- EC 2.7.10.1 (Receptor, trkB)
- EC 3.4.24.35 (Matrix Metalloproteinase 9)
- P658DCA9XD (neurotrophin 4)
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., D., A., Fricker, A. D., Stombaugh, J., . . . Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. (1091-6490 (Electronic)). doi:10.1073/pnas.10000811107
- Kurilshikov, A., Medina-Gomez, C., Bacigalupe, R., Radjabzadeh, D., Wang, J., Demirkan, A., . . . Zhernakova, A. A.-O. (2021). Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition. *Nature Genetics*, 53(2)(1546-1718 (Electronic)). doi:10.1038/s41588-020-00763-1
- 0 (RNA, Ribosomal, 16S)
- EC 3.2.1.108 (Lactase)
- Laursen, M. F. (2021). Gut Microbiota Development: Influence of Diet from Infancy to Toddlerhood. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 77(Suppl. 3), 21-34. doi:10.1159/000517912
- Lopera-Maya, E. A., Kurilshikov, A., van der Graaf, A., Hu, S., Andreu-Sánchez, S., Chen, L., . . . LifeLines Cohort, S. (2022). Effect of host genetics on the gut microbiome in 7,738 participants of the Dutch Microbiome Project. *Nature Genetics*, 54(2), 143-151. doi:10.1038/s41588-021-00992-y
- López-Domínguez, L., Bourdon, C., Hamilton, J., Taibi, A., Bassani, D. G., dos Santos Vaz, J., . . . Comelli, E. M. (2023). Childhood growth trajectory patterns are associated with the pubertal gut microbiota. *medRxiv*, 2023.2006.2020.23291663. doi:10.1101/2023.06.20.23291663
- Lordan, C., Roche, A. K., Delsing, D., Nauta, A., Groeneveld, A., MacSharry, J., . . . van Sinderen, D. (2024). Linking human milk oligosaccharide metabolism and early life gut microbiota: bifidobacteria and beyond. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR(1098-5557

- (Electronic)). doi:10.1128/membr.00094-23
0 (Oligosaccharides)
- Lukáčová, I., Ambro, L., Dubayová, K., & Mareková, M. (2023). The gut microbiota, its relationship to the immune system, and possibilities of its modulation. [Črevná mikrobiota, jej vzťah k imunitnému systému a možnosti jej modulácie.]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*(1210-7913 (Print)).
- Ma, J., Li, Z., Zhang, W., Zhang, C., Zhang, Y., Mei, H., . . . Wu, D. (2020). Comparison of gut microbiota in exclusively breast-fed and formula-fed babies: a study of 91 term infants. *Scientific reports*, *10*(1), 15792. doi:10.1038/s41598-020-72635-x
- McVean, G. A., Altshuler, D. M., Durbin, R. M., Abecasis, G. R., Bentley, D. R., Chakravarti, A., . . . University of, G. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, *491*(7422), 56-65. doi:10.1038/nature11632
- Michels, N., Zouiouich, S., Vanderbauwhede, B., Vanacker, J., Indave Ruiz, B. I., & Huybrechts, I. (2022). Human microbiome and metabolic health: An overview of systematic reviews. *Obesity reviews*, *23*(4)(1467-789X (Electronic)). doi:10.1111/obr.13409
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., . . . Lugli, M. (2017). The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews*, *81*(4), 00036-00017. doi:10.1128/MMBR.00036-17
- Moubareck, C. (2021). Human Milk Microbiota and Oligosaccharides: A Glimpse into Benefits, Diversity, and Correlations. . *Nutrients*(2072-6643 (Electronic)). doi:10.3390/nu13041123
0 (Oligosaccharides)
- Muhammad, F., Fan, B., Wang, R., Ren, J., Jia, S., Wang, L., . . . Liu, X. A.-O. (2022). The Molecular Gut-Brain Axis in Early Brain Development. *International journal of molecular sciences*, *23*(23)(1422-0067 (Electronic)). doi:10.3390/ijms232315389
- Mulder, D., Aarts, E., Arias Vasquez, A., & Bloemendaal, M. (2023). A systematic review exploring the association between the human gut microbiota and brain connectivity in health and disease. *Molecular psychiatry*(1476-5578 (Electronic)). doi:10.1038/s41380-023-02146-4
- Nash, M. J., Frank, D. N., & Friedman, J. E. (2017). Early Microbes Modify Immune System Development and Metabolic Homeostasis-The "Restaurant" Hypothesis Revisited. *Frontiers in endocrinology*(1664-2392 (Print)). doi:10.3389/fendo.2017.00349
- Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, *136*(1)(1528-0012 (Electronic)).
0 (Receptors, Pattern Recognition)

- O'Connell, J., Gurdasani, D., Delaneau, O., Pirastu, N., Ulivi, S., Cocca, M., . . . Marchini, J. (2014). A general approach for haplotype phasing across the full spectrum of relatedness. *PLoS Genet.*, *10*(4)(1553-7404 (Electronic)). doi:10.1371/journal.pgen.1004234
- Odiase, E., Frank, D. N., Young, B. E., Robertson, C. E., Kofonow, J. M., Davis, K. N., . . . Tang, M. (2023). The Gut Microbiota Differ in Exclusively Breastfed and Formula-Fed United States Infants and are Associated with Growth Status. *The Journal of Nutrition*, *153*(9), 2612-2621. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tjnut.2023.07.009>
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS biology*, *5*(7), e177. doi:10.1371/journal.pbio.0050177
- Pannaraj, P. S., Li, F., Cerini, C., Bender, J. M., Yang, S., Rollie, A., . . . Aldrovandi, G. M. (2017). Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatr*(2168-6211 (Electronic)). doi:10.1001/jamapediatrics.2017.0378
- Patel, P. G., Patel, A. C., Chakraborty, P., & Gosai, H. B. (2023). Impact of Dietary Habits, Ethnicity, and Geographical Provenance in Shaping Human Gut Microbiome Diversity. In *Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Postbiotics: Human Microbiome and Human Health* (pp. 3-27): Springer.
- Penders, J., Vink, C., Driessen, C., London, N., Thijs, C., & Stobberingh, E. E. (2005). Quantification of Bifidobacterium spp., Escherichia coli and Clostridium difficile in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. (0378-1097 (Print)). doi:10.1016/j.femsle.2004.11.052
- Peres, K. G., Peres, M. A., Demarco, F. F., Gigante, D. P., Horta, B. L., Menezes, A. M. B., . . . Barros, A. J. D. (2014). A saúde bucal nas coortes de nascimentos de Pelotas, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, *17*. doi:10.1590/1415-790X201400010022
- Peres, K. G., Peres, M. A., Demarco, F. F., Tarquínio, S. B. C., Horta, B. L., & Gigante, D. P. (2011). Oral health studies in the 1982 Pelotas (Brazil) birth cohort: methodology and principal results at 15 and 24 years of age. *Cadernos de Saúde Pública*, *27*.
- Ponzo, V., Ferrocino, I., Zarovska, A., Amenta, M. B., Leone, F., Monzeglio, C., . . . Bo, S. (2019). The microbiota composition of the offspring of patients with gestational diabetes mellitus (GDM). *PLoS One*(1932-6203 (Electronic)). doi:10.1371/journal.pone.0226545
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., . . . Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome

- association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*(0002-9297 (Print)). doi:10.1086/519795
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., . . . Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, *490*(7418), 55-60. doi:10.1038/nature11450
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Schweer, T., P., Y., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*(1362-4962 (Electronic)). doi:10.1093/nar/gks1219
- Rinne, M., Kalliomaki, M., Arvilommi, H., Salminen, S., & Isolauri, E. (2005). Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr*(0022-3476 (Print)). doi:10.1016/j.jpeds.2005.03.053
- Rühlemann, M. C., Hermes, B. M., Bang, C., Doms, S., Moitinho-Silva, L., Thingholm, L. B., . . . Franke, A. (2021). Genome-wide association study in 8,956 German individuals identifies influence of ABO histo-blood groups on gut microbiome. *Nature Genetics*, *53*(2), 147-155. doi:10.1038/s41588-020-00747-1
- Saeed, N. K., Al-Beltagi, M., Bediwy, A. S., El-Sawaf, Y., & Toema, O. (2022). Gut microbiota in various childhood disorders: Implication and indications. *World J Gastroenterol*(2219-2840 (Electronic)). doi:10.3748/wjg.v28.i18.1875
- Santos, I. S., Barros, A. J. D., Matijasevich, A., Domingues, M. R., Barros, F. C., & Victora, C. G. (2010). Cohort Profile: The 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *International Journal of Epidemiology*, *40*(6), 1461-1468. doi:10.1093/ije/dyq130
- Santos, I. S., Barros, A. J. D., Matijasevich, A., R, D. M., Barros, F. C., & Victora, C. G. (2011). Cohort profile: the 2004 Pelotas (Brazil) birth cohort study. (1464-3685 (Electronic)). doi:10.1093/ije/dyq130
- Santos, I. S., Barros, A. J. D., Matijasevich, A., Zanini, R., Cesar, M. A. C., Camargo-Figuera, F. A., . . . Victora, C. G. (2014). Cohort Profile Update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. Body composition, mental health and genetic assessment at the 6 years follow-up. *International journal of epidemiology*, *43*(5), 1437-1437f. doi:10.1093/ije/dyu144
- Saunders, G. R. B., Wang, X., Chen, F. A.-O., Jang, S. K., Liu, M. A.-O., Wang, C. A.-O., . . . Vrieze, S. A.-O. (2022). Genetic diversity fuels gene discovery for tobacco and alcohol use. *Nature*(1476-4687 (Electronic)). doi:10.1038/s41586-022-05477-4
- Scepanovic, P., Hodel, F., Mondot, S., Partula, V., Byrd, A., Hammer, C., . . . The Milieu Intérieur, C. (2019). A comprehensive assessment of

demographic, environmental, and host genetic associations with gut microbiome diversity in healthy individuals. *Microbiome*, 7(1), 130. doi:10.1186/s40168-019-0747-x

Scheepers, L., Penders, J., Mbakwa, C., Thijs, C., Mommers, M., & Arts, I. (2015). The intestinal microbiota composition and weight development in children: the KOALA Birth Cohort Study. *International journal of obesity*, 39(1), 16-25. doi:10.1038/ijo.2014.178

Schneider, B. C., Motta, J. V. d. S., Muniz, L. C., Bielemann, R. M., Madruga, S. W., Orlandi, S. P., . . . Assunção, M. C. F. (2016). Desenho de um questionário de frequência alimentar digital autoaplicado para avaliar o consumo alimentar de adolescentes e adultos jovens: coortes de nascimentos de Pelotas, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 19.

Schür, R. R., Draisma, L. W., Wijnen, J. P., Boks, M. P., Koevoets, M. G., Joëls, M., . . . Vinkers, C. H. (2016). Brain GABA levels across psychiatric disorders: A systematic literature review and meta-analysis of (1) H-MRS studies. *Hum Brain Mapp.*, 37(9)(1097-0193 (Electronic)). doi:10.1002/hbm.23244
56-12-2 (gamma-Aminobutyric Acid)

Sekirov, I., Russell, S. I., Caetano, M., Antunes, L. C., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*(1522-1210 (Electronic)). doi:10.1152/physrev.00045.2009

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.*(1545-7885 (Electronic)).

Sjöstedt, E., Zhong, W., Fagerberg, L., Karlsson, M., Mitsios, N., Adori, C., . . . Mulder, J. A.-O. (2020). An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science*, 367(6482)(1095-9203 (Electronic)). doi:10.1126/science.aay5947
0 (Nerve Tissue Proteins)

Stiemsma, L. T., & Michels, K. B. (2018). The Role of the Microbiome in the Developmental Origins of Health and Disease. *Pediatrics.*, 141(4):e20172437(1098-4275 (Electronic)). doi:10.1542/peds.2017-2437

Sugino, K. Y., Ma, T., Kerver, J. M., Paneth, N., & Comstock, S. S. (2020). Human Milk Feeding Patterns at 6 Months of Age are a Major Determinant of Fecal Bacterial Diversity in Infants. *Journal of Human Lactation*, 37(4), 703-713. doi:10.1177/0890334420957571

Šuligoj, T., Vignsnaes, L. K., Abbeele, P. V. D., Apostolou, A., Karalis, K., Savva, G. M., . . . Juge, N. (2020). Effects of Human Milk Oligosaccharides on the Adult Gut Microbiota and Barrier Function. . (2072-6643 (Electronic)). doi:10.3390/nu12092808

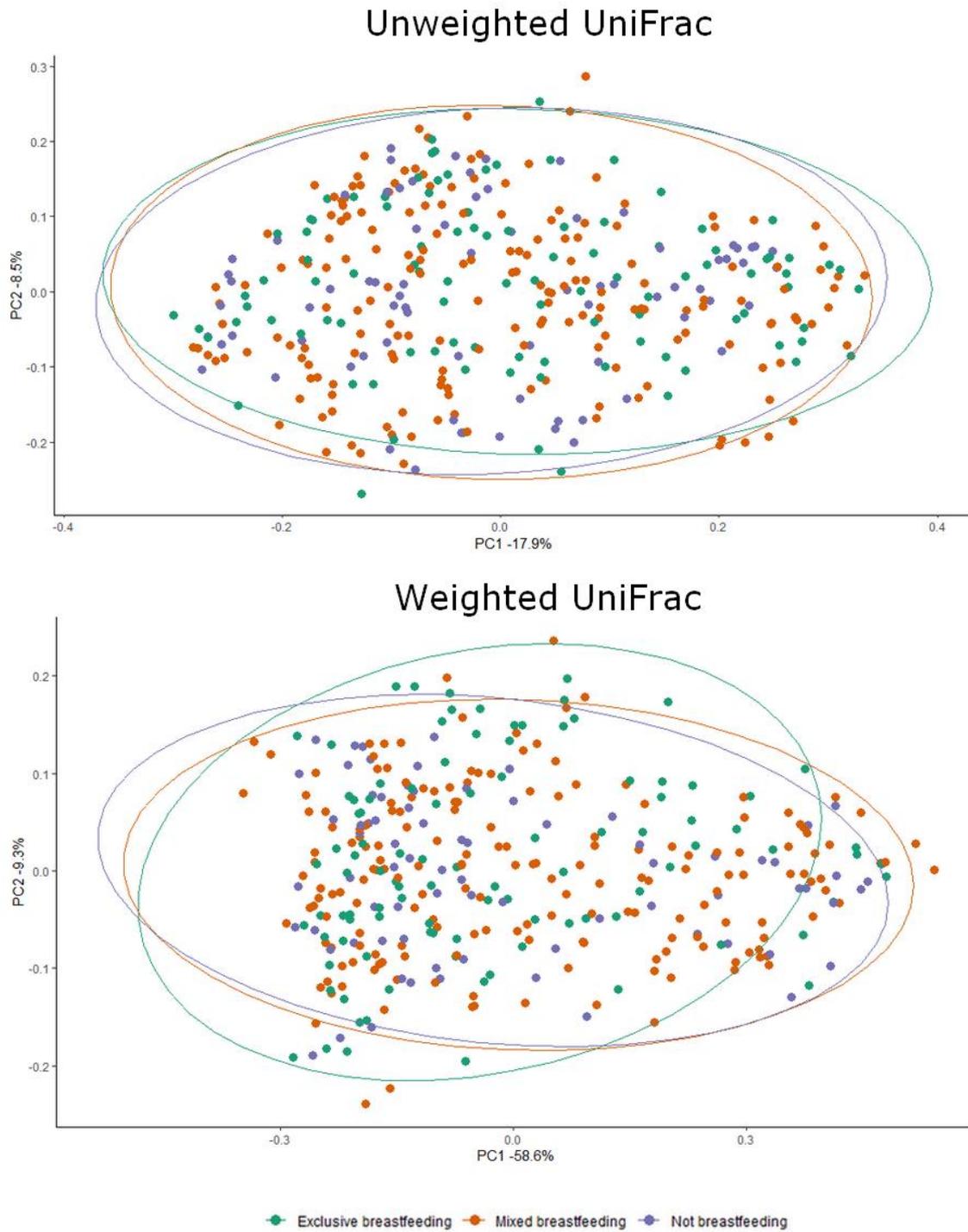
Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif,

- R., . . . von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, *51(D1):D638-D646*(1362-4962 (Electronic)). doi:10.1093/nar/gkac1000
0 (Proteins)
- Ticinesi, A., Nouvenne, A., & Meschi, T. (2019). Gut microbiome and kidney stone disease: not just an Oxalobacter story. *Kidney international*, *96(1)*(1523-1755 (Electronic)). doi:10.1016/j.kint.2019.03.020
0 (Oxalates)
- Tovo-Rodrigues, L., Santos, I. S., Bierhals, I. O., Del-Ponte, B., Murray, J., Bielemann, R., . . . Matijasevich, A. (2024). Cohort Profile Update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study follow-up during adolescent years. *International journal of epidemiology*(1464-3685 (Electronic)). doi:10.1093/ije/dyad156
- Tovo-Rodrigues, L., Santos, I. S., Bierhals, I. O., Del-Ponte, B., Murray, J., Bielemann, R., . . . Matijasevich, A. (2023). Cohort Profile Update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study follow-up during adolescent years. *International journal of epidemiology*(1464-3685 (Electronic)). doi:10.1093/ije/dyad156
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L. D., A., Ley, R. E., Sogin, M. L., . . . Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, *457(7228)*(1476-4687 (Electronic)).
0 (RNA, Ribosomal, 16S)
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, *73(16)*(0099-2240 (Print)). doi:10.1128/AEM.00062-07
0 (RNA, Ribosomal)
- 0 (RNA, Ribosomal, 16S)
- Ward, L. D., & Kellis, M. (2012). HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Research*, *40(D1)*, D930-D934. doi:10.1093/nar/gkr917
- Wilson, G. J., Gois, P. H. F., Zhang, A., Wang, X., Law, B. M. P., Kassianos, A. J., & Healy, H. G. (2018). The Role of Oxidative Stress and Inflammation in Acute Oxalate Nephropathy Associated With Ethylene Glycol Intoxication. *Kidney international reports.*, *3(5)*(2468-0249 (Electronic)). doi:10.1016/j.ekir.2018.05.005
- Yelverton, C. A., Killeen, S. L., Feehily, C., Moore, R. L., Callaghan, S. L., Geraghty, A. A., . . . McAuliffe, F. M. (2023). Maternal breastfeeding is associated with offspring microbiome diversity; a secondary analysis of the MicrobeMom randomized control trial. *Frontiers in Microbiology*, *14*. doi:10.3389/fmicb.2023.1154114
- Yutin, N., & Galperin, M. Y. (2014). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia.

Environmental microbiology, 15(10)(1462-2920 (Electronic)).
doi:<https://doi.org/10.1111%2F1462-2920.12173>

Zhang, P. (2022). Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health. *Molecular Diversity Preservation International*(1422-0067 (Electronic)). doi:10.3390/ijms23179588

Zhu, Z., Guo, Y., Shi, H., Liu, C. L., Panganiban, R. A., Chung, W., . . . Liang, L. (2020). Shared genetic and experimental links between obesity-related traits and asthma subtypes in UK Biobank. *J Allergy Clin Immunol.*, 145(2)(1097-6825 (Electronic)). doi:10.1016/j.jaci.2019.09.035



Supplementary Figure 1 - Principal coordinates analysis (PCoA) based on weighted and unweighted UniFrac distances for three categories of breastfeeding in a sample aged 12 years.

Supplementary Table 2. Association of taxa and breastfeeding (crude and adjusted models).

Breastfeeding at 3 months	Crude			Adjusted ^a			Adjusted ^b		
	β /OR (95% CI)	p value	FDR	β /OR (95% CI)	p value	FDR	β /OR (95% CI)	p value	FDR
P_Actinobacteria (Q)		0.215	0.898		0.192	0.926		0.199	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.073 (-0.17; 0.31)			0.072 (-0.17; 0.31)			0.059 (-0.18;0.30)		
No breastfeeding	0.259 (-0.04; 0.57)			0.267 (-0.03; 0.56)			0.260 (-0.04; 0.56)		
P_Bacteroidetes (Q)		0.567	0.949		0.614	0.941		0.560	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.106 (-0.14; 0.35)			0.067 (-0.18; 0.31)			0.072 (-0.17;0.32)		
No breastfeeding	-0.013 (-0.31; 0.29)			-0.065 (-0.37; 0.24)			-0.074 (-0.38; 0.23)		
P_Firmicutes (Q)		0.716	0.953		0.824	0.941		0.786	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.092 (-0.33; 0.15)			-0.045 (-0.29; 0.20)			-0.045 (-0.29; 0.20)		

No breastfeeding	-0.016 (-0.31; 0.28)		0.035 (-0.26; 0.33)		0.048 (-0.25; 0.35)			
P_Proteobacteria (Q)		0.140	0.898		0.164	0.926		0.142 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref				Ref
Mixed breastfeeding	-0.188 (-0.43; 0.05)			-0.173 (-0.42; 0.07)				-0.163 (-0.41; 0.08)
No breastfeeding	-0.285 (-0.58; 0.01)			-0.283 (-0.59; 0.02)				-0.302 (-0.60; 0.01)
P_Euryarchaeota (Q)		0.875	0.968		0.915	0.941		0.722 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref				Ref
Mixed breastfeeding	1.067 (0.64; 1.77)			1.068 (0.63; 1.80)				1.027 (0.60; 1.76)
No breastfeeding	1.179 (0.63; 2.21)			1.148 (0.60; 2.18)				1.286 (0.66; 2.51)
P_Candidatus_saccharibacteria (Q)		0.114	0.898		0.119	0.926		0.122 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref				Ref
Mixed breastfeeding	0.603 (0.36; 1.00)			0.603 (0.36; 1.02)				0.607 (0.36; 1.03)
No breastfeeding	0.596 (0.32; 1.13)			0.582 (0.30; 1.12)				0.575 (0.30; 1.11)
P_Lentisphaerae (Q)		0.903	0.968		0.854	0.941		0.868 0.943

Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.072 (0.65; 1.78)			1.070 (0.63; 1.82)			1.068 (0.62; 1.83)		
No breastfeeding	0.949 (0.51; 1.76)			0.908 (0.48; 1.72)			0.912 (0.47; 1.75)		
P_Verrucomicrobia (Q)		0.756	0.953		0.744	0.941		0.754	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.807 (0.42; 1.54)			0.794 (0.41; 1.55)			0.785 (0.40; 1.55)		
No breastfeeding	0.765 (0.35; 1.67)			0.757 (0.34; 1.68)			0.775 (0.35; 1.74)		
G_Bacteroides (Q)									
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.236 (-0.48; 0.01)			-0.167 (-0.40; 0.07)			-0.140 (-0.42; 0.14)		
No breastfeeding	-0.229 (-0.53; 0.07)			-0.145 (-0.43; 0.14)					
G_Parabacteroides (Q)		0.623	0.953		0.838	0.941		0.899	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		

Mixed breastfeeding	-0.087 (-0.33; 0.16)			-0.045 (-0.28; 0.20)			-0.019 (-0.26; 0.22)		
No breastfeeding	-0.142 (-0.44; 0.15)			-0.088 (-0.38; 0.21)			-0.067 (-0.36; 0.22)		
G_Prevotella (Q)		0.150	0.898		0.314	0.926		0.372	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.236 (-0.01; 0.48)			0.158 (-0.07; 0.39)			0.146 (-0.09; 0.38)		
No breastfeeding	0.110 (-0.19; 0.41)			0.012 (-0.27; 0.30)			0.009 (-0.28; 0.30)		
G_Alistipes (Q)		0.721	0.953		0.840	0.941		0.888	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.093 (-0.34; 0.15)			-0.054 (-0.29; 0.19)			-0.027 (-0.26; 0.21)		
No breastfeeding	-0.025 (-0.32; 0.27)			0.015 (-0.28; 0.31)			0.036 (-0.25; 0.33)		
G_Clostridium_Sensu_Stricto (Q)		0.664	0.953		0.814	0.941		0.807	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.053 (-0.19; 0.30)			0.006 (-0.24; 0.25)			0.010 (-0.23; 0.25)		
No breastfeeding	0.137 (-0.16; 0.44)			0.085 (-0.21; 0.38)			0.090 (-0.21; 0.39)		
G_Anaerostipes (Q)		0.440	0.898		0.321	0.926		0.363	0.943

Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.079 (-0.32; 0.16)			-0.047 (-0.28; 0.19)			-0.036 (-0.27; 0.20)		
No breastfeeding	0.089 (-0.20; 0.38)			0.151 (-0.14; 0.44)			0.152 (-0.14; 0.44)		
G_Blautia (Q)		0.776	0.953		0.732	0.941		0.797	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.064 (-0.31; 0.18)			-0.026 (-0.27; 0.22)			-0.008 (-0.25; 0.23)		
No breastfeeding	0.0221 (-0.28; 0.32)			0.080 (-0.21; 0.38)			0.081 (-0.22; 0.38)		
G_Clostridium_xlva (Q)		0.453	0.898		0.373	0.926		0.373	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.152 (-0.39; 0.09)			-0.163 (-0.41; 0.08)			-0.172 (-0.42; 0.07)		
No breastfeeding	-0.134 (-0.43; 0.16)			-0.173 (-0.47; 0.13)			-0.149 (-0.45; 0.15)		
G_Coprococcus (Q)		0.372	0.898		0.312	0.926		0.265	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.073 (-0.31; 0.17)			-0.095 (-0.34; 0.15)			-0.097 (-0.34; 0.15)		

No breastfeeding	0.116 (-0.18; 0.41)		0.109 (-0.19; 0.41)		0.124 (-0.18; 0.43)			
G_Dorea (Q)		0.896	0.968		0.879	0.941		0.824 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref				Ref
Mixed breastfeeding	0.058 (-0.19; 0.30)			0.058 (-0.19; 0.31)				0.071 (-0.18; 0.32)
No breastfeeding	0.032 (-0.27; 0.33)			0.008 (-0.30; 0.31)				0.009 (-0.30; 0.31)
G_Fusicatenibacter (Q)		0.764	0.941		0.681	0.941		0.770 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref				Ref
Mixed breastfeeding	-0.075 (-0.32; 0.17)			-0.059 (-0.30; 0.18)				-0.041 (-0.28; 0.20)
No breastfeeding	0.004 (-0.29; 0.30)			0.056 (-0.24; 0.35)				0.057 (-0.24; 0.36)
G_Roseburia (Q)		0.799	0.959		0.776	0.941		0.724 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref				Ref
Mixed breastfeeding	-0.035 (-0.28; 0.21)			-0.049 (-0.29; 0.20)				-0.043 (-0.29; 0.20)
No breastfeeding	-0.101 (-0.40; 0.20)			-0.109 (-0.41; 0.19)				-0.122 (-0.42; 0.18)
G_Ruminococcus2 (Q)		0.784	0.958		0.825	0.941		0.622 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref				Ref

Mixed breastfeeding	0.053 (-0.19; 0.30)			0.043 (-0.20; 0.29)			0.069 (-0.17; 0.31)		
No breastfeeding	-0.036 (-0.33; 0.26)			-0.039 (-0.34; 0.26)			-0.057 (-0.35; 0.24)		
G_Intestinibacter (Q)		0.193	0.898			0.225	0.926		0.199 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.001 (-0.24; 0.24)			-0.020 (-0.26; 0.22)			-0.008 (-0.25; 0.24)		
No breastfeeding	0.230 (-0.06; 0.52)			0.210 (-0.09; 0.51)			0.228 (-0.07; 0.53)		
G_Romboutsia (Q)		0.480	0.909			0.468	0.941		0.460
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.079 (-0.32; 0.16)			-0.093 (-0.34; 0.15)			-0.079 (-0.32; 0.17)		
No breastfeeding	0.080 (-0.22; 0.38)			0.067 (-0.23; 0.37)			0.089 (-0.21; 0.39)		
G_Clostridium_IV (Q)		0.497	0.921			0.649	0.941		0.663 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.144 (-0.39; 0.10)			-0.113 (-0.36; 0.14)			-0.112 (-0.36; 0.14)		
No breastfeeding	-0.121 (-0.42; 0.18)			-0.107 (-0.41; 0.20)			-0.102 (-0.41; 0.20)		
G_Faecalibacterium (Q)		0.534	0.949			0.691	0.941		0.639 0.943

Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.092 (-0.33; 0.15)			-0.067 (-0.31; 0.18)			-0.072 (-0.31; 0.17)		
No breastfeeding	-0.167 (-0.46; 0.13)			-0.129 (-0.43; 0.17)			-0.142 (-0.44; 0.16)		
G_Gemmiger (Q)		0.398	0.898		0.294	0.926		0.353	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.080 (-0.32; 0.16)			-0.043 (-0.28; 0.20)			-0.027 (-0.27; 0.21)		
No breastfeeding	0.101 (-0.20; 0.40)			0.165 (-0.13; 0.46)			0.164 (-0.13; 0.46)		
G_Oscillibacter (Q)		0.986	0.993		0.999	0.999		0.977	0.977
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.019 (-0.26; 0.22)			0.002 (-0.24; 0.25)			0.023 (-0.22; 0.26)		
No breastfeeding	-0.003 (-0.30; 0.29)			0.007 (-0.29; 0.31)			0.028 (-0.27; 0.32)		
G_Lachnospiracea_incertae_sedis (Q)		0.547	0.949		0.538	0.941		0.677	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	-0.116 (-0.36; 0.12)			-0.097 (-0.34; 0.14)			-0.075 (-0.32; 0.17)		
No breastfeeding	-0.005 (-0.30; 0.29)			0.037 (-0.26; 0.33)			0.033 (-0.26; 0.33)		
G_Ruminococcus (Q)		0.021	0.898		0.006	0.522		0.004	0.352

Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.084 (-0.16; 0.32)			0.138 (-0.10; 0.38)			0.129 (-0.11; 0.37)		
No breastfeeding	0.399 (0.10; 0.69)			0.469 (0.17; 0.76)			0.486 (0.19; 0.78)		
G_Erysipelotrichaceae_incertae_sedis (B)		0.864	0.968		0.764	0.941		0.639	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.105 (0.67; 1.82)			1.201 (0.71; 2.02)			1.277 (0.75; 2.16)		
No breastfeeding	0.967 (0.52; 1.79)			1.053 (0.56; 1.99)			1.088 (0.57; 2.08)		
G_Methanobrevibacter (B)		0.993	0.993		0.975	0.986		0.882	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.972 (0.59; 1.61)			0.953 (0.57; 1.61)			0.906 (0.53; 1.56)		
No breastfeeding	0.991 (0.53; 1.84)			0.935 (0.49; 1.77)			1.040 (0.53; 2.02)		
G_Methanosphaera (B)		0.166	0.898		0.175	0.926		0.151	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.582 (0.83; 3.03)			1.586 (0.82; 3.08)			1.550 (0.79; 3.03)		
No breastfeeding	2.047 (0.97; 4.33)			2.054 (0.95; 4.41)			2.151 (0.99; 4.66)		

G_Actinomyces (B)		0.298	0.898		0.247	0.926		0.217	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.998 (0.61; 1.62)			1.014 (0.62; 1.67)			0.997 (0.60; 1.65)		
No breastfeeding	1.497 (0.82; 2.72)			1.571 (0.85; 2.90)			1.596 (0.86; 2.96)		
G_Rothia (B)		0.567	0.949		0.670	0.941		0.709	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.363 (0.73; 2.55)			1.298 (0.68; 2.47)			1.286 (0.67; 2.45)		
No breastfeeding	1.424 (0.67; 3.01)			1.355 (0.63; 2.91)			1.318 (0.61; 2.85)		
G_Bifidobacterium (B)		0.461	0.898		0.426	0.937		0.266	
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.751 (0.26; 2.19)			0.671 (0.22; 2.03)			0.567 (0.18; 1.75)		
No breastfeeding	1.927 (0.36; 10.21)			1.765 (0.32; 6.65)			1.885 (0.33; 10.64)		
G_Collinsella (B)		0.691	0.953		0.858	0.941		0.794	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		

Mixed breastfeeding	1.303 (0.48; 3.53)			1.69 (0.39; 3.49)			1.049 (0.34; 3.23)		
No breastfeeding	1.812 (0.45; 7.25)			1.509 (0.35; 6.52)			1.642 (0.36; 7.47)		
G_Eggerthella (B)		0.833	0.968		0.910	0.941		0.876	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.956 (0.59; 1.55)			1.077 (0.64; 1.80)			1.141 (0.67; 1.95)		
No breastfeeding	0.836 (0.46; 1.52)			0.958 (0.51; 1.80)			1.033 (0.54; 1.99)		
G_Gordonibacter (B)		0.448	0.898		0.501	0.941		0.544	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.705 (0.41; 1.21)			0.729 (0.41; 1.29)			0.752 (0.42; 1.35)		
No breastfeeding	0.806 (0.42; 1.56)			0.942 (0.47; 1.88)			1.000 (0.49; 2.04)		
G_Olsenella (B)		0.786	0.958		0.648	0.941		0.554	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.852 (0.52; 1.39)			0.783 (0.47; 1.31)			0.747 (0.44; 1.27)		
No breastfeeding	0.968 (0.53; 1.76)			0.870 (0.47; 1.63)			0.834 (0.44; 1.58)		

G_Senegalimassilia (B)		0.200	0.898		0.234	0.926		0.274	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.080 (0.67; 1.76)			0.953 (0.56; 1.63)			0.908 (0.52; 1.58)		
No breastfeeding	1.681 (0.92; 3.09)			1.589 (0.81; 3.10)			1.508 (0.76; 3.01)		
G_Slackia (B)		0.315	0.898		0.371	0.926		0.401	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.412 (0.85; 2.35)			1.278 (0.74; 2.20)			1.213 (0.70; 2.11)		
No breastfeeding	1.019 (0.55; 1.88)			0.854 (0.44; 1.64)			0.802 (0.41; 1.57)		
G_Barnesiella (B)		0.951	0.984		0.794	0.941		0.810	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.036 (0.60; 1.78)			1.034 (0.59; 1.81)			1.034 (0.59; 1.83)		
No breastfeeding	0.941 (0.49; 1.82)			0.837 (0.42; 1.66)			0.843 (0.42; 1.68)		
G_Butyricimonas (B)		0.081	0.898		0.095	0.926		0.105	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		

Mixed breastfeeding	1.898 (1.08; 3.32)			1.882 (1.06; 3.34)			1.880 (1.05; 3.37)		
No breastfeeding	1.427 (0.73; 2.81)			1.355 (0.68; 2.70)			1.405 (0.70; 2.84)		
G_Odoribacter (B)		0.849	0.968		0.807	0.941		0.765	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.294 (0.53; 3.14)			1.333 (0.53; 3.36)			1.394 (0.55; 3.55)		
No breastfeeding	1.141 (0.39; 3.36)			1.344 (0.44; 4.14)			1.378 (0.43; 4.38)		
G_Porphyrromonas (B)		0.454	0.898		0.383	0.926		0.397	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.749 (0.42; 1.35)			0.725 (0.40; 1.32)			0.725 (0.40; 1.33)		
No breastfeeding	1.069 (0.54; 2.14)			1.088 (0.54; 2.21)			1.082 (0.53; 2.21)		
G_Alloprevotella (B)		0.170	0.898		0.168	0.926		0.174	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.842 (0.89; 3.82)			1.843 (0.86; 3.96)			1.894 (0.86; 4.18)		
No breastfeeding	1.099 (0.43; 2.80)			1.015 (0.38; 2.70)			1.047 (0.38; 2.87)		

G_Paraprevotella (B)		0.653	0.953		0.838	0.941		0.916	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.244 (0.76; 2.03)			1.155 (0.70; 1.91)			1.103 (0.66; 1.85)		
No breastfeeding	1.249 (0.68; 2.28)			1.159 (0.63; 2.15)			1.123 (0.60; 2.11)		
G_Elusimicrobium (B)		0.210	0.898		0.351	0.926		0.256	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.981 (0.43; 2.21)			0.879 (0.38; 2.04)			0.861 (0.37; 2.02)		
No breastfeeding	1.878 (0.78; 4.55)			1,572 (0.63; 3.94)			1.694 (0.67; 4.30)		
G_Enterococcus (B)		0.808	0.959		0.875	0.941		0.900	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.838 (0.46; 1.52)			0.864 (0.46; 1.62)			0.885 (0.47; 1.67)		
No breastfeeding	0.811 (0.38; 1.71)			0.838 (0.38; 1.83)			0.846 (0.39; 1.86)		
G_Lactobacillus (B)		0.267	0.898		0.303	0.926		0.290	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		

Mixed breastfeeding	1.184 (0.72; 1.94)			1.131 (0.67; 1.90)			1.079 (0.64; 1.83)		
No breastfeeding	1.672 (0.90; 3.12)			1.649 (0.86; 3.17)			1.643 (0.85; 3.18)		
G_Streptococcus (B)		0.894	0.968		0.919	0.941		0.937	0.955
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.824 (0.28; 2.44)			0.873 (0.28; 2.68)			0.873 (0.28; 2.75)		
No breastfeeding	0.740 (0.21; 2.65)			0.758 (0.20; 2.83)			0.778 (0.20; 3.04)		
G_Christensenella (B)		0.671	0.953		0.560	0.941		0.552	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.898 (0.50; 1.63)			0.889 (0.48; 1.64)			0.910 (0.49; 1.68)		
No breastfeeding	1.197 (0.59; 2.42)			1.270 (0.62; 2.62)			1.310 (0.63; 2.71)		
G_Mogibacterium (B)		0.348	0.898		0.442	0.938		0.461	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.971 (0.55; 1.72)			0.878 (0.48; 1.60)			0.865 (0.47; 1.59)		
No breastfeeding	1.481 (0.76; 2.88)			1.314 (0.66; 2.64)			1.289 (0.64; 2.61)		

G_Eubacterium (B)		0.021	0.898		0.047	0.926		0.049	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	2.207 (1.18; 4.11)			2.041 (1.07; 3.90)			2.037 (1.06; 3.92)		
No breastfeeding	2.449 (1.07; 5.61)			2.361 (1.00; 5.57)			2.385 (1.00; 5.69)		
G_Butyrvibrio (B)		0.728	0.953		0.678	0.941		0.554	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.877 (0.53; 1.45)			0.790 (0.46; 1.35)			0.746 (0.43; 1.29)		
No breastfeeding	1.081 (0.59; 1.99)			0.901 (0.47; 1.72)			0.895 (0.46; 1.73)		
G_Clostridium_xlvb (B)		0.597	0.953		0.580	0.941		0.552	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.691 (0.28; 1.71)			0.580 (0.29; 1.89)			0.733 (0.29; 1.87)		
No breastfeeding	1.057 (0.32; 3.47)			1.253 (0.37; 4.21)			1.278 (0.37; 4.36)		
G_Eisenbergiella (B)		0.544	0.949		0.897	0.941		0.944	0.955
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		

Mixed breastfeeding	0.789 (0.49; 1.28)			0.892 (0.53; 1.50)			0.940 (0.56; 1.59)		
No breastfeeding	0.7423 (0.41; 1.35)			0.885 (0.47; 1.67)			0.896 (0.47; 1.71)		
G_Howardella (B)		0.717	0.953		0.854	0.941		0.844	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.236 (0.73; 2.04)			1.115 (0.65; 1.92)			1.106 (0.64; 1.92)		
No breastfeeding	1.071 (0.57; 2.01)			0.958 (0.49; 1.86)			0.934 (0.47; 1.84)		
G_Lactonifactor (B)		0.298	0.898		0.297	0.926		0.364	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.621 (0.34; 1.13)			0.602 (0.32; 1.14)			0.620 (0.32; 1.20)		
No breastfeeding	0.724 (0.35; 1.52)			0.742 (0.34; 1.62)			0.774 (0.35; 1.73)		
G_Peptococcus (B)		0.088	0.898		0.141	0.926		0.136	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.951 (1.07; 3.55)			1.866 (1.01; 3.46)			1.891 (1.01; 3.54)		
No breastfeeding	1.761 (0.86; 3.60)			1.585 (0.76; 3.31)			1.517 (0.72; 3.21)		

G_Peptoniphilus (B)		0.130	0.898		0.132	0.926		0.126	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.991 (0.55; 1.78)			1.093 (0.59; 2.01)			1.096 (0.59; 2.02)		
No breastfeeding	1.760 (0.90; 3.44)			1.907 (0.95; 3.84)			1.934 (0.95; 3.92)		
G_Peptostreptococcus (B)		0.309	0.898		0.300	0.926		0.273	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.652 (0.37; 1.15)			0.639 (0.36; 1.14)			0.623 (0.35; 1.12)		
No breastfeeding	0.869 (0.44; 1.71)			0.842 (0.42; 1.68)			0.820 (0.41; 1.65)		
G_Terrisporobacter (B)		0.273	0.898		0.239	0.926		0.334	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.643 (0.37; 1.11)			0.611 (0.35; 1.08)			0.643 (0.36; 1.15)		
No breastfeeding	0.701 (0.35; 1.38)			0.718 (0.36; 1.45)			0.747 (0.37; 1.53)		
G_Anaerofilum (B)		0.703	0.953		0.681	0.941		0.726	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		

Mixed breastfeeding	0.864 (0.53; 1.40)			0.886 (0.54; 1.46)			0.929 (0.56; 1.54)		
No breastfeeding	1.061 (0.59; 1.92)			1.122 (0.61; 2.06)			1.166 (0.63; 2.17)		
G_Anaerotruncus (B)		0.311	0.898		0.440	0.938		0.477	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.621 (0.31; 1.26)			0.653 (0.32; 1.35)			0.649 (0.31; 1.34)		
No breastfeeding	0.548 (0.24; 1.25)			0.610 (0.26; 1.42)			0.649 (0.28; 1.53)		
G_Flavonifractor (B)		0.852	0.968		0.792	0.941		0.818	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.840 (0.46; 1.55)			0.803 (0.42; 1.53)			0.859 (0.44; 1.66)		
No breastfeeding	0.869 (0.41; 1.83)			0.817 (0.37; 1.79)			0.776 (0.35; 1.72)		
G_Intestinimonas (B)		0.993	0.993		0.902	0.941		0.848	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.029 (0.62; 1.70)			1.128 (0.67; 1.91)			1.170 (0.68; 2.00)		
No breastfeeding	1.009 (0.54; 1.87)			1.101 (0.58; 2.09)			1.010 (0.57; 2.12)		

G_Pseudoflavonifractor (B)		0.143	0.898		0.233	0.926		0.286	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.566 (0.32; 1.01)			0.582 (0.31; 1.08)			0.601 (0.32; 1.13)		
No breastfeeding	0.641 (0.31; 1.31)			0.706 (0.33; 1.51)			0.719 (0.33; 1.56)		
G_Catenibacterium (B)		0.243	0.898		0.370	0.926		0.518	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.451 (0.89; 2.37)			1.409 (0.82; 2.42)			1.341 (0.77; 2.35)		
No breastfeeding	1.561 (0.86; 2.84)			1.514 (0.78; 2.93)			1.409 (0.71; 2.79)		
G_Clostridium_XVIII (B)		0.680	0.953		0.370	0.926		0.858	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.741 (0.38; 1.46)			0.796 (0.39; 1.61)			0.818 (0.40; 1.67)		
No breastfeeding	0.858 (0.37; 1.98)			0.872 (0.37; 2.07)			0.867 (0.36; 2.08)		
G_Holdemanella (B)		0.296	0.898		0.495	0.941		0.691	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.502 (0.90; 2.51)			1.352 (0.77; 2.37)			1.230 (0.69; 2.19)		

No breastfeeding	1.230 (0.66; 2.30)			1.023 (0.52; 2.02)			0.976 (0.48; 1.97)		
G_Holdemania (B)		0.112	0.898			0.164	0.926		0.199
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.656 (0.41; 1.08)			0.675 (0.41; 1.12)			0.732 (0.44; 1.23)		
No breastfeeding	0.545 (0.30; 0.99)			0.574 (0.30; 1.06)			0.562 (0.30; 1.06)		
G_Turicibacter (B)		0.576	0.949			0.662	0.941		0.815 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.904 (0.43; 1.90)			0.872 (0.41; 1.85)			0.869 (0.40; 1.87)		
No breastfeeding	0.953 (0.28; 1.53)			0.675 (0.28; 1.61)			0.747 (0.31; 1.83)		
G_Phascolarctobacterium (B)		0.394	0.898			0.403	0.930		0.291 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.104 (0.62; 1.98)			1.086 (0.59; 1.98)			1.130 (0.61; 2.08)		
No breastfeeding	0.724 (0.37; 1.43)			0.708 (0.35; 1.43)			0.679 (0.33; 1.38)		
G_Allisonella (B)		0.416	0.898			0.547	0.941		0.685 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.130 (0.69; 1.86)			0.971 (0.57; 1.65)			0.935 (0.54; 1.62)		
No breastfeeding	1.492 (0.82; 2.73)			1.325 (0.70; 2.51)			1.211 (0.63; 2.34)		
G_Dialister (B)		0.368	0.898			0.375	0.926		0.346 0.943

Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.849 (0.51; 1.40)			0.835 (0.50; 1.41)			0.818 (0.48; 1.38)		
No breastfeeding	1.276 (0.68; 2.41)			1.261 (0.65; 2.43)			1.256 (0.65; 2.43)		
G_Megamonas (B)		0.252	0.898			0.118	0.926		0.171 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.632 (0.36; 1.10)			0.553 (0.31; 0.98)			0.573 (0.32; 1.03)		
No breastfeeding	0.845 (0.43; 1.64)			0.794 (0.40; 1.57)			0.738 (0.37; 1.48)		
G_Megasphaera (B)		0.385	0.898			0.367	0.926		0.439 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.582 (0.83; 3.03)			1.609 (0.81; 3.18)			1.538 (0.77; 3.06)		
No breastfeeding	1.409 (0.64; 3.10)			1.239 (0.54; 2.82)			1.188 (0.51; 2.75)		
G_Mitsuokella (B)		0.343	0.898			0.268	0.926		0.182 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.877 (0.49; 1.58)			0.793 (0.43; 1.46)			0.744 (0.40; 1.39)		
No breastfeeding	1.381 (0.70; 2.73)			1.34 (0.65; 2.73)			1.372 (0.66; 2.84)		
G_Veillonella (B)		0.361	0.898			0.406	0.930		0.318 0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.994 (0.59; 1.68)			0.958 (0.55; 1.66)			0.930 (0.53; 1.62)		

No breastfeeding	1.537 (0.77; 3.05)			1.474 (0.72; 2.99)			1.536 (0.75; 3.16)		
G_Victivallis (B)		0.940	0.984		0.887	0.941		0.898	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.047 (0.63; 1.74)			1.046 (0.62; 1.77)			1.046 (0.61; 1.79)		
No breastfeeding	0.949 (0.51; 1.76)			0.906 (0.48; 1.72)			0.910 (0.47; 1.75)		
G_Parasutterella (B)		0.395	0.898		0.349	0.926		0.425	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.685 (0.40; 1.18)			0.672 (0.38; 1.18)			0.694 (0.39; 1.23)		
No breastfeeding	0.807 (0.41; 1.58)			0.876 (0.43; 1.75)			0.875 (0.43; 1.76)		
G_Sutterella (B)		0.396	0.898		0.688	0.941		0.820	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	1.412 (0.86; 2.33)			1.260 (0.74; 2.13)			1.189 (0.69; 2.05)		
No breastfeeding	1.292 (0.70; 2.39)			1.181 (0.62; 2.25)			1.096 (0.56; 2.13)		
G_Bilophila (B)		0.047	0.898		0.063	0.926		0.078	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.551 (0.24; 1.27)			0.545 (0.23; 1.28)			0.546 (0.23; 1.29)		
No breastfeeding	0.323 (0.13; 0.80)			0.329 (0.13; 0.84)			0.339 (0.13; 0.87)		
G_Desulfovibrio (B)		0.947	0.984		0.914	0.941		0.881	0.943

Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.920 (0.51; 1.65)			0.921 (0.51; 1.67)			0.945 (0.52; 1.73)		
No breastfeeding	0.897 (0.44; 1.82)			0.856 (0.42; 1.76)			0.831 (0.40; 1.73)		
G_Campylobacter (B)		0.618	0.953		0.594	0.941		0.613	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.805 (0.46; 1.41)			0.793 (0.45; 1.40)			0.793 (0.45; 1.41)		
No breastfeeding	1.046 (0.54; 2.04)			1.046 (0.53; 2.07)			1.034 (0.52; 2.06)		
G_Haemophilus (B)		0.706	0.953		0.668	0.941		0.613	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.811 (0.49; 1.36)			0.796 (0.48; 1.33)			0.810 (0.49; 1.35)		
No breastfeeding	0.839 (0.46; 1.56)			0.816 (0.44; 1.52)			0.833 (0.44; 1.56)		
G_Akkermansia (B)		0.122	0.898		0.128	0.926		0.131	0.943
Exclusive breastfeeding	Ref			Ref			Ref		
Mixed breastfeeding	0.660 (0.39; 1.12)			0.648 (0.38; 1.12)			0.662 (0.38; 1.15)		
No breastfeeding	0.527 (0.28; 0.99)			0.524 (0.27; 1.00)			0.517 (0.27; 0.99)		

B = Binary model; Q = Quantitative model; G= Genus; P = Phylum; OR = Odds Ratio; Ref = Reference; FDR = False discovery rate.

^a Adjusted for sex, skin color, family income in the perinatal period, maternal education, gestational age, type of delivery, smoking during pregnancy, birth weight, mother's age, parity.

^b Adjusted model (a) with feeding variables at age 12

Seção V.

Nota para a imprensa

Estudo avalia impactos do consumo de ultraprocessados, genética e aleitamento materno na microbiota intestinal de crianças e adolescentes

A microbiota intestinal humana é composta por trilhões de microorganismos, predominantemente bactérias, que desempenham papéis fundamentais na digestão, síntese de vitaminas, regulação do sistema imunológico e na comunicação pelo eixo intestino-cérebro. Essa comunidade microbiana é altamente individualizada e dinâmica, sofrendo influência de fatores como tipo de parto, alimentação, uso de medicamentos, genética e estilo de vida ao longo da vida.

Um estudo recente, conduzido com dados da coorte de nascimentos de 2004 de Pelotas/RS, avaliou como o consumo de alimentos ultraprocessados (AUP), variantes genéticas e a duração do aleitamento materno influenciam a composição da microbiota intestinal na adolescência. A análise envolveu dados de microbiota fecal coletados aos 12 anos de idade, combinados com informações alimentares coletadas aos 6, 11 e 12 anos, dados genéticos obtidos aos 6 anos e dados de aleitamento aos 3 meses de vida.

Os resultados sugerem que a maior ingestão de AUP — incluindo produtos como biscoitos recheados, salgadinhos e refrigerantes — esteve associada a alterações na diversidade e composição bacteriana intestinal, particularmente aos 11 anos. Observou-se redução de gêneros benéficos como *Bacteroides* e aumento de *Peptostreptococcus* e *Actinobacteria*. Embora essas alterações possam ter implicações para a saúde metabólica e imunológica, não foram associações consistentes quando consideramos características maternas e do início da vida.

No componente genético, uma variante do gene *SLC5A1* foi associada a menor abundância da bactéria *Oxalobacter*, um gênero potencialmente envolvido na regulação do metabolismo do oxalato. Apesar do achado interessante, são necessários estudos adicionais para confirmar esse possível vínculo causal e biologicamente plausível entre genética e microbiota, e como isso pode impactar na saúde humana.

Este estudo contribui para o entendimento das diferentes influências sobre a microbiota intestinal na infância e adolescência, destacando a complexidade das interações entre dieta, genética e história de vida. Com uma

amostra de base populacional e numericamente robusta, acrescentamos evidências em um contexto ainda pouco representado na literatura — uma população miscigenada, de país em desenvolvimento e fora de grupos de alto risco. Além das limitações estatísticas, os achados suscitam novos questionamentos sobre a influência de fatores contextuais na modulação da microbiota ao longo do tempo, reforçando a importância de hábitos alimentares saudáveis desde a infância.

O estudo foi conduzido pela doutoranda Etiene Dias Alves, sob orientação da professora Dr^a. Luciana Tovo-Rodrigues e coorientação das Dra. Maria Carolina Borges e Marina Xavier Carpena, como parte do doutorado em Epidemiologia, do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, da Universidade Federal de Pelotas. A publicação completa do estudo pode ser encontrada na página do Programa (<http://www.epidemiologia-ufpel.org.br/>).