

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Nathalia Ferrazzo Naspolini

Avaliação longitudinal da microbiota intestinal de uma coorte de nascimentos exposta a poluentes ambientais durante o período perinatal: Projeto Infância e Poluentes Ambientais (PIPA)

Rio de Janeiro

2021

Nathalia Ferrazzo Naspolini

Avaliação longitudinal da microbiota intestinal de uma coorte de nascimentos exposta a poluentes ambientais durante o período perinatal: Projeto Infância e Poluentes Ambientais (PIPA)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Josino Costa Moreira/ENSP-Fiocruz.

Coorientadores: Prof. Dr. Armando Meyer e Prof.^a Dra. Maria Gloria Domiguez-Bello.

Rio de Janeiro

2021

Título do trabalho em inglês: Gut microbiota evaluation of a birth cohort exposed to environmental pollutants during the first six months of life: The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA project).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – 88882.442923/2019-01.

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

N263a Napolini, Nathalia Ferrazzo.
Avaliação longitudinal da microbiota intestinal de uma coorte de nascimentos exposta a poluentes ambientais durante o período perinatal: Projeto Infância e Poluentes Ambientais (PIPA) / Nathalia Ferrazzo Napolini. — 2021.
168 f. : il. color. ; graf. ; tab.

Orientador: Josino Costa Moreira.
Coorientadores: Armando Meyer e Maria Gloria Domiguez-Bello.
Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2021.

1. Poluentes Ambientais. 2. Microbioma Gastrointestinal.
3. Desenvolvimento Infantil. 4. Exposição Ambiental. 5. Microbiota Intestinal. 6. Alimento Ultraprocessado. I. Título.

CDD – 23.ed. – 363.7

Nathalia Ferrazzo Naspolini

Avaliação longitudinal da microbiota intestinal de uma coorte de nascimentos exposta a poluentes ambientais durante o período perinatal: Projeto Infância e Poluentes Ambientais (PIPA)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 25 de maio de 2021.

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Carla Taddei de Castro Neves
Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Prof.^a Dra. Ana Rosa Linde Arias
University of Massachusetts

Prof. Dr. Paulo Barrocas
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Ivano de Filippis
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Prof.^a Dra. Maria Gloria Dominguez-Bello (Coorientadora)
Rutgers University

Prof. Dr. Armando Meyer (Coorientador)
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Estudos de Saúde Coletiva

Prof. Dr. Josino Costa Moreira (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro
2021

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Armando, por aceitar prontamente orientar este trabalho. Por ter sido um conselheiro nos mais variados momentos, por estar sempre disponível e por ensinar tudo tão pacientemente.

Ao meu orientador, professor Josino, por me apoiar tanto desde o início deste estudo, pelas palavras de incentivo. Agradeço sua generosidade e confiança desde o começo.

Me sinto honrada de ter desenvolvido este trabalho ao lado de dois importantes pesquisadores.

À professora Gloria, pela afetuosa acolhida e experiência proporcionada durante o estágio de pesquisa no exterior. E desde meu retorno, agradeço por disponibilizar seu tempo e me ensinar tanto.

Ao projeto PIPA, em especial à coordenadora prof^a Dr. Carmen Froes, e à equipe de trabalho do PIPA pela ajuda em diversas etapas desta pesquisa e pela amizade. Agradeço, em especial à Ana Natividade, Aline, Mônica, Nataly, Amanda e Helen, mulheres pesquisadoras com quem tive a honra de conviver, pela inspiração e incentivo.

Ao *Dominguez-bello team*, em especial ao Haipeng e Moises, pela participação valiosa na realização deste trabalho e em outras atividades realizadas durante minha estadia na Universidade Rutgers.

Ao Laboratório de Toxicologia do IESC (LabTox), em especial à Aline, por estar sempre tão disposta a ensinar e ajudar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente (PPGSPMA) por ter possibilitado a realização deste trabalho. Pelo evidente cuidado que todos os membros do programa dispõem na formação dos alunos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado no país e pela bolsa de estágio de pesquisa no exterior.

À Priscila e Zé Caetano, amigos, companheiros, colegas de trabalho, sou infinitamente grata por tê-los em minha vida.

Às amigas que fiz durante essa jornada, Juliana, Paula e Amanda, pela companhia, risadas e apoio mútuo.

À minha mãe e minhas irmãs minhas parceiras de vida.

Muito obrigada!

RESUMO

Este estudo é parte do Projeto Infância e Poluentes Ambientais (PIPA). A contaminação do meio ambiente com uma ampla variedade de poluentes ambientais pode impactar os ecossistemas, diminuir a diversidade microbiana ambiental e alterar a microbiota associada ao trato gastrointestinal. No entanto, o efeito da exposição a poluentes ambientais na microbiota intestinal em desenvolvimento ainda é pouco investigado. Esta tese tem como objetivo estudar o efeito da exposição a poluentes ambientais na microbiota intestinal durante os primeiros seis meses de vida. Além de investigar a relação entre o consumo materno de alimentos ultraprocessados com níveis de poluentes no sangue de cordão umbilical. O gene 16S rRNA foi avaliado em amostras de mecônio e fezes de bebês com um, três e seis meses de vida e o microbioma infantil foi associado com as concentrações de metais (arsênio, cádmio, mercúrio e chumbo), substâncias perfluoroaquiladas (PFAS) e pesticidas aferidos no sangue e urina maternos e no sangue de cordão umbilical. O consumo materno de alimentos ultraprocessados foi investigado por meio de questionário de frequência alimentar. Os resultados mostram que o efeito da exposição aos poluentes foi maior quando associado a estressores do início da vida como parto cesariano e nascimento pré-termo em relação a bebês que nasceram por parto vaginal. O efeito da exposição aos poluentes na microbiota fecal também apresentou maior magnitude em bebês sob aleitamento materno exclusivo, o que sugere contaminação do leite materno. As alterações observadas na microbiota associadas a exposição aos poluentes foram diferentes quando os poluentes foram aferidos no sangue materno ou no cordão umbilical – sugerindo que o momento da exposição pode ser importante. Por fim, apesar da alta variabilidade intrínseca a microbiota em desenvolvimento, comunidades microbianas foram consistentemente afetadas por todos os poluentes, com *clusters* de táxons presentes em amostras de bebês com alta exposição aos poluentes. Além disso, recém-nascidos de mães que consumiram três ou mais subgrupos de alimentos ultraprocessados apresentaram maiores níveis de PFAS no cordão umbilical. Os resultados evidenciam que a exposição perinatal a poluentes ambientais se associa com alterações da microbiota em desenvolvimento o que pode ter relevância para a saúde. Nossos achados mostram que o consumo de alimentos ultraprocessados é uma via potencialmente importante de exposição a essas substâncias.

Palavras-chave: Poluentes ambientais. Microbiota intestinal. Colonização microbiana. Desenvolvimento infantil. Alimento ultraprocessado.

ABSTRACT

This study is part of the PIPA Project (The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development). Industrialization has led to substantial environmental degradation including loss of the ecosystem diversity. Emerging evidence suggests that gut microbiota is a key player that must be considered to assess the toxicity of environmental contaminants, although still not fully understood. This thesis aims to determine differences in early microbiome composition in a birth cohort with varying exposure levels to environmental pollutants (metals, PFAS, and pesticides). Besides, to investigate the association of maternal consumption of ultra-processed foods (UPFs) with newborn exposure to environmental pollutants. We conducted 16S rRNA gene sequencing on meconium and developmental fecal samples from the PIPA birth cohort and assessed maternal UPF consumption using a qualitative food frequency questionnaire. The results indicate that the magnitude of the microbiome changes associated with increasing pollutant exposure was biggest in CS-born and CS-born-preterm babies, in relation to vaginally (VG) delivered infants. Notably, breastfeeding was associated with a stronger pollutant-associated effect on the infant feces, suggesting that the exposure source could be maternal milk. Differences in microbiome effects associated with maternal blood or cord blood pollutant concentrations suggest that fetal exposure time – intrauterine or perinatal- may matter. Finally, despite the high developmental microbiota variability, specific microbionts were consistently affected across all pollutants, with taxa clusters found in samples from infants exposed to the highest toxicant exposure. Newborns of pregnant women who consumed three or more subgroups of UPF weekly presented the highest level of PFAS in umbilical cord blood. A dose-response effect trended toward significance. The results evidence that maternal exposure to environmental pollutants is associated with alterations in gut microbiome development which may have health significance. Our findings also suggest that newborns' exposure to PFAS is, at least in part, due to maternal UPF consumption.

Keywords: Gut microbiome. Environmental pollutants. Early-life gut microbiome. Microbial colonization. Ultra-processed food.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
• Avaliar o efeito da exposição perinatal a poluentes ambientais na transmissão vertical da microbiota (amostras de mecônio) de acordo com o tipo de parto, idade gestacional e uso de antibióticos durante a gestação	29
• Avaliar o efeito da exposição perinatal a poluentes ambientais no desenvolvimento da microbiota intestinal (amostras de fezes no primeiro, terceiro e sexto mês de vida) de acordo com o tipo de parto, uso de antibióticos e dieta do bebê.....	29
• Avaliar a relação entre o consumo materno de alimentos ultraprocessados e os níveis de PFASs no sangue de cordão umbilical	29
3. METODOLOGIA	30
3.1 DESENHO DO ESTUDO	30
3.2 LOCAL DO ESTUDO.....	31
3.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO	31
3.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	32
3.5 CRITÉRIOS DE PERDAS	32
3.6 VARIÁVEIS ESTUDADAS	32
3.6.1 Variáveis de exposição	32
3.6.2 Variáveis de confundimento	33
3.6.3 Variáveis de desfecho	33
3.7 QUESTIONÁRIO GESTANTE	34
3.8 FORMULÁRIO DE RELATO DE CASO (FRC/RECÉM-NASCIDO).....	34
3.9 FORMULÁRIO DE RELATO DE CASO (FRC/SEGUIMENTO)	35
3.10 COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS	35
3.11 ANÁLISE DA MICROBIOTA	35
3.11.1 Coleta e armazenamento das amostras	35
3.11.2 Extração e purificação do DNA	36
3.11.3 Amplificação e sequenciamento do RNAr 16S	36
3.11.4 Análise de bioinformática	36
3.11.5 Métricas para avaliar a diversidade da microbiota	37

3.11.6 Análise taxonômica	39
3.12 ANÁLISE LABORATORIAL DOS METAIS E METALÓIDE (ARSÊNIO, CÁDMIO, CHUMBO E MERCÚRIO)	39
3.13 ANÁLISE LABORATORIAL DOS AGROTÓXICOS	39
3.13.1 Piretróides	39
3.13.2 Compostos organoclorados	40
3.14 ANÁLISE LABORATORIAL DAS PFAS	41
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
3.15.1 Paras as métricas da microbiota	41
3.15.2 Descrição das variáveis de exposição aos poluentes	42
3.16 ASPECTOS ÉTICOS	42
4. EXPOSIÇÃO PERINATAL A POLUENTES AMBIENTAIS E O IMPACTO NA MICROBIOTA INTESTINAL NO INÍCIO DA VIDA	44
5. O CONSUMO MATERNO DE ALIMENTOS DE ACORDO COM O GRAU DE PROCESSAMENTO, DIVERSIDADE ALIMENTAR E A CONTRIBUIÇÃO DE FATORES SOCIODEMOGRÁFICOS	93
6. O CONSUMO MATERNO DE ALIMENTOS ULTRAPROCESSADOS E AS CONCENTRAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS PERFLUOROALQUILADAS EM AMOSTRAS DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL	104
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
REFERÊNCIAS	117
ANEXO I	130
ANEXO II	156
ANEXO III	161

APRESENTAÇÃO

Esta tese buscou estudar o efeito da exposição perinatal a poluentes ambientais na colonização microbiana intestinal no início da vida e está estruturada na forma de coletânea composta por um capítulo introdutório, dois manuscritos submetidos e um artigo publicado em 2020.

O primeiro capítulo apresenta o referencial teórico que fundamentou este estudo, em especial como ocorre a aquisição da microbiota no início da vida. A importância da microbiota devido sua relação com o desenvolvimento de órgãos e sistemas e consequentemente a saúde do hospedeiro. Este capítulo trata também de como ocorre a exposição humana a poluentes ambientais e como estes poluentes podem alterar a microbiota ambiental e humana.

Os manuscritos e artigo serão apresentados como resultados obtidos ao longo deste trabalho como forma de concretizar os objetivos deste estudo. Os dois manuscritos elaborados e o artigo publicado foram realizados a partir de dados obtidos durante o estudo piloto do PIPA (Projeto Infância e Poluentes Ambientais) conduzido entre outubro de 2017 a agosto de 2018.

O manuscrito “Perinatal exposure to environmental pollutants is associated with altered early-life gut microbiome” (capítulo 4), avalia o efeito da exposição a poluentes ambientais na microbiota intestinal no início da vida.

O artigo “Food consumption according to the degree of processing, dietary diversity and socio-demographic factors among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil: The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA project)”, apresentado no capítulo 5, avalia o consumo de alimentos ultraprocessados e não ultraprocessados pelas gestantes estudadas pelo PIPA. Avalia também fatores sociodemográficos relacionados ao consumo destes alimentos.

Este artigo foi publicado no periódico *Nutrition and Health* em 2020 e seus resultados foram também apresentados nos congressos *World Public Health Nutrition Congress*, realizado virtualmente em 2020 na Austrália e *International Society for Environmental Epidemiology*, realizado em 2019 na Holanda.

O capítulo 6, “Maternal consumption of ultra-processed foods and newborn exposure to perfluoroalkyl substances (PFAS): Rio Birth Cohort Study on Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA Project)”, relaciona o consumo materno de alimentos ultraprocessados com as concentrações de substâncias perfluoroalquiladas em amostras de sangue de cordão umbilical. Este artigo foi submetido para publicação no

Cadernos de Saúde Pública. Resultados oriundos deste estudo foram apresentados no simpósio eSymposia *Optimizing Nutrition for Maternal, Newborn and Child Health*, realizado virtualmente em 2020 nos Estados Unidos.

No sétimo e último capítulo dessa tese são apresentadas as considerações finais, incluindo as principais implicações dos achados deste estudo para as pesquisas na área da saúde.

Por fim, destaco minha participação em atividades de pesquisa no Brasil e no exterior como membro do PIPA/UFRJ e como pesquisadora visitante da Rutgers University, New Jersey, USA. Ainda, durante a realização da tese tive dois projetos contemplados em dois editais internacionais: Brazil Accelerator Fund, no valor de £ 20,000 e duração de 12 meses e o outro pela American National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS, P30-ES005022) no valor de USD 25,000 e duração de 12 meses.

1. INTRODUÇÃO

O PROCESSO DE COLONIZAÇÃO BACTERIANA NO INÍCIO DA VIDA

O termo microbiota se refere à coleção de microrganismos que habitam o nosso corpo (CHARBONNEAU; BLANTON; DIGIULIO; RELMAN *et al.*, 2016) e tem uma função primordial, que é a produção de metabólitos em concentrações que promovem a saúde (BYNDLOSS; BÄUMLER, 2018). A importância da microbiota para a saúde humana é tão grande que alguns autores a consideram como um órgão do corpo e como tal possui complexidade, patologia e fisiologia próprias (BAQUERO; NOMBELA, 2012). No entanto esta visão não é universalmente aceita, embora sua importância o seja (RICCIO; ROSSANO, 2020). A microbiota intestinal tem recebido especial atenção por estar, principalmente, localizada no intestino, uma das maiores e mais importantes interfaces entre o organismo e o exterior, responsável pela digestão dos alimentos, manutenção da integridade intestinal, produtora de vitaminas, neurotransmissores e outras substâncias bioativas e capazes de afetar a função de todos os órgãos do organismo humano (CHANG; LIN, 2016; THURSBY; JUGE, 2017).

A importância deste tema é tanta que em 2007 o National Institute of Health (NIH) aplicou 215 milhões de dólares destinados ao desenvolvimento do Projeto do Microbioma Humano (HMP), que envolveu a participação de inúmeros centros de pesquisa, com o objetivo de descrever as coleções de microrganismos que fazem parte de cinco microbiomas humanos (pele, boca, trato gastrointestinal, trato urogenital e nariz), determinar suas funções e seus impactos sobre o organismo humano e prover dados e procedimentos padronizados para este tipo de estudo (GEVERS; KNIGHT; PETROSINO; HUANG *et al.*, 2012).

O contato do organismo humano com os microrganismos ocorre desde a gestação, quando o feto é exposto uma carga microbiológica influenciada por fatores maternos. A exposição fetal a microrganismos e a esterilidade do ambiente intrauterino ainda são temas de debate no meio científico, mas já se conhece que a microbiota da mãe pode exercer um efeito indireto sobre o feto por meio de fatores relacionados ao organismo materno, como por exemplo, respostas imunes ou DNA e metabólitos microbianos capazes de atravessarem a barreira placentária. Independente disso, também é consenso que a carga bacteriana mais importante recebida pelo bebê ocorre no momento do parto, e este processo é conhecido como transmissão vertical da microbiota (DOMINGUEZ-BELLO; GODOY-VITORINO; KNIGHT; BLASER, 2019).

No início da vida a microbiota intestinal é altamente dinâmica e apresenta alta variação. Esta diversidade aumenta gradualmente até o estabelecimento de uma microbiota *adulta*, mais estável. O momento que esta transição ocorre é incerto, mas acredita-se que ocorra em torno do terceiro ano de vida. As primeiras bactérias a colonizarem o intestino e o aumento gradual da diversidade, até um ecossistema mais estável é crucial para estabelecer uma simbiose ótima com o hospedeiro (WOPEREIS; OOZEER; KNIPPING; BELZER *et al.*, 2014).

Seja pela passagem através do canal vaginal ou pelo parto cesariano, a microbiota vaginal e da pele materna e/ou o ambiente hospitalar serão os primeiros inóculos de microorganismos para o bebê. A transmissão vertical tem continuidade durante todo o período de aleitamento pelo contato do bebê com a mãe, no qual ocorre uma ampla exposição da microbiota presente na pele do seio materno, e também parece ocorrer um tráfego de microorganismos do intestino para a glândula mamária (conhecido como tráfego *enteromamário*) (TANG; XU; CHEN; YAN *et al.*, 2019), além do conteúdo nutricional do leite materno que molda a colonização bacteriana no início da vida (BROWNE; NEVILLE; FORSTER; LAWLEY, 2017).

Logo após o nascimento, o contato direto do recém-nascido com o meio que o cerca também passa a ser uma forma importante de aquisição e modificação da microbiota, chamada transmissão horizontal. Diversos fatores contribuem em maior ou menor grau para esse processo, como fatores genéticos, a dieta, o contato com o meio ambiente/ambiente construído, a presença de outras crianças no domicílio, animais domésticos, dentre outros (BROWNE; NEVILLE; FORSTER; LAWLEY, 2017; GILBERT; STEPHENS, 2018).

Dentro deste contexto, a ecologia microbiana materna afeta as duas formas naturais de aquisição de microrganismos pelo bebê, representando o elo evolutivo na linha matrilinear (DOMINGUEZ-BELLO; GODOY-VITORINO; KNIGHT; BLASER, 2019). A microbiota materna é importante para a saúde durante a gestação, para o desenvolvimento fetal e pelo fato de que este primeiro inóculo prepara a colonização subsequente do bebê. Todos esses fatores vêm sendo amplamente relacionados com a saúde de seus descendentes na idade adulta (CHARBONNEAU; BLANTON; DIGIULIO; RELMAN *et al.*, 2016).

Após o nascimento a microbiota do bebê continua se desenvolvendo de forma conjunta com a maturação de outros órgãos e sistemas como o imunológico, metabólico, hormonal e nervoso. Alterações no processo de colonização microbiana neste período

podem ser a origem das doenças crônicas (BLASER, 2017; STIEMSMA; MICHELS, 2018). Diversos estudos associam perturbações da microbiota no início da vida com efeitos duradouros como, sobrepeso (MBAKWA; SCHERES; PENDERS; MOMMERS *et al.*, 2016), obesidade (COX; BLASER, 2015), desnutrição grave (SUBRAMANIAN; HUQ; YATSUNENKO; HAQUE *et al.*, 2014) atopia e asma (FUJIMURA; SITARIK; HAVSTAD; LIN *et al.*, 2016) e distúrbios psiquiátricos (PÄRTTY; KALLIOMÄKI; WACKLIN; SALMINEN *et al.*, 2015; STRATI; CAVALIERI; ALBANESE; DE FELICE *et al.*, 2017).

Outros estudos demonstraram que a transmissão vertical de determinados táxons bacterianos poderia estar comprometida em decorrência de algumas práticas nas fases iniciais da vida como tipo de parto, uso de antibióticos durante a gestação, (BÄCKHED; ROSWALL; PENG; FENG *et al.*, 2015; DOMINGUEZ-BELLO; COSTELLO; CONTRERAS; MAGRIS *et al.*, 2010; RUTAYISIRE; HUANG; LIU; TAO, 2016), obesidade materna (LEMAS; YOUNG; BAKER; TOMCZIK *et al.*, 2016), dieta materna (CHU; ANTONY; MA; PRINCE *et al.*, 2016) além do não-aleitamento (MULLIGAN; FRIEDMAN, 2017). Estes eventos além de contribuírem para o *desaparecimento* da microbiota, ou seja, a perda da diversidade microbiana de longo prazo (BLASER, 2017) implicam em desfechos de saúde ao longo da vida (STIEMSMA; MICHELS, 2018).

Estudos realizados em amostras de fezes provenientes de uma coorte de bebês suecos (n= 98) demonstraram que os primeiros microrganismos a colonizarem o trato gastrointestinal dos bebês eram provenientes da microbiota materna e os fatores-chave envolvidos na mudança/montagem para um microbioma do tipo adulto estava relacionado ao tipo de parto e cessação do aleitamento (e não a introdução de alimentos sólidos), que ocorreu em torno do 12º mês de vida (BÄCKHED; ROSWALL; PENG; FENG *et al.*, 2015).

As espécies pioneiras a colonizar o intestino do recém-nascido são bactérias anaeróbias facultativas como, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* (pertencente ao filo *Firmicute*), e *Enterobacter spp.* (filo *Proteobacteria*). Essas bactérias tornam o ambiente propício para a colonização subsequente por anaeróbios estritos, devido ao consumo de oxigênio, alteração do pH, diminuição do potencial redox e produção de dióxido de carbono e nutrientes (MULLIGAN; FRIEDMAN, 2017). A sucessão no processo de colonização feita por bactérias anaeróbias estritas como, *Bifidobacterium* (do filo *Actinobacteria*), *Bacteroides* (do filo *Bacteroidetes*), *Clostridium* e *Eubacterium spp.*, (do filo *Firmicute*) irá predominar depois de uma ou duas semanas de vida

(MULLIGAN; FRIEDMAN, 2017; WOPEREIS; OOZEER; KNIPPING; BELZER *et al.*, 2014).

O processo de colonização bacteriana no primeiro ano de vida foi descrito por Taddei e colaboradores (2014). Os autores identificaram em bebês brasileiros o predomínio da colonização intestinal por *Streptococcus* e *Escherichia* no terceiro mês de vida. No sexto mês, a colonização por *Escherichia* predominou enquanto algum outro grupo de microorganismo não identificado cresceu e no 12º mês de vida uma microbiota fecal mais complexa foi descrita (TADDEI; OLIVEIRA; DUARTE; TALARICO *et al.*, 2014). O mesmo grupo de autores discute uma possível relação entre a colonização por membros do gênero *Escherichia* com baixo nível sociodemográfico (TALARICO; SANTOS; BRANDT; MARTINEZ *et al.*, 2017).

Por outro lado, em uma coorte de bebês Noruegueses foi identificada espécies de *Staphylococcus* (pertencentes a ordem *Lactobacillales*) em 98% das amostras de fezes de bebês do sexo masculino e em 94% do sexo feminino, no quarto dia de vida. Também foi identificado *E. coli* em 77% das amostras de meninos com 4 dias de vida até 30 dias. Ademais, os achados da microbiota intestinal desta coorte foram associados ao crescimento esperado para a idade dos bebês (WHITE; BJØRNHOLT; BAIRD; MIDTVEDT *et al.*, 2013).

A colonização inicial por *Proteobacteria*, em específico a classe das *Gammaproteobacteria* (como por exemplo o gênero *Escherichia*), e sua subsequente diminuição em abundância parece ser parte importante desse processo de transição de uma microbiota neonatal para uma microbiota mais madura. Uma vez que prepara o ambiente intestinal para uma colonização subsequente e está relacionada com a modulação imunológica do hospedeiro. A supressão seletiva das *Proteobacteria* parece ocorrer devido a presença de oligossacarídeos presentes no leite materno e ao fornecimento de imunoglobulinas como a IgA secretória, ou seja, é um processo fisiológico orientado pelo leite materno (LEMAS; YOUNG; BAKER; TOMCZIK *et al.*, 2016; MULLIGAN; FRIEDMAN, 2017).

A ruptura desse padrão tem sido associada a um risco aumentado de doenças neonatais, particularmente em bebês prematuros, que devido a maior susceptibilidade a infecções são frequentemente tratados com antibióticos. Já foi descrito que bebês prematuros apresentam baixa diversidade microbiana intestinal e que o aumento da diversidade ocorre de maneira mais lenta, quando comparado a bebês nascidos a termo (GASPARRINI; WANG; SUN; KENNEDY *et al.*, 2019).

Aparentemente os estágios iniciais da vida, ou os primeiros mil dias, representam o período quando se estabelece os elementos necessários para o desenvolvimento de órgãos e sistemas e seus consequentes impactos à saúde na idade adulta (BHUTTA; AHMED; BLACK; COUSENS *et al.*, 2008). Por esta razão, o reconhecimento da influência da microbiota neste processo tem crescido na última década (STIEMSMA; MICHELS, 2018) e se tornado um objeto de estudo chave para a compreensão do crescente aumento das DCNT (Doenças Crônicas Não Transmissíveis) (INDRIO; MARTINI; FRANCAVILLA; CORVAGLIA *et al.*, 2017).

A MICROBIOTA INTESTINAL E A INTERFACE COM AS DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS

O desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) é resultado de uma complexa interação entre fatores genéticos e condições ambientais. A influência de exposições que ocorrem durante uma janela crítica como o início da vida e suas implicações na saúde na idade adulta foi originalmente descrita pela hipótese de Barker (Barker e Osmond, 1986), conhecida como o Conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença (do inglês, DOHaD – *Developmental Origins of Health and Disease Concept*) (BARKER; OSMOND, 1986; WATERLAND; MICHELS, 2007).

Mais recentemente, fatores decorrentes da vida moderna que impactam nos primeiros eventos da vida como o tipo de parto, uso de antibióticos, o não aleitamento exclusivo ou desmame precoce dentre outros, têm sido relacionados ao aumento das DCNTs (BLASER, 2017). As práticas modernas também têm levado ao aumento da exposição a poluentes ambientais como agrotóxicos e metais, decorrentes da industrialização, do modo de produção agrícola e da contaminação ambiental resultante (TERRA; PELAEZ, 2009). Tanto os procedimentos médicos, quanto a exposição substâncias exógenas são importantes para o estabelecimento e composição da diversidade do microbioma humano ((RENZ; HOLT; INOUE; LOGAN *et al.*, 2017; STIEMSMA; MICHELS, 2018).

Para congrega estas exposições e seus impactos sobre a saúde humana foi criado o termo exposoma, que procura identificar e eventualmente quantificar a totalidade das exposições que ocorrem ao longo da vida e como essas exposições relacionam-se com a saúde. Este conceito pode ser ampliado ainda para a ideia de que todos os organismos vivos, como as bactérias ambientais, são afetados pelas mudanças do ambiente externo ocasionadas pela vida moderna, como perda da biodiversidade e degradação do meio

ambiente. Desta forma, o ambiente externo em mutação também acarreta em alterações da microbiota ambiental (que pode ser definida como a diminuição da diversidade e/ou extinção de alguns táxons bacterianos) que relaciona-se com a microbiota associada ao trato gastrointestinal que impacta no desenvolvimento da função imunológica (RENZ; HOLT; INOUE; LOGAN *et al.*, 2017).

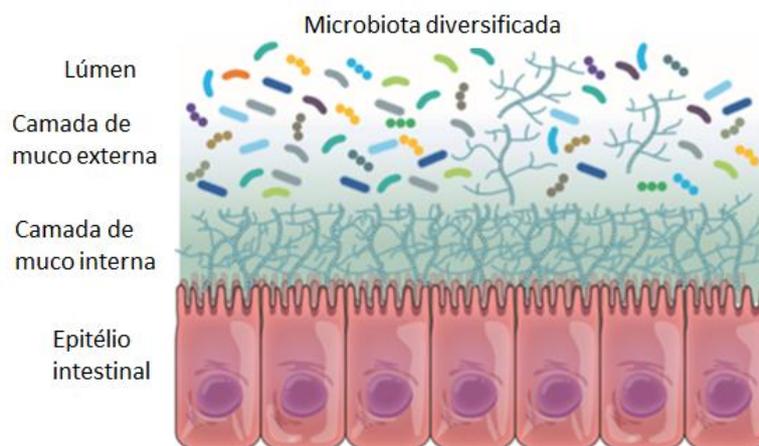
Apesar das diferenças fisiopatológicas, muitas das DCNT, incluindo os distúrbios mentais, estão frequentemente associadas a condições comuns como, disfunção imunológica, inflamação crônica e mais recentemente, alterações da microbiota (RENZ; HOLT; INOUE; LOGAN *et al.*, 2017; STIEMSMA; MICHELS, 2018). O papel da microbiota no processo saúde-doença vem sendo amplamente descrito. Teria início ainda na vida intrauterina, pela exposição fetal a determinados componentes microbianos e a manifestação de fenótipos alérgicos e asmáticos (RENZ; HOLT; INOUE; LOGAN *et al.*, 2017). Após o nascimento a microbiota seria imprescindível para conduzir de forma adequada a iniciação e maturação do sistema imunológico (GENSOLLEN; IYER; KASPER; BLUMBERG, 2016; JENMALM, 2017). Além disto, determinadas características da microbiota poderiam contribuir ou oferecer resistência à invasão por espécies patogênicas (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016).

O lúmem intestinal saudável é basicamente composto por uma microbiota diversificada e em estado de equilíbrio com o hospedeiro, uma camada de muco externa, uma camada mucosa interna e o epitélio intestinal (Fig. 1) (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016). A microbiota em homeostase ajuda na digestão dos alimentos; interage com nosso relógio circadiano; participa da ativação de determinados medicamentos e da biotransformação de xenobióticos; pode ainda produzir moléculas que reduzem a inflamação; além de desempenhar um papel fundamental na indução, desenvolvimento, formação e função do sistema imunológico (CLAUS, SANDRINE P.; GUILLOU, HERVÉ; ELLERO-SIMATOS, SANDRINE, 2016).

As principais atividades metabólicas da microbiota estão associadas à digestão de carboidratos e proteínas, como a fermentação de fibras não digeríveis, que leva à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), além do metabolismo anaeróbio de peptídeos e proteínas. Os AGCC, predominantemente o acetato, o propionato e o butirato, principais metabólitos gerados durante o catabolismo de carboidratos não digeríveis, atuam como principal fonte de energia para as células epiteliais do cólon e, além disso, o protegem contra agentes patogênicos, estimulam a resposta imune e ajudam a modular a expressão gênica por meio da inibição da desacetilação das histonas. Além dos AGCC,

alguns aminoácidos essenciais e determinadas vitaminas, como a biotina podem ser fornecidos pelas bactérias intestinais (BÄCKHED; ROSWALL; PENG; FENG *et al.*, 2015).

Figura 1. Representação esquemática de uma microbiota diversificada que confere resistência à colonização por patógenos entéricos no epitélio intestinal.



Fonte: Adaptado de Bäumlér e Sperandio (2016)

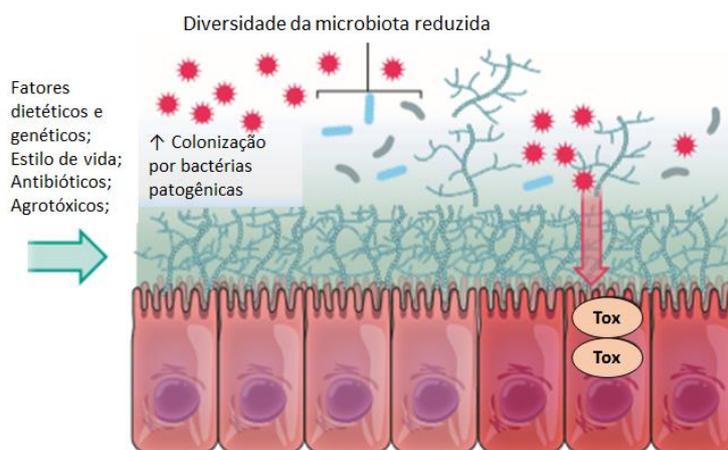
Diversos fatores como a dieta, o estilo de vida, o ciclo de vida (gestação, período perinatal, idade, dentre outros), o uso de antibióticos, doenças que comprometem o sistema imunológico, doenças inflamatórias crônicas (como a doença de Crohn) e a exposição a agentes químicos como os agrotóxicos podem levar a um desequilíbrio da relação microbiota-hospedeiro (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016; JOLY CONDETTE; BACH; MAYEUR; GAY-QUÉHEILLARD *et al.*, 2015; MOOS; FALLER; HARPP; KANARA *et al.*, 2016).

O desequilíbrio da microbiota intestinal (conhecido como disbiose) pode resultar ou ser resultado de uma perda de bactérias comensais benéficas ou de um crescimento excessivo de bactérias residentes que têm o potencial de causar doenças, denominadas ‘patobiontes’ (BYNDLOSS; BÄUMLER, 2018). Ambos os fatores podem levar ao comprometimento da função de barreira dos componentes do lúmen e do fornecimento de nutrientes para o epitélio intestinal (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016; JOLY CONDETTE; BACH; MAYEUR; GAY-QUÉHEILLARD *et al.*, 2015).

A camada de muco que protege o epitélio intestinal pode ser desestabilizada pelo estado de disbiose e como consequência pode haver danos às células do epitélio (Fig. 2), o que conduz à inflamação (colite) e até mesmo morte celular. Algumas bactérias

patogênicas (como por exemplo *C. difficile*, uma bactéria formadora de esporos) estão presentes em pequena quantidade no lúmen intestinal sem causar doenças, mas a diminuição da diversidade microbiana pode favorecer o crescimento das espécies patogênicas e conseqüentemente aumentar a produção de toxinas, que em contato com as células epiteliais levam ao desenvolvimento de colite (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016).

Figura 2. Representação esquemática de disbiose intestinal e invasão do epitélio intestinal.



Tox = toxinas.

Fonte: Adaptado de Bäumlér e Sperandio (2016)

Um crescente corpo de evidências demonstra o desequilíbrio da microbiota intestinal como fator de risco para DCNTs, como diabetes mellitus tipo I (KNIP; SILJANDER, 2016), obesidade (COX; WEST; CRIPPS, 2015) e distúrbios neurológicos como perturbações do espectro do autismo (STRATI; CAVALIERI; ALBANESE; DE FELICE *et al.*, 2017). No entanto, ainda faltam estudos epidemiológicos que avaliem o efeito da exposição a poluentes ambientais sobre a microbiota intestinal no início da vida e a relevâncias destas exposições para o desenvolvimento ou agravamento de doenças no hospedeiro na idade adulta.

A EXPOSIÇÃO HUMANA A POLUENTES AMBIENTAIS

A exposição da população aos poluentes ambientais se dá de diferentes formas: pela alimentação, pela água, ar, solo e pelas condições de trabalho. O modelo desenvolvimentista brasileiro tem levado a um processo de insustentabilidade ambiental, no qual uma ampla variedade de substâncias químicas é lançada ao meio ambiente,

levando a contaminação dos recursos naturais e a potenciais efeitos nocivos à saúde humana (BALSAN, 2006; EHLERS, 1999).

O Brasil tem facilitado o uso de um conjunto de práticas que acarreta a degradação do meio ambiente. Dentre elas podem ser citados o modelo agrícola, com uso intensivo de agrotóxicos, fertilizantes sintéticos e sementes transgênicas; as atividades de mineração de metais de interesse comercial (ferro, ouro, níquel, cobre etc), com ou sem o uso de adjuvantes tóxicos nestas atividades (como por exemplo o uso do mercúrio na extração do ouro); diversas atividades que envolvem a queima de combustível fóssil e de biomassa; e o destino inadequado de resíduos perigosos, como o lixo eletrônico, dentre outros fatores (BALSAN, 2006; PORTO; SOARES, 2012).

Essas práticas têm contribuído para a liberação de substâncias químicas no meio ambiente, constituindo uma das principais formas de contaminação do solo, dos corpos hídricos e do ar (MILHOME; HOLANDA; DE ARAÚJO NETO; DO NASCIMENTO, 2018; SANTOS; CARVALHO; REBOITA, 2016). A contaminação dos recursos naturais leva à contaminação dos alimentos (ANVISA, 2016), do ar inalado, da água (ALMEIDA, 2010) e do leite materno (ISZATT; JANSSEN; LENTERS; DAHL *et al.*, 2019; PALMA, 2011) e tais exposições estão associadas a diversos desfechos em saúde como mencionados anteriormente (MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2006). Além disso, a presença de poluentes químicos no meio ambiente pode levar a degradação da biota e desequilíbrio ecológico (MOREIRA; JACOB; PERES; LIMA *et al.*, 2002). a exposição da população a estas substâncias pela

Uma das principais vias de contaminação humana são os alimentos. De fato, a facilidade de se adquirir e de se manter alguns alimentos envolve processamentos industriais que vão desde o uso de embalagens até a adição de corantes, aromatizantes, realçadores de sabor e vários outros tipos de aditivos (MONTEIRO; CANNON; LEVY; MOUBARAC *et al.*, 2019). As embalagens, normalmente de plástico ou de metal, quase sempre estão em contato direto com o alimento e este contato facilita a migração de constituintes do envoltório protetor para o alimento. Isto pode inclusive ser facilitado quando o produto já embalado requer aquecimento na presença do material envolvente (BEGLEY; WHITE; HONIGFORT; TWAROSKI *et al.*, 2005).

O ultra processamento de alimentos vem sendo relacionado com efeitos adversos à saúde devido a sua composição nutricional desbalanceada e pela contaminação devido ao contato com substâncias químicas tais como o bisfenol-A, os ftalatos e os PFAS (AVERINA; BROX; HUBER; FURBERG, 2018; BUCKLEY; KIM; WONG;

REBHOLZ, 2019; MARTÍNEZ STEELE; KHANDPUR; DA COSTA LOUZADA; MONTEIRO, 2020).

O efeito adverso da exposição a poluentes também pode se dar de maneira indireta. O contato do indivíduo com uma microbiota ambiental em desequilíbrio pode impactar na composição da microbiota humana e sua capacidade imunomoduladora e metabólica, como demonstrado por HANSKI e colaboradores (2012). De acordo com estes autores, indivíduos atópicos que residiam em ambiente com menor biodiversidade no entorno de suas casas, apresentaram diversidade significativamente menor de Gammaproteobacteria na pele (HANSKI; VON HERTZEN; FYHRQUIST; KOSKINEN *et al.*, 2012).

Esse tipo de relação é um dos eixos que sustenta a hipótese higienista, frequentemente descrita em estudos que investigam o papel da microbiota ambiental no desenvolvimento de doenças autoimunes e alérgicas (VON MUTIUS, 2010).

Seja pela transmissão vertical e/ou pela aquisição horizontal, a microbiota ambiental e o ambiente construído podem influenciar a microbiota humana (GILBERT; STEPHENS, 2018; HANSKI; VON HERTZEN; FYHRQUIST; KOSKINEN *et al.*, 2012). Além disso, a presença de um xenobiótico no trato gastrointestinal pode interagir diretamente com as bactérias ali presentes, alterando a estrutura e composição das comunidades microbianas e conseqüentemente sua capacidade metabólica.

POLUENTES AMBIENTAIS E SEUS IMPACTOS SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL

O trato gastrointestinal é um órgão chave envolvido no processamento de xenobióticos e a microbiota tem uma ampla capacidade de metabolizar esses poluentes, sendo a interação microbiota-poluentes importante para a toxicidade e biodisponibilidade do agente químico ao hospedeiro (CLAUS, SANDRINE P.; GUILLOU, HERVÉ; ELLERO-SIMATOS, SANDRINE, 2016).

Diversos modelos animais mostram que alguns poluentes ambientais como o chumbo, arsênio, cádmio; alguns piretróides como a permetrina e alguns organofosforados como o clorpirifós podem causar aumento ou diminuição da abundância relativa de algumas espécies bacterianas intestinais (JIN; WU; ZENG; FU, 2017; JOLY CONDETTE; BACH; MAYEUR; GAY-QUÉHEILLARD *et al.*, 2015; KAN; ZHAO; ZHANG; REN *et al.*, 2015; NASUTI; COMAN; OLEK; FIORINI *et al.*, 2016).

Joly e colaboradores (2015) realizaram um estudo com ratas gestantes expostas oralmente a clorpirifós durante a gestação e nos primeiros 21 dias de vida da prole. A microbiota intestinal da prole apresentou alterações no 21º dia que se sustentaram até os 60º dia de vida. As alterações da microbiota observadas nos três seguimentos intestinais incluem aumento de *Clostridium spp* e *Staphylococcus spp* e diminuição de *Lactobacillus spp* (JOLY CONDETTE; BACH; MAYEUR; GAY-QUÉHEILLARD *et al.*, 2015). *Clostridium* é um gênero potencialmente patogênico, enquanto os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, são frequentemente associados como biomarcadores para a saúde (MILANI; DURANTI; BOTTACINI; CASEY *et al.*, 2017).

Somado a isso, estes autores observaram alterações histológicas no epitélio intestinal dos animais expostos ao pesticida como a diminuição significativa das vilosidades no íleo e a cripta no cólon. A espessura do epitélio também apresentou-se menor no grupo de animais exposto ao agrotóxico (JOLY CONDETTE; BACH; MAYEUR; GAY-QUÉHEILLARD *et al.*, 2015). Tais alterações poderiam contribuir para o comprometimento da função de barreira dos componentes do lúmen, o que pode favorecer a passagem de produtos bacterianos como as endotoxinas lipopolissacárides (LPS) para a corrente sanguínea (MULLIGAN; FRIEDMAN, 2017).

O epitélio neonatal e sua função de barreira ainda não estão completamente entendidos. A permeabilidade aumentada é frequentemente observada e é necessária para a maturação do sistema imunológico do recém-nascido. Por outro lado, a exacerbação deste processo, que pode ocorrer frente as alterações histológicas observadas no estudo de Condette e colaboradores (2015), pode agravar a translocação de LPS do intestino para a corrente sanguínea e este achado vem sendo reportado como possível causa da inflamação observada nas doenças metabólicas (MULLIGAN; FRIEDMAN, 2017).

Em outro estudo realizado com roedores, a exposição ao cádmio, arsênio e níquel em diferentes concentrações levou a modificações significativas da composição microbiana, de uma maneira dose-dependente. O que reforça a relação causal entre a exposição a estes metais e modificações na microbiota. Além disso, foi identificado adaptação da capacidade funcional da microbiota. O aumento da expressão do gene que codifica para a proteína ligante de siderofore (polímeros extracelulares que precipitam metais no meio extracelular e reduzem sua absorção) foi encontrado em resposta a exposição aos metais (RICHARDSON; DANCY; HORTON; LEE *et al.*, 2018). Outras alterações dos produtos do metabolismo microbiano, como diminuição da produção de

propionato e butirato, que são fontes de energia para as células epiteliais, também já foi relacionada à exposição ao cádmio (LI; LIU; SHEN; LIU, 2016).

Até o momento, poucos estudos epidemiológicos investigaram alterações na microbiota intestinal no início da vida decorrentes de exposições a poluentes ambientais. Um breve panorama é apresentado na Tabela 1. Em 2017, Dong e colaboradores associaram a alta exposição ao arsênio na água de beber nos estágios precoces de desenvolvimento ao aumento da abundância de *Proteobacteria* em crianças com 4 a 6 anos de vida (DONG; SHULZHENKO; LEMAITRE; GREER *et al.*, 2017). A presença de arsênio na urina de bebês com 6 semanas de vida também foi associada com diversas alterações na composição microbiana fecal destes bebês, como aumento de *Ruminococcus* (pertencente a ordem Clostridia) e diminuição de diversos outros táxons (HOEN; MADAN; LI; COKER *et al.*, 2018).

Tabela 1. Exposição a poluentes ambientais e alterações da microbiota intestinal de crianças.

Referência	Poluente	Comunidades bacterianas	Capacidade funcional/metabólica da microbiota	Idade das crianças
Bisanz <i>et al.</i> , 2014.	Chumbo no sangue	↑ <i>Succinivibrionaceae</i> e <i>Gammaproteobacteria</i>	-	8 a 9 anos
Dong <i>et al.</i> , 2017	Arsênio na água de beber	↑ <i>Proteobacteria</i>	↑ 258 genes relacionados a resistência antibiótica	4 a 6 anos
Hoen; Madan; Li; Coker <i>et al.</i> , 2018	Arsênio na urina	↑ <i>Ruminococcus</i> e <i>Lachnospiraceae</i> ↓ <i>Clostridiaceae</i> , <i>Bacteroides</i> e <i>Bifidobacterium</i>	-	6 semanas de vida
Iszatt <i>et al.</i> , 2019	Leite materno			1 mês de vida
	PCB-105	↑ <i>Clostridium</i>		
	PCB-118, PCB-194 e PFOA	↓ <i>Lactobacillus</i>		
	DDT	↑ <i>Streptococcaceae</i>		
	PBDE-28	↓ <i>Veilonella</i>		
	PCB-167	-	↑ Motilidade celular ↓ Transporte de carboidratos e metabolismo	

PFOA	↑ <i>Enterococcus</i>	↑ Ácido propiônico e acético
------	-----------------------	------------------------------

Aumento: ↑; Diminuição: ↓.

Tal relação também foi encontrada em um ensaio clínico randomizado realizado na Tanzânia, que aferiu a exposição a metais (mercúrio, chumbo, cádmio e arsênio); investigou uma possível proteção ocasionada pela administração de probióticos (10^{10} UFC de *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 por 25 dias) em crianças em idade escolar (8 anos em média) e em gestantes; e caracterizou o microbioma intestinal das crianças. Foi observado um aumento da classe das *Gammaproteobacteria* (do filo das *Proteobacteria*) bem como da família das *Succinivibrionaceae* (pertencente a mesma classe) em crianças com níveis sanguíneos aumentados de chumbo (BISANZ; ENOS; MWANGA; CHANGALUCHA *et al.*, 2014).

O autor discute que a configuração microbiana com aumento de *Proteobacteria* pode favorecer a degradação de mucina e facilitar a absorção dos metais. O estudo também descreve a diminuição dos níveis sanguíneos dos metais após administração do probiótico (*Lactobacillus rhamnosus*), tanto no grupo de crianças quanto nas gestantes (BISANZ; ENOS; MWANGA; CHANGALUCHA *et al.*, 2014). Tal achado pode ser consequência de uma melhora na permeabilidade intestinal devido ao reestabelecimento do processo de eubiose. Outra possibilidade seria relacionada a capacidade de ligação/sequestro, conferida as bactérias produtoras de ácido láctico, como as pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, reportada em estudos *in vitro* (GIRI; JUN; YUN; KIM *et al.*, 2019).

Na Noruega, diversos poluentes (PCBs, PFAS, DDT, dentre outros) aferidos no leite materno foram associados a alterações da composição e função da microbiota intestinal em crianças com um mês de vida (ISZATT; JANSSEN; LENTERS; DAHL *et al.*, 2019).

Além das evidências em humanos e em modelos animais que demonstram diversas formas de interação entre as bactérias intestinais e xenobióticos (ASSEFA; KÖHLER, 2020; DUAN; YU; TIAN; ZHAI *et al.*, 2020), os estágios iniciais da vida são cruciais para a maturação fisiológica de órgãos e sistemas, bem como o desenvolvimento da microbiota. Já foi reportado que alterações da microbiota neste período podem se sustentar por anos e influenciar mais tarde a saúde (GSCHWENDTNER; KANG; THIERING; KUBLIK *et al.*, 2019). Ainda hoje, o estudo do efeito da exposição a

poluentes ambientais na colonização microbiana intestinal no início da vida é um desafio necessário para o entendimento do aumento das DNCTs.

O ESTUDO DA MICROBIOTA

O conhecimento da diversidade das comunidades microbianas e de seu material genético expandiu com o avanço das técnicas independentes de cultivo, que tornaram possível a detecção de microrganismos não cultiváveis em laboratório ou presentes em baixo número. Estima-se que aproximadamente 1% da verdadeira diversidade microbiana só foi acessada por métodos dependentes de cultivo. Já os métodos independentes de cultivo, apesar de mais caros, tornaram a metodologia muito mais rápida e revelaram a existência de microrganismos desconhecidos anteriormente (FLINT, 2020). Este avanço abriu um novo campo de estudo para diversas áreas, a pesquisa de microbiota, melhorando a compreensão de diversas doenças crônicas (BYNDLOSS; BÄUMLER, 2018).

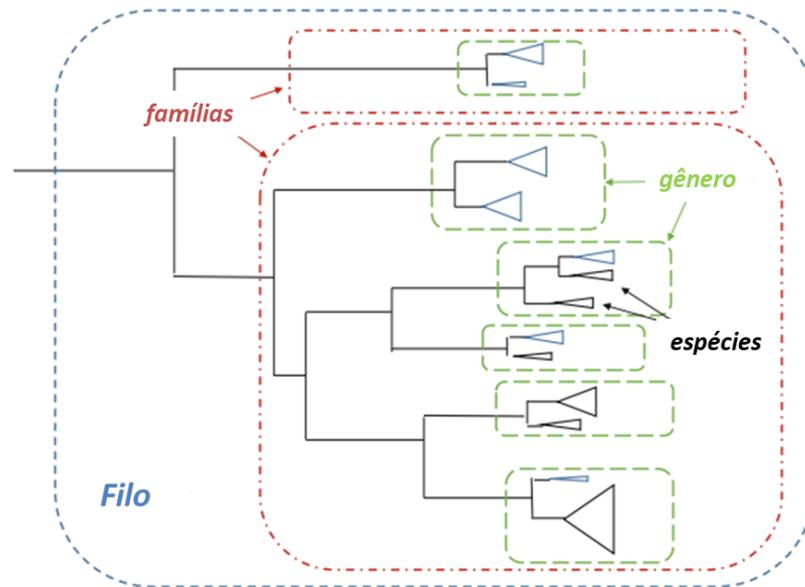
As metodologias moleculares (que se baseiam no sequenciamento do DNA) utilizam frequentemente o gene que codifica para o RNA ribossômico 16S (ou 16S rRNA) como o principal marcador filogenético utilizado para a caracterização da microbiota humana e ambiental (EMP protocols, FLINT, 2020). Sua estrutura contém tanto regiões altamente conservadas quanto regiões variáveis em todas as espécies bacterianas, o que possibilita a identificação de domínios gerais à altamente específicos como, por exemplo, à identificação de diferentes cepas de uma mesma espécie bacteriana.

A avaliação da diversidade bacteriana geralmente combina dois conceitos: riqueza de espécies (número de diferentes espécies/táxons presentes) e equitabilidade (distribuição de abundância relativa dos táxons). A riqueza é inferida atribuindo-se à sequência do gene RNAr 16S o conceito de Unidade Taxonômica Operacional (do inglês, *Operational Taxonomic Unit* – OTU ou filótipo), no qual a percentagem de divergência (ou cut-off) de 1%, 3%, ou 5% entre as sequências dos nucleotídeos pode ser utilizada como critério para definir uma OTU. Há também a possibilidade de incorporar a informação evolutiva na avaliação da diversidade de uma amostra, utilizando a distância na árvore filogenética.

A Fig. 3 ilustra uma árvore filogenética, onde os ramos correspondem a táxons (ou OTUs), que são grupos de organismos que compartilham um mesmo ancestral. De maneira simplória, membros do mesmo 'ramo' compartilham a mesma espécie, enquanto aqueles no mesmo pequeno galho pertencem ao mesmo gênero, aqueles unidos por meio

de galhos maiores à mesma família e assim por diante. Aqueles relacionados em um nível ainda mais profundo de ramificação pertencem aos mesmos filis.

Figura 3. Representação esquemática da árvore filogenética de um filo bacteriano. A linha tracejada azul representa o filo, as vermelhas representam as famílias, as verdes os gêneros e o triângulo negro as espécies.



Fonte: Adaptado de Flint (2020).

As linhas horizontais representam as "distâncias genéticas" entre os pontos de ramificação da árvore. Espécies, gêneros e famílias representam graus crescentes de divergência de sequências de nucleotídeos ou aminoácidos. Triângulos denotam divergência de sequência dentro das espécies (ou seja, no nível de cepa).

Apenas para dimensionar, todos os animais com espinha dorsal, como cobras, dinossauros e o homem, estão incluídos em um único filo, o "Chordata" enquanto todas as bactérias que conhecemos até agora estão agrupadas em cerca de 30 filis formalmente reconhecidos, e mais de 37 outros estão na categoria de candidatos ao reconhecimento (FLINT, 2020). Isso serve para enfatizar a grande diversidade das bactérias.

A microbiota intestinal humana é composta principalmente por 4 filis, Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes (LI; JIA; CAI; ZHONG *et al.*, 2014). Este vasto repertório de microrganismos, de certa forma, converge em sua produção metabólica, esta característica é conhecida como redundância funcional e parece aumentar com a idade, pelo menos durante os primeiros 3 anos de vida, quando a diversidade está sendo adquirida (DOMINGUEZ-BELLO; GODOY-VITORINO; KNIGHT; BLASER, 2019).

Ou seja, além de ser um período importante para o desenvolvimento fisiológico, a microbiota neste período está passando por um processo de montagem de *novo*, de aquisição de diversidade e plasticidade (MILANI; DURANTI; BOTTACINI; CASEY *et al.*, 2017). O estudo de fatores com potencial para alterar este processo é de grande importância para a saúde.

JUSTIFICATIVA

Estudos mostram que a baixa biodiversidade ambiental explicaria, em parte, o rápido aumento das DNCTs (HANSKI; VON HERTZEN; FYHRQUIST; KOSKINEN *et al.*, 2012; VON MUTIUS; VERCELLI, 2010). A contaminação do meio ambiente com uma ampla variedade de substâncias químicas pode impactar os ecossistemas e diminuir a diversidade microbiana ambiental (MILAN; CARRARO; FARISELLI; MARTINO *et al.*, 2018).

O contato das pessoas com o meio ambiente degradado poderia então impactar negativamente no microbioma humano, o qual coordena circuitos imuno-moduladores (HANSKI; VON HERTZEN; FYHRQUIST; KOSKINEN *et al.*, 2012; VON MUTIUS; VERCELLI, 2010). Já é reconhecido que a exposição a compostos tóxicos pode levar a desfechos adversos no nascimento e desenvolvimento de crianças (ASMUS; CAMARA; LANDRIGAN; LUZ, 2016), mas pouco se conhece sobre o efeito na microbiota intestinal. A microbiota no início da vida é crucial para o estabelecimento da microbiota “adulta” e para o desenvolvimento fisiológico do hospedeiro. A microbiota desenvolve-se de forma conjunta com o desenvolvimento do hospedeiro, promovendo a modulação para que seu desenvolvimento ocorra (DOMINGUEZ-BELLO; GODOY-VITORINO; KNIGHT; BLASER, 2019).

Neste contexto, o presente projeto propõe avaliar o efeito da exposição a poluentes ambientais na microbiota intestinal de crianças até o sexto mês de vida. Este projeto busca testar a hipótese de que poluentes ambientais (metais, pesticidas e substâncias perfluoroalquiladas) alteram a microbiota intestinal no início da vida. Os resultados gerados podem fornecer evidências originais e relevantes para endereçar a lacuna na literatura sobre a relação entre a exposição precoce à poluição ambiental, seus efeitos na microbiota intestinal e potenciais efeitos de longo prazo sobre a saúde humana.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é avaliar o efeito da exposição perinatal a poluentes ambientais (arsênio, cádmio, mercúrio, chumbo, substâncias perfluoroalquiladas, piretróides e DDT) na microbiota intestinal no início da vida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Avaliar o efeito da exposição perinatal a poluentes ambientais na transmissão vertical da microbiota (amostras de mecônio) de acordo com o tipo de parto, idade gestacional e uso de antibióticos durante a gestação.*
- *Avaliar o efeito da exposição perinatal a poluentes ambientais no desenvolvimento da microbiota intestinal (amostras de fezes no primeiro, terceiro e sexto mês de vida) de acordo com o tipo de parto, uso de antibióticos e dieta do bebê.*

Manuscrito 1: “Perinatal exposure to environmental pollutants is associated with altered early-life gut microbiome.”

- *Avaliar a relação entre o consumo materno de alimentos ultraprocessados e os níveis de PFASs no sangue de cordão umbilical.*
 - *Descrever o consumo materno de alimentos ultraprocessados.*

Artigo 1: “Food consumption according to the degree of processing, dietary diversity and socio-demographic factors among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil: The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA project).”

- *Avaliar a relação entre o consumo materno de alimentos ultraprocessados e a exposição a substâncias perfluoroalquiladas (PFAS)*

Manuscrito 2: “Maternal consumption of ultra-processed foods and newborn exposure to perfluoroalkyl substances (PFAS): Rio Birth Cohort Study on Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA Project).”

3. METODOLOGIA

Os dados analisados neste projeto são oriundos do Estudo Piloto (PIPA-piloto) preparatório para a realização da coorte de nascimentos denominada “Estudo longitudinal dos efeitos da exposição a poluentes ambientais sobre a saúde infantil - Projeto Infância e Poluentes Ambientais (PIPA)” (ASMUS; BARBOSA; MEYER; DAMASCENO *et al.*, 2020). É um estudo de coorte prospectivo com foco nos efeitos sobre a saúde infantil da exposição a substâncias químicas (especificamente metais, pesticidas e plastificantes), dispersas no ambiente ao qual as crianças estão expostas desde a concepção. Esta coorte é coordenada pela Universidade Federal do Rio de Janeiro em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz, tendo sido aprovado nos Comitês de Ética em Pesquisa da ME/UFRJ (número do Parecer: 2.092.440) e da Fundação Oswaldo Cruz (número do Parecer: 2.121.397).

O PIPA-piloto teve início em setembro de 2017 na ME/UFRJ com término em agosto de 2018. A população de estudo foi constituída por todas as crianças nascidas na ME/UFRJ, entre outubro de 2017 e fevereiro de 2018, com monitoramento clínico e coleta de amostras biológicas nos primeiros seis meses de vida. De outubro a novembro de 2017, as gestantes presentes nas visitas do “Cegonha Carioca” do Município do Rio de Janeiro (MRJ), realizadas na ME/UFRJ, foram convidadas a fazer parte deste Estudo Piloto, com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sendo excluídas as gestantes menores de 16 anos.

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo, cujos dados foram obtidos a partir do estudo PIPA-piloto. No estudo piloto, o período de seguimento dos recém-nascidos foi de seis meses.

Este estudo trata-se de uma coorte única, portanto, o grupo de comparação foi composto de indivíduos da mesma coorte de bebês e/ou pares mãe-bebê. Desta forma, a identificação e classificação do grupo de comparação foram determinadas com base nos resultados das aferições laboratoriais dos poluentes ambientais. A distribuição nos grupos de comparação foi feita com base nas concentrações de poluentes nas amostras biológicas, utilizando-se valores de tercil como pontos de corte, sendo o tercil superior para exposição alta a poluentes e o tercil inferior para exposição baixa a poluentes.

3.2 LOCAL DO ESTUDO

Este estudo foi conduzido na ME/UFRJ, localizada na cidade do Rio de Janeiro. A ME/UFRJ é uma maternidade pública que se situa no bairro de Laranjeiras, na zona sul do Rio de Janeiro-RJ. É uma unidade especializada, que dispõe de assistência ambulatorial e hospitalar, multiprofissional, oferecendo linhas de cuidado específicas na atenção à saúde de gestantes e recém-nascidos de alto risco. Possui ambulatórios especializados na assistência pré-natal (hipertensão arterial, diabetes, gestação gemelar, patologias fetais e adolescentes), programa de rastreio de risco para gestantes no primeiro trimestre, planejamento familiar para mulheres de risco, genética pré-natal e medicina fetal.

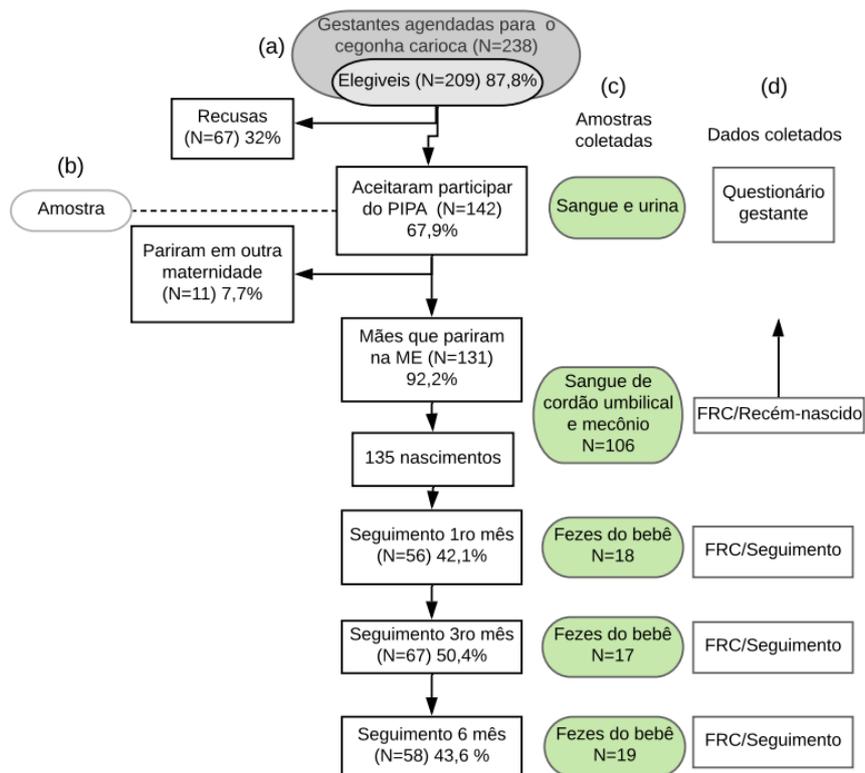
Por ser um centro de referência às gestações de alto risco, cerca de 50% por partos que ocorrem na ME/UFRJ são encaminhamentos de toda a Rede de Atenção à Saúde do município, as demais gestantes são encaminhadas das Unidades de Saúde da Área Programática 2.1 (AP 2.1), sendo elas: Clínica da Família (CF) Pavão-Pavãozinho/Cantagalo; CF Santa Marta; Centro Municipal de Saúde (CMS) Chapéu Mangueira – Babilônia; CMS Dom Helder Câmara; CMS Manoel José Ferreira (inclui CF Catete); e CMS Rocha Maia (Fig. 4).

3.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO

População: Todas as gestantes referenciadas pela área programática 2.1 e da própria ME/UFRJ e agendadas para a visita do Programa Cegonha Carioca nos meses de outubro e novembro de 2017.

Amostra: Um total de 142 mães e 133 bebês participaram do estudo PIPA-piloto. A amostragem foi não aleatória por conveniência. Todas as gestantes com idade superior a 16 anos que participaram das visitas do Programa Cegonha Carioca nos meses de outubro e novembro de 2017, que aceitaram participar do estudo, assinaram o TCLE e realizaram o parto na ME/UFRJ.

Figura. 4. Esquema do estudo. Fluxograma da população do PIPA-piloto e esquema de coleta de amostras. (a) população base; (b) amostra; (c) amostras coletadas e o momento em que ocorreu a coleta; (d) dados coletados, momento que ocorreu e instrumentos utilizados.



Fonte: Criado pela autora (2021).

3.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

1. Mães menores de 16 anos (até 15 anos e 11 meses) serão excluídas;
2. Todos os bebês, sem exclusão devido a intercorrências clínicas de qualquer natureza durante a gestação ou parto; parto normal ou cesáreo; sem limite de idade gestacional; incluindo gestações gemelares, nascidos na ME/UFRJ.

3.5 CRITÉRIOS DE PERDAS

1. Retirada do consentimento em participar do estudo;
2. Nascimentos que ocorreram em outra maternidade;
3. Impossibilidade de coletar amostras de mecônio ou fezes;

3.6 VARIÁVEIS ESTUDADAS

3.6.1 Variáveis de exposição

Descrição da variável	Mensuração
Metais e metalóide (Chumbo, Mercúrio e Cádmio e Arsênio)	- Determinação direta do metal <u>Amostra biológica:</u> sangue materno e sangue de cordão umbilical
Agrotóxicos (Piretróides)	<u>Dosagem dos metabólitos:</u> 3-PBA (ácido 3-fenoxibenzoico) e 4-FPBA (ácido 4-fluor 3-fenoxi benzoico) <u>Amostra biológica:</u> urina da mãe -
Agrotóxicos (metabólitos do DDT)	<u>Dosagem dos metabólitos:</u> 4,4'-DDE, 2,4'-DDT, 4,4'-DDT <u>Amostra biológica:</u> sangue materno e sangue de cordão umbilical
Substâncias perfluoroalquiladas (PFAS)	- Ácido perfluorooctanóico (PFOA) e ácido perfluorooctano sulfônico (PFOS) <u>Amostra biológica:</u> sangue materno e sangue de cordão umbilical

3.6.2 Variáveis de confundimento

Descrição da variável	Mensuração
Tipo de parto	Vaginal ou Cesáreo Instrumento de coleta: Formulário de Relato de Caso/Recém-nascido
Uso antibiótico durante a gestação	Sim/não Instrumento de coleta: Questionário Gestante
Idade gestacional	Nascimento pré-termo = < 37 semanas (sim/não) Instrumento de coleta: Formulário de Relato de Caso/Recém-nascido
Idade do bebê	Em semanas. Instrumento de coleta: Formulário de Relato de Caso/Seguimento
Dieta do bebê	Para o primeiro e terceiro mês de vida: Aleitamento materno exclusivo. Para o sexto mês de vida: Dieta apropriada (sim/não) Instrumento de coleta: Formulário de Relato de Caso/Seguimento
Uso antibiótico pelo bebê	Sim/não Instrumento de coleta: Formulário de Relato de Caso/Seguimento

3.6.3 Variáveis de desfecho

Descrição da variável	Mensuração
Alteração da microbiota do bebê	Sequenciamento da região V4 do gene RNAr 16S <u>Amostra biológica:</u> mecônio (D0) e fezes do bebê (D30, D90, D180)

3.7 QUESTIONÁRIO GESTANTE

Durante o pré-natal, em torno da 30^a e a 34^a semana de gestação, as mães compareceram às visitas do Cegonha Carioca, na ME/UFRJ. Durante as visitas foi apresentado um breve vídeo explicativo sobre o projeto e foi feita uma roda de conversa para maiores esclarecimentos sobre o estudo. Posteriormente, membros da equipe do projeto abordaram cada mãe individualmente para esclarecer dúvidas, propor a participação no projeto e apresentar o TCLE. A todas as mães, maiores de 16 anos, que aceitaram participar do projeto, foi aplicado o questionário *gestante* (ANEXO I), dentro de um tempo médio de 40 minutos.

O questionário *gestante* possui 16 blocos, sendo eles: Identificação e contato; características sócio-demográficas; nascimento da gestante; gestações anteriores; pré-natal da gestação atual; morbidades pré-gestacionais e gestacionais; medicações, suplementos e vitaminas; atividade física; felicidade e depressão; uso de álcool; tabagismo; uso de drogas; saúde bucal; exposição (Moradia; Produtos utilizados no domicílio; Utensílios de cozinha; Dieta (frutas, legumes e verduras); Dieta (carnes); Dieta (frutos do mar, embutidos e ovos); Dieta (*fastfood* e ultraprocessados); Dieta (chá de ervas); Dieta (grãos); Fonte de abastecimento de água para consumo; características do pai biológico (respondido pela gestante); informações da carteira da gestante.

3.8 FORMULÁRIO DE RELATO DE CASO (FRC/RECÉM-NASCIDO)

Na ocasião do parto, um formulário foi preenchido a fim de recolher informações sobre o recém-nascido. Este formulário (ANEXO II) possui informações médicas de intercorrências durante o parto, idade gestacional, uso de medicações; outros achados clínicos; resultado de exames caso necessários (hemograma, bioquímica, punção líquórica, imagem) e também informações sobre a avaliação clínica: dados antropométricos (peso, altura; circunferência cefálica); Apgar; malformações congênitas; distância anogenital; presença de testículo em bolsa escrotal; extensão peniana e informações sobre exame físico.

3.9 FORMULÁRIO DE RELATO DE CASO (FRC/SEGUIMENTO)

Durante as três consultas de seguimento do bebê, que ocorreram no primeiro, terceiro e sexto mês de vida, outro formulário foi preenchido em cada consulta. Este formulário (ANEXO III) possui informações médicas de intercorrências e achados clínicos (gerais e relacionados ao sistema respiratório, cardiometabólico e neurológico) durante o período de seguimento da criança; informações sobre exposição ambiental e sobre a dieta da criança.

3.10 COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

A coleta de amostras biológicas da mãe foi realizada durante as visitas do Cegonha Carioca. Foram coletadas amostras de sangue e urina. O sangue foi coletado em tubo coletor à vácuo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a urina em coletor universal estéril.

A coleta de amostras do bebê foi realizada na ocasião do nascimento e durante as consultas de seguimento (um, três e seis meses de vida). Foram coletadas amostras de sangue de cordão umbilical, mecônio e fezes. As amostras de sangue de cordão umbilical foram coletadas com seringa descartável de 10mL e transferidas para o tubo coletor a vácuo com EDTA. E as amostras de mecônio e fezes serão descritas separadamente no item 3.11.

As amostras de sangue e urina maternos e de sangue de cordão umbilical foram devidamente identificadas e armazenadas em geladeira à 5°C por no máximo dois dias na ME até serem transportadas para o Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) na Fiocruz, onde foram analisadas.

3.11 ANÁLISE DA MICROBIOTA

3.11.1 Coleta e armazenamento das amostras

Um total de 160 amostras foram coletadas, 106 amostras de mecônio e 54 amostras de fezes (D30, N=18; D90, N=17 e D180=19) na ocasião do parto e sempre que possível na ME/UFRJ durante a consulta de seguimento. Quando não foi possível coletar na consulta de seguimento, as mães foram orientadas a coletar as amostras em casa, como descrito a seguir. As amostras foram coletadas logo após a eliminação com auxílio de uma pá estéril e armazenadas em coletor universal estéril a -20°C, até serem transportadas

para o CESTE/Fiocruz onde foram armazenadas a -80°C , até o momento das análises. A coleta foi feita de tal forma que a contaminação por bactérias de outras regiões do corpo ou objetos fosse mínima ou inexistente, além dos cuidados após coleta como descrito por Jordan e colaboradores (JORDAN; BAKER; DUNN; EDWARDS *et al.*, 2017).

As etapas a seguir foram realizadas durante o período de doutorado sanduíche no exterior, no laboratório da Professora Dra. Dominguez-Bello, no departamento de Bioquímica e Microbiologia da Rutgers University, New Jersey, EUA.

3.11.2 Extração e purificação do DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o kit comercial (DNeasy PowerSoil HTP), como sugerido pelo EMP (do inglês, *Earth Microbiome Project*) e as instruções do fabricante foram seguidas.

3.11.3 Amplificação e sequenciamento do RNAr 16S

A partir do DNA total extraído foi realizada a amplificação da região V4 do gene RNAr 16S por meio da PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) com o par de *primers* (515F/806R), informações mais detalhadas podem ser encontradas na sessão “Protocols and Standards” do site (<https://earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/>). Os produtos gerados pelas reações da PCR foram submetidos à eletroforese em géis de agarose, com tampão TAE (Trisacetato 40 mm, EDTA 2mm, pH 8,5), corados com brometo de Etídio ($1\mu\text{g/ml}$), utilizando um marcador como padrão de peso molecular. A visualização dos produtos amplificados foi realizada por exposição à luz UV em um Transiluminador BioAgency (Sistema EasyDoc 100).

Os produtos de PCR que apresentaram fragmentos no tamanho esperado foram então extraídos e purificados por meio do kit comercial (UltraCleanhtp 96-well PCR Cleanup (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. Os amplicons foram então sequenciados em uma plataforma Illumina HiSeq no Departamento de Bioquímica e Microbiologia localizado na Rutgers University (NJ/EUA).

3.11.4 Análise de bioinformática

A construção das bibliotecas do DNA sequenciado foi realizada segundo instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, USA) e seguiram o mesmo fluxo descrito pelo EMP. Realizarmos o alinhamento e identificação das sequências utilizando o software QIIME (versão 2.2) (CAPORASO; KUCZYNSKI; STOMBAUGH;

BITTINGER *et al.*, 2010) e a classificação taxonômica comparando com o banco de dados SILVA (PRUESSE; QUAST; KNITTEL; FUCHS *et al.*, 2007).

A rarefação foi realizada na biblioteca com o intuito de normalizar a contagem das leituras geradas. A rarefação é um método que ajusta as diferenças nos tamanhos das bibliotecas entre as amostras para auxiliar nas comparações de diversidade e reduzir viés. De 106 amostras de mecônio coletadas, um total de 12 amostras de mecônio foi removido por conterem menos que 5000 leituras. Comparações entre amostras com diferentes contagens de leituras pode superestimar a diversidade.

Tanto para descrever a estrutura das comunidades bacterianas (diversidade alpha e beta) quanto para determinar a composição taxonômica das amostras, as sequências com similaridade de 99% foram tratadas como unidade taxonômica operacional (OTU), que estima a diversidade bacteriana em nível de espécie. As análises a seguir foram realizadas no pacote R.

3.11.5 Métricas para avaliar a diversidade da microbiota

Para análise da microbiota, além da identificação dos táxons bacterianos presentes na amostra, a estrutura das comunidades bacterianas foi descrita utilizando as métricas de diversidade descritas a seguir (diversidade alfa e beta). De maneira geral, índices/métricas de diversidade combinam dois componentes de uma comunidade: riqueza de espécies e equitabilidade. Geralmente consistem em uma expressão matemática simples envolvendo o número de diferentes espécies e a abundância relativa de cada espécie na amostra. Há também outro grupo de métricas de diversidade que, além da riqueza e equitabilidade das comunidades microbianas, incorporam a distância filogenética, ou a linhagem evolutiva, entre as espécies (KIM; SHIN; GUEVARRA; LEE *et al.*, 2017).

A diversidade microbiana de uma única amostra (ou de um conjunto de amostras) é conhecida como diversidade α . A diversidade β descreve a diversidade microbiana de uma amostra em relação a outras amostras.

Alpha-diversidade

Dois fatores principais, riqueza e uniformidade, ou equitabilidade, devem ser levados em consideração ao medir a diversidade microbiana de uma amostra. A riqueza refere-se ao número de diferentes espécies presentes em um determinado nicho, mas este parâmetro não leva em consideração o número de *indivíduos* presentes em cada espécie. A uniformidade compara o tamanho da população de cada uma das espécies presentes.

Em geral, quando a riqueza de espécies e a uniformidade aumentam, a diversidade também. Neste trabalho, serão apresentadas as seguintes métricas de diversidade alpha: índice Shannon, diversidade filogenética (Faith_pd) e diversidade de Pielou.

O índice Shannon contempla não somente riqueza e uniformidade, mas a abundância relativa das diferentes espécies encontradas na amostra. Este índice coloca um peso maior na riqueza de espécies do que nos demais parâmetros. Seu valor aumenta conforme o número de espécies aumenta e conforme a distribuição dos indivíduos entre as espécies torna-se uniforme. Tem sido tradicionalmente usado para medir a diversidade de comunidades. A uniformidade de Pielou também será descrita, é um componente do índice de Shannon, e indica como os *indivíduos* estão distribuídos entre as espécies de uma amostra.

Já o índice PD incorpora informação evolutiva das comunidades, incluindo na fórmula o comprimento dos ramos da filogenia das espécies de uma comunidade. Em resumo, PD é uma função do número de espécies (riqueza) e da diferença filogenética entre as espécies em uma comunidade. Tais métricas de diversidade alfa desconsideram comparações da diversidade com outras amostras. Já a beta-diversidade, considera além do número de espécies e respectivas abundâncias dentro da comunidade, a variação na sua composição entre amostras.

Beta-diversidade

Ao contrário da α -diversidade, a medida de β -diversidade faz uma comparação da estrutura da comunidade microbiana entre duas ou mais amostras. Em outras palavras, o dado imputado para a análise de diversidade beta é uma matriz de similaridade ou de distâncias. Para descrever a β -diversidade, foi utilizado a métrica UniFrac que é uma medida de distância filogenética e divide-se em duas categorias: UniFrac não ponderado (unweighted UniFrac), uma medida qualitativa que usa a presença/ausência de dados para comparar a composição da comunidade; e UniFrac ponderado (weighted UniFrac), uma medida quantitativa, que inclui na análise a abundância relativa de cada espécie.

As métrica UniFrac foram empregadas pois além de serem importantes por construir a filogenia bacteriana, o uso de métricas qualitativas e quantitativas no mesmo conjunto de dados é recomendado uma vez que cada uma pode levar a conclusões diferentes sobre os principais fatores que estruturam aquela comunidade microbiana e pode fornecer uma visão sobre a natureza das diferenças da comunidade (LOZUPONE; HAMADY; KELLEY; KNIGHT, 2007).

Por fim, calculamos também a métrica Bray-Curtis, que é uma medida de dissimilaridade entre amostras e que se baseia em abundância relativa.

3.11.6 Análise taxonômica

A primeira etapa neste processo é atribuir taxonomia às sequências, foi realizada no software QIIME. Esta plataforma usa o classificador Greengenes 13_8 99% OTUs. A construção das tabelas que mapeia as sequências de DNA a cada código de OTU foi realizada no pacote R.

3.12 ANÁLISE LABORATORIAL DOS METAIS E METALÓIDE (ARSÊNIO, CÁDMIO, CHUMBO E MERCÚRIO)

A análise dos metais foi realizada no cabelo da mãe e do bebê (D180) no laboratório de metais do INCQS/Fiocruz pelo método de Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS). A análise utilizando ICP-MS possibilita a determinação de vários elementos químicos simultaneamente e em concentrações inferiores a $1\mu\text{g L}^{-1}$, é uma técnica com alta sensibilidade e que proporciona exatidão e precisão (PARSONS; BARBOSA JR., 2007; THOMAS, 2013).

Após o descongelamento, a amostra foi diluída acrescentando água desmineralizada a 0,5 ml da amostra até o volume de 10 ml, em seguida foi adicionado 1,0 ml de ácido nítrico 65% (HNO_3) e a amostra foi submetida a aquecimento a 80°C em banho-maria, por 2 a 3 horas a fim de assegurar a completa digestão da matéria orgânica presente.

Antes das análises foi realizado o teste “Daily” para verificar o funcionamento do equipamento, e então realizou-se a leitura como padrão interno, e a curva de calibração com os pontos de referência $0,05\mu\text{g/l}$ - $0,1\mu\text{g/l}$ - $0,5\mu\text{g/l}$ - $1\mu\text{g/l}$ e $2,5\mu\text{g/l}$. O preparo da curva padrão foi feito de acordo com método certificado pelo INMETRO utilizando solução de As-Cd-Pb 1000 ppm e Hg 10 ppm. Para cada dez amostras foram repetidos um padrão e um branco, cada amostra foi lida três vezes e em duplicata.

3.13 ANÁLISE LABORATORIAL DOS AGROTÓXICOS

3.13.1 Piretróides

Os piretróides possuem uma meia-vida curta e são excretados rapidamente pela urina, na forma de conjugados glucuronídeos ou sulfatos. Portanto, utiliza-se seus metabólitos para indicar a concentração de piretróides em intoxicações agudas e

exposições recentes (ROSA, 2017). Para isso foram utilizados 5mL de urina descongelada à temperatura ambiente. Os metabólitos analisados foram o 3-PBA (ácido 3-fenoxibenzoico) e o 4-FPBA (ácido 4-fluor 3-fenoxi benzoico) por extração em fase sólida e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial com triplo quadrupolo. Foi feita a extração dos metabólitos de interesse presentes nas amostras com o uso de uma coluna de extração em fase sólida C-18, seguido de suas eluição, pré-concentração (secura), ressuspensão no padrão interno e injeção no cromatógrafo (ROSA, 2017).

As concentrações de piretróides determinadas foram corrigidas pelos níveis de creatinina, considerando que há uma variabilidade do volume urinário entre os indivíduos. A creatinina foi medida de forma direta na urina pelo método espectrofotométrico de Jaffé modificado, pela reação com ácido pícrico em meio alcalino, com desproteinização (BABINA et al., 2012; FERLAND et al., 2015; ROSA, 2017). A correção então foi feita através da razão entre a concentração de analito e a concentração de creatinina e multiplicando por 100, com o resultado expresso em nanograma de analito por miligrama de creatinina (ng mL^{-1}) (BABINA et al., 2012; ROSA, 2017).

O limite de detecção para o metabólito 3-PBA foi estimado de $0,06 \text{ ng mL}^{-1}$, o limite de quantificação foi de $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ e a recuperação média foi de 95%. Para o metabólito 4-FPBA o limite de detecção foi de $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$, de quantificação foi $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$ com uma recuperação média de 84% (ROSA, 2017).

3.13.2 Compostos organoclorados

Os organoclorados foram analisados no plasma materno e no sangue de cordão umbilical segundo método descrito por Wolff e colaboradores (1991). Foram analisados os seguintes compostos organoclorados (OC): isômeros de hexaclorocicloexano (HCH), hexaclorobenzeno (HCB), Aldrin, Dieldrin, Endrin, p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE, Mirex, Metoxicloro, Endosulfan, Clordano e Heptacloro e 15 PCBs (bifenilas policloradas). Após a extração, as amostras foram evaporadas e eluídas em coluna de vidro descartável contendo metanol, hexano ou diclorometano (WOLFF; RIVERA; BAKER, 1991) e analisadas por cromatografia gasosa acoplada com detector de captura de elétrons (SARCINELLI; PEREIRA; MESQUITA; OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2003). Os limites de detecção foram de 0,015 a $0,468 \text{ ng/mL}$ para pesticidas OC e 0,2 a $0,36 \text{ ng/mL}$ para PCBs. Os limites de quantificação variaram de 0,045 a $1,419 \text{ ng/mL}$ para pesticidas OC e 0,05 a $1,08 \text{ ng/mL}$ para PCBs.

3.14 ANÁLISE LABORATORIAL DAS PFAS

As substâncias perfluoroalquiladas (PFAS) avaliadas neste estudo foram: PFOA (ácido perfluorooctanóico) e PFOS (perfluorooctanossulfonato). As amostras de soro foram armazenadas a -40°C em frascos de polipropileno. Os PFOA e PFOS foram determinados usando um método adaptado de Kuklenyik et al. (2004). Resumidamente, as amostras foram purificadas de acordo com o procedimento recomendado, os analitos foram eluídos e posteriormente o extrato armazenado e reconstituído destinado para análise por cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem. O espectrômetro de massa triplo quadrupolo com uma fonte de eletrospray API 3200 (Applied Biosystems, Foster City, CA) foi usado para detectar os analitos. Cada analito no cromatograma foi selecionado e integrado manualmente. O tempo de retenção para este gradiente foi observado em 6,9 minutos para PFOA e 7,5 e 7,9 para PFOS (e PFOS ramificado). As amostras abaixo do limite de detecção (LOD) foram excluídas das análises. Os limites de detecção para o PFOS foi de 0,24ng/mL e para o PFOA de 0,07ng/mL.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.15.1 Paras as métricas da microbiota

Realizamos modelos de regressão linear simples e múltipla para estimar os coeficientes da associação entre os poluentes e alterações das métricas da diversidade alfa com variáveis de confundimento. As seguintes variáveis foram incluídas no modelo múltiplo para análise de amostras de mecônio: tipo de parto (vaginal/cesáreo), uso de antibiótico durante a gestação (sim/não) e prematuridade (sim/não); e para análise de amostras de fezes: tipo de parto, aleitamento materno exclusivo (sim/não), idade do bebê (1, 3 e 6 meses) e prematuridade (sim/não). Nenhum bebê foi exposto a antibióticos durante o período de coleta de fezes. Os modelos foram realizados para todo o grupo de bebês e estratificados quando a análise sugeria interação com alguma covariável (FI com $p\text{-valor} < 0,05$).

Realizamos análise PERMANOVA utilizando a função “adonis2” do pacote “vegan” (software R) para estimar o efeito dos poluentes (R^2) nas métricas de diversidade beta. A análise das coordenadas principais (PCoA) também foi realizada para descrever e interpretar tal associação e identificar fatores explicativos das diferenças entre as comunidades microbianas.

Utilizamos o pacote “Maaslin” (HIMEL MALLICK; LAUREN J. MCIVER; ALI RAHNAVARD; SIYUAN MA *et al.*) (software R) para calcular os coeficientes de

associação entre os táxons bacterianos e os poluentes. O mesmo pacote foi utilizado para selecionar os táxons significativamente alterados pela exposição aos poluentes. O nível de significância estatística foi FDR (False Discovery Rate) < 0.25 . Os táxons significativamente alterados foram utilizados para a construção dos *heatmaps* e agrupamento hierárquico (*hierarchical clustering*) dos táxons, utilizando o pacote “ComplexHeatmap” (software R) (GU; EILS; SCHLESNER, 2016). Para melhor visualização das diferenças na contagem de OTUs, os dados foram logaritmizados.

O nível de significância estabelecido será de 5%. Intervalos de confiança de 95% serão calculados sempre que aplicáveis. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R versão 4.0.3.

3.15.2 Descrição das variáveis de exposição aos poluentes

A exposição aos poluentes foi dividida em: exposição materna, que diz respeito aos poluentes aferidos no sangue materno (DDT, PFAS e metais) e na urina materna (piretroides) e; exposição cordão, que se refere aos poluentes aferidos no sangue de cordão umbilical (DDT, PFAS e metais).

Quando o valor aferido foi inferior ao limite de quantificação, então dividimos o limite de detecção pela raiz quadrada de dois e imputamos o valor obtido. Quando o N de imputação era superior a 50%, as variáveis foram categorizadas em expostos sim/não. Apenas os PFAS e os metais foram analisados como variável contínua, DDT e piretróides foram categorizados.

Para efeitos de análise, os metabólitos 3-PBA e 4-FPBA foram somados e tratados como “piretroides”. O mesmo foi feito para a exposição ao DDT: no sangue materno sua concentração foi tomada como a soma dos metabólitos 4,4'-DDD, 4,4'-DDE e 4,4'-DDT, no sangue de cordão umbilical os metabólitos que compuseram a soma foram o 2,4'-DDT, 4,4'-DDE e 4,4'-DDT. O mesmo se deu para a exposição às PFAS que tanto no sangue materno quanto no sangue de cordão tiveram suas concentrações dadas pela soma de PFOA e PFOS.

3.16 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos deste projeto respeitam os preceitos éticos da Declaração de Helsinque e da Resolução 466/2013 do Conselho Nacional de Saúde sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, tendo sido aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da ME/UFRJ (número do Parecer: 3.522.210). Os objetos de estudo são bebês desta forma,

suas progenitoras tiveram acesso ao TCLE depois de elucidados os benefícios e possíveis riscos que poderão ocorrer durante o processo da pesquisa.

A coleta de material biológico dos bebês não será feita de forma invasiva e os resultados obtidos nas análises das amostras terão garantidas sua privacidade e confidencialidade. Os resultados dos exames serão repassados a cada responsável na ME/UFRJ em encontros agendados onde também serão feitas palestras e atividades educacionais para esclarecimentos e orientações. Os pais de crianças que apresentarem alguma alteração nos resultados dos exames serão encaminhados para avaliação e acompanhamento pela estratégia de saúde da família e/ou posto municipal de saúde.

4. EXPOSIÇÃO PERINATAL A POLUENTES AMBIENTAIS E O IMPACTO NA MICROBIOTA INTESTINAL NO INÍCIO DA VIDA.

Este capítulo apresenta o manuscrito “Perinatal exposure to environmental pollutants is associated with altered early-life gut microbiome” de autoria de Nathalia Ferrazzo Napolini, Armando Meyer, Josino Costa Moreira, Haipeng Sun, Carmen I. R. Froes-Asmus e Maria Gloria Dominguez-Bello.

Perinatal exposure to environmental pollutants is associated with altered early-life gut microbiome.

Short title: Environmental pollutants and early-life microbiome

Authors

Nathalia F. Naspolini,¹ Armando Meyer,² Josino C. Moreira,³ Haipeng Sun,⁴ Carmen I. R. Froes-Asmus,⁵ Maria G. Dominguez-Bello^{4*}

Affiliations

¹National School of Public Health Sergio Arouca, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

²Institute of Public Health Studies, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

³Center for the Studies on Workers' Health and Human Ecology, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴Department of Biochemistry and Microbiology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA

⁵School Maternity Hospital, School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Laranjeiras Street, 180, Rio de Janeiro 22240-000, Brazil

***Corresponding author:** Maria Gloria Dominguez-Bello, 61 Dudley Road, New Brunswick, NJ 08901. mg.dominguez-bello@rutgers.edu.

Abstract

Emerging evidence shows that the gut microbiota interacts with environmental pollutants, but the effect of early exposure on the neonatal microbiome remains unknown. We investigated the association between maternal exposure to environmental pollutants and changes in early-life gut microbiome development. We surveyed 16S rRNA gene on meconium and fecal samples (at 1, 3, and 6 months) from the Brazilian birth cohort, and associated with levels of metals, perfluoroalkyl chemicals (PFAS), and pesticides in maternal and umbilical cord blood. The results indicate that the magnitude of the microbiome changes associated with increasing pollutant exposure was bigger in cesarean-section (CS) born and CS-born-preterm babies, in relation to vaginally (VG) delivered infants. Breastfeeding was associated with a stronger pollutant-associated effect on the infant feces, suggesting that the exposure source could be maternal milk. Differences in microbiome effects associated with maternal or cord blood pollutant concentrations suggest that fetal exposure time - intrauterine or perinatal - may matter. Finally, despite the high developmental microbiota variability, specific microbionts were consistently affected across all pollutants, with taxa clusters found in samples from infants exposed to the highest toxicant exposure. The results evidence that perinatal exposure to environmental pollutants is associated with alterations in gut microbiome development which may have health significance.

Teaser

Maternal exposure to metals, perfluoroalkyl chemicals and pesticides is associated with changes in infant meconium and fecal microbiome.

Introduction

Industrialization has led to substantial environmental degradation, and remediation practices are only starting globally, with developing countries - including Brazil - really behind. The global agri-food system entitles widespread use of pesticides, synthetic fertilizers, and transgenic seeds; mining activities such as of nickel, gold, iron, and other metals of commercial interest generate toxicants, as do many activities involving fossil fuel and biomass burning, with inappropriate disposal of hazardous waste (e.g., electronics). All these are contributing to the excessive release of toxic substances into the environment (1-4) leading to a loss of the ecosystem diversity (5). Not only environmental microbial ecosystems but host-associated are affected by environmental toxins. Urbanization is associated with decreased bacterial diversity in the human microbiome (6, 7), which starts assembling during labor and birth. The first bacteria to colonize the gut and the change from a low diverse microbiome at birth to a rapidly maturing ecosystem is crucial to establish an optimal symbiosis with the host and for the immune system maturation (8). Disruption in the early colonization process has been related to clinical conditions such as obesity (9), severe malnutrition (10), atrophy, and asthma (11), inflammatory bowel diseases (12), psychiatric disorders, among others (13, 14).

Exposure to environmental toxins occurs via food (15), air, dust (16), water (17), and human milk (18), and health concerns regarding the adverse effects on the population, particularly on children (19) have increased in recent years. Fetal and early-life stages have long been recognized as critical periods for developmental programming and for influencing health later in life (20), and exposure to toxic agents may affect developmental processes directly or indirectly via the microbiome (21, 22).

The gastrointestinal tract is a key organ involved in xenobiotic processing, and the microbiota has a broad ability to metabolize chemical substances, increasing or decreasing the host toxicity (21). Several animal studies show that non-essential metals such as lead, arsenic, cadmium, and pesticides such as permethrin and chlorpyrifos induce changes in microbiome composition (23-26). We also know from animal studies that the toxicity is related to microbiota-mediated bioactivation of metabolites or changes in the microbiota functional capacity (27). Few epidemiological studies have addressed the relationship between environmental pollutants exposure and the gut microbiome. Persistent organic pollutants exposure detected in breastmilk was associated with reduced gut microbiome diversity and altered microbial function in Norwegian one-month-old neonates (18), and high exposure to arsenic during pregnancy resulted in a higher abundance of Proteobacteria among 4–6-year-old-children in Bangladesh (28). However, prospective studies evaluating multiple pollutants exposure and the impact of environmental pollutants on the baby gut microbiota is poorly investigated. These studies are important since altered microbial exposure in early life could alter development and lead to increased risk of chronic immune-metabolic diseases. The current study in an infant-mother dyad cohort, determined the differences in early life microbiome structure with varying exposure levels to environmental pollutants (metals, PFAS, and pesticides).

Results

Characteristics of the study population

In this study, we characterized the meconium and developmental fecal microbiome of infants at 1, 3, and 6 months, and associated it with environmental pollutants exposure during the perinatal period. Our analyses included 94 mother-child pairs in which both infant gut microbiota and levels of pollutants were characterized at birth. Pregnant women were mostly 25 yo or older (58.5%), with a mean age of 28 years (SD 7) and non-white (75.5%). Close to 40% were educated more than 12 years and more than one-third reported low (36.3%) or middle (38.8%) per-capita family income. Up to 50% of the women were overweight or obese before becoming pregnant and 9.6% used antibiotics during pregnancy (**Table 1**).

Deliveries were dominantly by cesarean-section (CS) 58.5% and included those born preterm (8.5%). Most neonates were male (56.4%) and had adequate birth weight (81.9%) weighing 3,252.8g (SD 561.8) on average. In the first follow-up visit infants ($n = 18$) were at a mean age of 41.3 days (SD 8; 6 weeks), were mostly breastfed (61.1%) but still below the WHO recommendation (29). In the second follow-up, infants ($n = 17$) were 3 months old (mean age of 99.4 days [SD 11.3]; 14 weeks) and mostly non-breastfed (58.8%). In the third follow-up ($n = 19$) babies were >6 months (194.9 days [25.8]; 28 weeks) and 52.6% had inappropriate feeding practice (by maternal report), classified according to WHO recommendation for non-breastfed children and complementary feeding of the breastfed infants (30, 31) (**Table 1**).

Pollutant exposure

Table 2 shows the pollutants exposure characteristics assessed in this study population. Overall, metals were detected in 100% of samples, PFAS in 92.5% of maternal blood and 70.4% in cord blood, and pyrethroids (PYR) were detected in 33.3% of the urine samples. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) was detected in 25% of cord blood and 27.9% of maternal blood samples. There were significant correlations between sources of pollutants. All metals in cord blood had a strong to high correlation with metals in maternal blood (ρ 0.59 to 0.68, $p=0.000$) and maternal PFAS had a weak correlation with cord PFAS (ρ 0.35, $p=0.000$).

Supplemental Tables 1 and 2 show pollutants' correlation within and between classes. In cord blood, the highest inter-class correlation was found between Hg and Cd (ρ 0.395, $p=0.000$) followed by Hg and Pb (ρ 0.302, $p=0.000$). All cross-class correlations were weak (ρ between Hg and PFAS: -0.207, $p=0.057$) or non-significant. In maternal blood, Pb had a moderate correlation with Cd (ρ 0.503, $p=0.000$) and Pb (ρ 0.560, $p=0.000$). All cross-class pollutants correlations were weak (ρ between arsenic and PYR: 0.315, $p= 0.002$) or non-significant.

Microbiome and associations with pollutants

At birth, infants had a mean Shannon diversity index of 2.73 (SD 1.33) and later developmental feces had a mean Shannon diversity of 2.55 (SD 0.82) (Table S3). The infants' meconium microbiome was dominated by *Escherichia-Shigella* and *Bacteroides* while later feces had a decrease of this member of *Gammaproteobacteria* with replacement by Bifidobacterium and Enterobacteriaceae. *Bifidobacterium*, *E. coli*, and *Lactobacillus* were found in Brazilian infants during the first year of life (32) and, at 3 and 6 months the dominance of *Escherichia* was also found in Brazilian infants (33).

Pollutants were associated with changes in meconium and fecal microbiome structure and composition.

Pollutants affected the infant microbiome differently, with some pollutants having bigger impacts. The rank of pollutants by effect would be arsenic>cadmium>mercury>lead. PFAS and pesticides had less effect than the metals did.

Arsenic (As)

The effect of cord blood arsenic on the gut microbiome was associated with birth stressors such as birth mode and preterm delivery. Arsenic in maternal blood recapitulates the results (alpha and beta diversity) of arsenic in cord blood so it will be presented as supplemental material (Fig. S1.). Increasing levels of arsenic was associated with less meconium alpha diversity (β -0.012, $p=0.082$) in CS-born babies and an aggravated effect in CS-preterm birth (β -0.034, $p=0.024$). The arsenic effect in developmental feces was in the opposite direction. Increasing arsenic was associated with more alpha diversity in later feces, observed only in EBF babies (β 0.024, $p=0.015$) aggravated effect was found in CS-born infants (β 0.033, $p=0.017$). Increasing arsenic level in cord was associated with increased Shannon diversity (β 0.171, $p=0.06$) in vaginal-born babies observed only in meconium and not later in developmental feces, data in Fig. S1. Vaginal born or vaginal-breastfed infants did not show differences in fecal alpha diversity.

As another means of identifying changes in the microbiota induced by pollutant exposure, we performed a principal coordinate analysis (PCoA) of all and stratified samples using the UniFrac and Bray-Curtis distance metrics. Regardless of the source, increasing arsenic levels increased meconium microbiome distances among CS-preterm babies only, as shown by the PCoA plot (calculated based on weighted UniFrac) in Figure 1B. The arsenic effect size was around 30% for both exposure sources (R^2 29.9%; $p=0.067$ and 30.3%; $p=0.053$ umbilical cord and maternal arsenic respectively). Increasing arsenic also moved the distances of developmental feces in CS born (R^2 78.5%; $p=0.062$) or CS-EBF infants (R^2 99.7%, $p=0.047$), illustrated in Figure 1E.

A very consistent taxa cluster was found in meconium from newborns exposed to high cord arsenic (Figure 1C). The taxa cluster consisting of *Blautia*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Bifidobacterium*, and *Fusobacterium* was found regardless of baby groups. Also, the low arsenic exposure group had a more similar taxa composition regardless of baby groups. Increasing levels of arsenic was associated with higher *Veillonella* in meconium (coef 0.212, q -value= 0.018) with sustained increase in later feces (coef 0.371, q -value= 0.244). Regardless of the source, higher arsenic exposure was associated with lower meconium *Faecalibacterium* (cord As: -1.42e-17, q -value= 0 and maternal As: -7.54e-04, q -value= 0) and two *Clostridium spp* were increased in later feces, among other taxa. Besides, fecal *Hungatella* was depleted (coef -0.109, q -value= 0.244) in the high cord arsenic group independent of birth groups and breastfeeding (Figure 1 C and F).

Cadmium (Cd)

Cadmium was the most unique metal in terms of its effect on the microbiome. Regardless of being in lower levels in cord blood compared to maternal blood, Cd exerted a stronger effect on the meconium microbiome and affected developmental feces in VG-born infants. Increasing cadmium in cord blood was associated with

less (β -0.256, p = 0.052) meconium phylogenetic diversity in all babies (non-stratified analysis) (Figure 2A). Consistent with the PCoA plot analysis, which increasing concentrations of cord Cd slightly moved (R^2 2.39%; p = 0.037) all babies meconium microbiome in the PcoA space (based on unweighted-UniFrac), illustrated in Figure 2B.

Stronger effects of Cd exposure were observed later in developmental feces than in meconium and the effect was associated with delivery mode. Regardless of the source, increasing Cd was associated with more phylogenetic diversity in CS-preterm babies (cord Cd: β 2.167, p = 0.058; maternal Cd: β 2.580, p = 0.043) and cord Cd increased fecal diversity in EBF-VG born (β 1.776, p = 0.032), as shown in Figure 2D.

Despite the source, increasing Cd significantly increased fecal microbiome distances (cord Cd: R^2 31.4%, p = 0.003; maternal Cd: R^2 17.5%, p = 0.014) in VG born babies, as shown by the PCoA plot (calculated based on weighted UniFrac distance) in Figure 2E, this finding was only found in Cd exposure analysis.

Regardless of the source, increasing Cd was associated with higher meconium *Intestinibacter*, *Geoalkalibacter*, and *Faecalibacterium*. A taxa cluster composed of *Parabacteroides.distasonis* and 3 members of *Bacteroides* genus was found in the meconium of newborns in the high maternal Cd exposure group, regardless of baby groups (Fig. S2.C).

Also, *Ruminiclostridium*, *Clostridium.butyricum*, *Flavonifractor*, *Erysipelatoclostridium*, and two *Veillonella.seminalis* strains were consistently increased in the developmental feces of infants within the high Cd exposure group. Increasing cord levels of Cd was associated with sustained higher abundance of *Ruminococcaceae* family (coef 0.096, q -value= 0.015) in meconium and later feces (coef 0.118, q -value= 0.119) (Figure 2C and F). While increasing maternal Cd was associated with slightly more *Faecalibacterium* (coef 0.001, q -value= 0) in meconium, and this same taxon was greatly increased in later feces (coef 0.3289, q -value= 0.080) (Fig. S2. C and F). *Faecalibacterium* also belongs to the *Ruminococcaceae* family, a member of *Clostridia* class.

Mercury (Hg)

Although Hg in cord blood did not affect meconium alpha diversity, increasing maternal Hg was associated with more Shannon diversity in VG born (β 0.167, p = 0.066) and a higher increase was observed in newborns indirectly exposed to antibiotics during pregnancy (β 0.629, p = 0.029). Like arsenic exposure, Hg was associated with less meconium diversity in CS-preterm babies (β -0.652, p = 0.035) (Fig. S3. A) sustained later in developmental feces of CS born (β -0.160, p = 0.0681), shown in Fig. S3. D. Unlike in meconium, increasing Hg in cord was associated with more phylogenetic diversity in developmental feces of CS-preterm (β 0.473, p = 0.036) consistent with changes in beta diversity (cord hg: R^2 30.59%, p = 0.022), as shown in the PCoA plot (calculated based on unweighted UniFrac distance) in Figure 3D and E.

Despite the source, increasing Hg moved the meconium microbiome of VG-born babies (cord hg: R^2 8.48%, p = 0.019 and maternal hg: R^2 9.93%, p = 0.007), as shown by the PCoA plot (calculated based on weighted UniFrac distance) in Figure 3B.

Regardless of source, increasing levels of Hg was associated with several increased taxa in meconium (Figure 3C), as members from the genus *Alistipes* (cord coef.: 0.2248, q -value= 0.115 and maternal coef.: 0.2078, q -value = 0.223) and

Faecalibacterium (cord coef.: 0,005, q-value= 0 and maternal coef.: -0,001, q-value =0). Also, increased *Intestinibacter* (coef_{cord.}: 0.814, q-value= 0.080 and coef_{maternal.}: 0.287, q-value= 0.022) and lower *Megasphaera* (coef_{cord.}: -0,013, q-value= 0 and coef_{maternal.}: -0,006, q-value= 0) was found in developmental feces of infants with increasing levels of cord and maternal Hg, illustrated in Figure 3F.

Lead (Pb)

Unlike arsenic and Cd, increasing Pb in cord blood was associated with more meconium phylogenetic diversity in all newborns (β 0.248, $p= 0.032$) except VG and CS-preterm babies, Figure 4A. Like Hg, the stronger Pb effect was observed among babies indirectly exposed to antibiotic exposure during pregnancy (β 0.932, $p= 0.028$), maternal Pb recapped this finding (β 1.337, $p= 0.009$) (Fig. S4. A). No effect was observed on developmental feces but increasing maternal Pb was associated with less fecal Shannon diversity in EBF-CS infants (β -0.302, $p= 0.004$) (Fig. S4. D).

Alpha-diversity findings were consistent with the PcoA plots, it shows that increasing Pb in cord slightly moved (R^2 4.21%, $p= 0.023$) the meconium microbiome of CS-born babies in the PcoA space (based on unweighted-UniFrac), illustrated in Figure 4B. As did Arsenic, increased maternal Pb significantly affected fecal beta-diversity of CS-EBF infants (R^2 17.28%, $p= 0.008$), as shown in the PCoA plot (calculated based on unweighted UniFrac distance) in Fig. S4. E.

Infants in the highest cord Pb exposure group had meconium community composition greatly impacted (Figure 4C). Three different taxa clusters were found in the meconium from infants within medium and high exposure levels. The first taxa cluster, composed of members of the *Muribaculaceae* family, *Barnesiella* and *Bacteroidales* was found regardless of birth groups. Additionally, we detected increased *Muribaculaceae* (coef 0.376, q-value=0.010 and 0.201, q-value=0.189) and *Streptococcus* (coef 0.505, q-value =0.105 and 0.567, q-value =0.013) in newborns` meconium regardless of Pb source. Increasing maternal Pb was associated with lower meconium *Faecalibacterium* (coef -0,005, q-value= 0) and this same taxon was increased later in feces (coef 0.337, q-value= 0.241), illustrated in Fig. S4. C and F.

Perfluoroalkyl chemicals (PFASs)

PFAS exposure mostly affected CS-preterm infants as As and Hg did. Increasing PFAS levels in cord blood was associated with less alpha diversity (Pielou evenness) in CS-preterm newborns (β -0.087, $p= 0.020$) and increased diversity in CS-full-term newborns (β -0.037, $p= 0.090$) trended toward significance, shown in Figure 5A. As arsenic and Pb findings, increasing PFAS was associated with more fecal diversity in EBF (β 0.116, $p= 0.009$) and CS-EBF infants (β 0.120, $p= 0.028$). It seems the global effect is due to CS birth as increasing PFAS did not affect VG-EBF infants – or VG delivery is protective. Maternal PFAS recapped the effect of cord PFAS within CS-preterm newborns with borderline significance (β -0.042, $p= 0.097$) and later, this same baby group had increased fecal diversity (β 0.196, $p=0.054$) Fig. S5. A and D.

Differences in meconium beta diversity of all newborns were associated with increasing PFAS in cord blood (R^2 2.14%, $p= 0.064$) with greater dissimilarity among VG born (R^2 5.99%, $p= 0.059$), illustrated in the PCoA plot (calculated based on Bray-Curtis distance), Figure 5B. PFAS cord effect on later fecal microbiome was found among EBF infants (R^2 10.3%, $p= 0.023$), as shown in the PCoA plot

(based on weighted UniFrac) in Figure 5E, and it was consistent with alpha diversity findings. Hg exposure also affected the meconium of VG-born and feces of EBF infants.

Interestingly, maternal PFAS seems to impact beta diversity of different baby groups than cord PFAS did. PFAS in maternal blood exerted a strong effect on beta diversity of CS-preterm newborns (R^2 24.45%, $p=0.055$), based on unweighted UniFrac (Fig. S5. B). While later, maternal PFAS slightly moved all infants' fecal microbiome in the PcoA space (R^2 3.71%, $p=0.002$), calculated based on unweighted UniFrac (Fig. S5. E). The effects' differences between PFAS sources could be due to higher mean levels found in maternal blood 3.66 (SD 3.33) compared to cord blood 1.36 (SD 1.14) (Table 2).

Next, we tested whether increasing levels of PFASs affected the taxa composition of meconium and developmental feces (Figure 5 C and F). Newborns in the high cord PFASs exposure group had many increased taxa in meconium and lacked *Bacteroides* (β coef.: -0.158, q-value = 0.238) (Figure 5C). Besides, increasing levels of cord PFAS was associated with more than 136 altered taxa in meconium of newborns indirectly exposed to antibiotics during gestation (those were not included in the heatmap). Later in developmental feces, very few taxa were affected by PFAS exposure, but slightly more *Megasphaera* (coef_{cord.}: 0.001, q-value=0 and coef_{maternal.}: 0.004, q-value= 0) was found in feces, no matter PFAS source. High maternal PFAS was associated with the depletion of up to 15 meconium taxa and fecal taxa were found to be increased in the high maternal PFAS exposure group. We also found a sustained increase of *Gemella* in meconium (β coef.: 0.120, q-value = 0.212) and in developmental feces (β coef.: 0.473, q-value = 0.080) (Fig. S5. C and F).

Pyrethroids insecticides (PYR)

Further, we investigated if the presence of pyrethroids metabolites in maternal urine was associated with alterations in infant meconium and fecal microbiome (Figure 6). We found remarkably similar effects to what was found in As, Hg, PFAS, and DDT exposures, although all cross-class pollutants correlations were weak or non-significant (Table S2). Maternal exposure to pyrethroids was associated with more meconium alpha diversity in vaginal births (β 0.114, $p=0.079$) and in newborns indirectly exposed to antibiotics during gestation (β 0.330, $p=0.096$). In contrast, CS-preterm newborns had less alpha diversity (β -0.2484, $p=0.080$) associated with pyrethroid exposure (Figure 6A). Maternal pyrethroid exposure is associated with increased fecal phylogenetic diversity in EBF babies only (β 1.196, $p=0.028$), consistent with beta diversity changes.

Maternal pyrethroid exposure is also associated with changes in meconium beta diversity of VG delivered newborns (R^2 6.32%, $p=0.028$), as shown in the PCoA plot based on weighted-UniFrac (Figure 6B). Pyrethroid exposure was associated with higher fecal microbiome distances in EBF infants (R^2 8.32%, $p=0.047$) compared to the PYR effect in non-EBF (R^2 2.51%, $p=0.674$), as shown by the PCoA plot based on unweighted-UniFrac (Figure 6E).

Meconium taxa composition of PYR exposed newborns did not differ from the non-exposed newborns, only *Faecalibacterium* was slightly decreased in meconium samples from infants within the exposure group (coef.: -0.005, q-value = 0).

However, we detected an altered abundance of taxa later in developmental feces associated with maternal PYR exposure as several *Clostridium* spp. and *Veillonella* spp.

DDT

DDT exposure, both in cord and maternal blood, had only modest effects on meconium and fecal microbiome. Like arsenic, Hg, and PFAS, cord DDT was associated with increased meconium weighted-unifrac distance in CS-preterm newborns (R^2 30.44%, $p=0.046$) while a non-significant effect was found among full-term babies (R^2 1.03%, $p=0.492$), as shown in the PCoA plot (Figure 7B). Regardless of source, DDT exposure was associated with higher *Lachnospiraceae* (coef._{cord}: 0.318, q-value= 0.204 and coef._{maternal}: 0.325, q-value= 0.142) and *Faecalibacterium* (coef._{cord}: -0.008, q-value= 0 and coef._{maternal}: 0.005, q-value= 0) in meconium (Figure 7C and Fig. S7. C) and less *Megasphaera* (coef._{cord}: -0.017, q-value= 0 and coef._{maternal}: -0.012, q-value= 0) in fecal samples (Figure 7F and SFigure 7F). In addition, maternal DDT exposure was associated with differential abundance of up to 45 meconium taxa (not included in the heatmap).

Summary of results

The higher exposure risk in this population was to metals, which were detected in 100% of the mother and newborn samples, followed by PFAS exposure, found in 92.5% of maternal blood and 70.4% of cord blood. While pesticides were detected in around 30% of this population. As and Pb were above the levels reported in other national and international studies (34). Unsurprisingly, metals exerted significant changes in infants' microbiome while pesticides have only modest effects.

Figure 8 visualizes patterns of taxa composition and pollutants exposure. Hierarchical clustering revealed the appearance of three taxa clusters in meconium. The first composed of *Veillonella*, *Muribaculaceae*, *Streptococcus*, and *Haemophilus* was found under the highest Pb and arsenic exposures. The second taxa cluster, composed of *Agathobacter*, *E. Shigella*, *Lachnospiraceae*, *Alistipes*, and *Barnesiella* was associated with increasing levels of Hg and Pb in cord blood. The third taxa cluster composed of *Lactobacillus*, *Erysipelatoclostridium*, *Intestinibacter*, and *Bacteroides thetaiotaomicron* was observed in feces from infants with maternal exposure to PYR and Hg. Notably, members of *Faecalibacterium* responded to all maternal pollutants' exposure and *Megasphaera* in feces was affected across all cord pollutants except Cd. This could suggest similarities in the interaction between pollutants and these bacteria.

Discussion

Emerging evidence suggests that gut microbiota is a key player to assess the toxicity of environmental contaminants, although still not fully understood (35). In this study, we conducted 16S rRNA gene sequencing on meconium and developmental fecal samples from the PIPA birth cohort and identified that the impact of exposure to environmental pollutants is compounded with the effect of early-life stressors on the infant and the extent of changes in microbiome tended to be specific within a particular baby group.

Pollutant exposure associations with altered meconium and fecal microbiome in babies with early-life stressors.

Our results show that pollutants had a stronger effect on the meconium and developmental fecal microbiome structure of infants delivered by C-section,

including CS-preterm babies, as well as in infants that were indirectly exposed to antibiotics during pregnancy. CS-born infants showed significant changes in their meconium microbiome associated with high exposures of As, Pb, and PYR. Notably, As and Pb lead to sustained changes observed in later feces within this same baby group. Even stronger effects were found in CS-preterm newborns associated with As, but also to Hg, PFAS, and DDT exposures, with long-lasting Hg effect found later in developmental feces. Antibiotic exposure during pregnancy was also associated with higher meconium alpha diversity in newborns exposed to Hg, Pb and PYR, but the differences were not found in later feces.

It is recognized that CS- and preterm-born babies have lower microbiome diversity (36) and in both cases, antibiotic administration either intrapartum or during preterm newborn hospitalization are common practices (37). Our results show that exposure to pollutants can exacerbate a prior disrupted microbiome and it may increase the individual susceptibility to the toxicity of the pollutants (27).

The direct interaction between metals and gut bacteria has been explored in antibiotic-treated and germ-free (GF) mice. These animal models excreted significantly less arsenic, Cd, Pb, and Hg, and host bioaccumulation and toxicity were confirmed by organ evaluation (38, 39). Remarkably, Coryell and coworkers (2018) found that human gut microbiome transplant protects GF As3mt-KO mice (dysfunctional in arsenic methylation) and the protection was related to *Faecalibacterium prausnitzii*. Our results found decreased *Faecalibacterium* in meconium of newborns in response to high cord arsenic and DDT exposure.

The microbiome can mitigate the xenobiotic toxicity by acting as a physical barrier, by binding to the pollutant and decreasing its uptake and, by transforming into less toxic compounds, among other mechanisms (40). In this study, we observed lower impact in microbiome of the VG-delivered infants. Overall, they were less affected among the studied baby groups. Hg, PFAS, and PYR exposures were associated with changes in meconium beta-diversity in VG-born babies. While the observed effects ranged from 9 to 6% in VG-born and the effects were not observed later in infant feces. A greater effect on meconium was found in CS-preterm (R^2 ranged from 24 to 30%) under PFAS exposure. Suggesting higher resilience of the VG-delivered newborns' gut microbiome that could be attributed to the microbiome structure and integrity of the gut epithelium barrier. Intestinal barrier maturity could be another source of variability to explain the differences found within baby groups. Increased immaturity and intestinal permeability are demonstrated in preterm infants (41, 42).

Our findings add to growing evidence that components of the gut microbiome can mitigate or exacerbate the toxicity of metals' exposure (27). Some microorganisms can methylate Hg and increase its bioavailability, bacteria methylation capability is often demonstrated within the *Deltaproteobacteria* class (43). We did not find any taxa within this class to be affected by increasing levels of Hg. However, high cord Arsenic and Cd were related to increased levels of beneficial bacteria such as *Bifidobacterium* and *Faecalibacterium* and it could represent a mechanism of protection exerted by the gut, a process termed as "gut remediation" (44). Bizans and coworkers (2014) reported reduced blood levels of Hg and arsenic in pregnant women after treatment with *Lactobacillus rhamnosus*. Members of *Lactobacillus* are known to sequester, bind or store metals resulting in lower metal absorption by the host and increased excretion via feces (44). Moreover, specific adaptations of rat's microbiota as overrepresentation of genes encoding the siderophore-binding protein

were observed under metals exposure and the bacterial composition producing this response was different for each metal.

This dynamic response and changes of the microbiota in response to pollutant exposure inform our findings on the association between perinatal pollutant exposure compounded with the effect of early-life stressors on the infant microbiome perturbation and highlight the importance of the microbiota in protection against pollutant toxicity.

Pollutant source and intensity of the effect on the meconium microbiome

Unlike arsenic results, in which maternal findings recapped cord results, we found variability across sources of pollutants (Cd, Hg, PFAS, and DDT) and it makes conclusions difficult.

Despite Cd being lower in concentration in cord blood compared to maternal blood, it had a stronger effect on the meconium microbiome. We know from animal models that the dose, duration of exposure, and developmental status of the animals lead to distinct changes in microbiota composition (27). We observed decreased meconium alpha diversity related to Cd exposure and changes in developmental feces were to the opposite direction. Mice exposed to environmentally relevant (low) doses of Cd did not show alpha diversity changes, unlike our findings whereas we did find a decrease in meconium phylogenetic diversity. The authors described many affected bacteria within the *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae*, and *Lachnospiraceae* families, the last is known as a marker of health (45). Here, infants within the high cord Cd exposure group had several differential abundances of OTUs consistent with those (23). Additionally, we observed a sustained increase of the *Ruminococcaceae* family in meconium sustained in later infant feces and, unlike arsenic, a minor increase in *Faecalibacterium* was observed in infants meconium within high Cd exposure. Disparate changes in rat bacterial communities were previously attributed to differences in dosing, for example, low metal exposure was associated with more alpha diversity while mid and high level with more alpha diversity (24).

We found that PFAS in maternal blood was associated with changes in meconium beta-diversity in CS-preterm newborns, while PFAS in cord blood affected microbiome distances of VG-born babies. This is most likely given that PFAS levels in maternal blood were higher than in cord blood also, birth groups had different exposure levels, CS-born babies had significantly higher mean levels of cord PFAS compared to VG-born infants. Iszatt and coworkers (2019) found that PFOS in maternal milk was associated with changes in fecal beta-diversity (estimated by unweighted UniFrac) of 1-month-old infants (18). They also reported more *Enterococcus* and less *Lactobacillus* in infants in the high PFOA exposure group accompanied by more propionic acid in the stool. In our study we found several increased taxa in meconium associated with high PFAS in cord blood and *Megasphaera* genus was consistently affected in feces, regardless of PFAS source.

Different from arsenic, DDT exposure is associated with modest changes in the microbiome. Iszatt and coworkers (2019) also found few effects on the 1-month-old fecal microbiome associated with DDT in breast milk; they reported an increase of the genus *Streptococcus*. Anyway, our finding should be interpreted cautiously as the exposure to the organochlorine metabolites was found to be low ($n = 23$; 25%) in our population. So the modest impact could be due to low detection rate, not low

toxicity. Also, comparisons with the effect of arsenic exposure should be made cautiously. The effect of arsenic on gut microbiota was previously observed in infants (28, 46) and several animal models (23, 24, 38). This is unsurprising given that arsenic was used as an antimicrobial agent before the discovery of penicillin. However, little is known about the effect of many other xenobiotics on the gut microbiome. We found that exposure to DDT was mostly related to changes in community composition as altered *Lachnospiraceae* and *Faecalibacterium* in meconium and less *Megasphaera* in feces, no matter DDT source. *Megasphaera* abundance is inversely associated with infant diarrheal cryptosporidiosis (47).

Breastfeeding is associated with a stronger pollutant effect on feces.

While the effect of the pollutants on the microbiome was mostly related to birth mode and birth stressors. The effect of arsenic, Hg, Pb, PFAS, and PYR exposure on developmental feces microbiome was associated with exclusive breastfeeding. The effect of environmental pollutants on the gut microbiome of exclusively breastfed infants was previously demonstrated (18). Although they haven't determined metals and pyrethroids insecticides in breast milk either we did in this study, Cd assessment in breast milk was reported in Brazil (48) and other metals (Cd, Pb, and arsenic) in other countries (49). This could allow us to consider that the pollutant effect associated with breastfeeding is related to maternal milk contamination. Or, in the case of arsenic, Pb, and PFAS exposure, the effect in global breastfed infants (not stratified by birth mode) could be due to CS birth because there was no effect in breastfed-VG delivered infants.

Some pollutants clustered and correlated with taxa clusters found in meconium and developmental feces.

Hierarchical clustering of the taxa significantly altered by more than one pollutant revealed some signature. Metals in cord blood were associated with two taxa clusters in meconium: one composed of *Veillonella*, *Muribaculaceae*, *Streptococcus*, and *Haemophilus* was found under the highest Pb and arsenic exposures.

The second taxa cluster, composed of *Agathobacter*, *E. Shigella*, *Lachnospiraceae*, *Alistipes*, and *Barnesiella* was associated with increasing levels of Hg and Pb in cord blood. Increased amounts of Bacteroidetes (e.g. *Alistipes* and *Barnesiella*) were demonstrated after metal exposure, members within this phylum can exert direct effects on metals as methylation, reduction, and oxidation (44). Pb is reported to directly interact with gut bacteria in several different ways resulting in lower bioavailability for the enterocyte uptake and increased excretion in feces. While arsenic, in general, undergoes a chemical transformation as thiolation, demethylation, and methylation resulting in more or less toxic forms. *Bacteroides* (e.g. *Muribaculaceae*), *Clostridium*, *Alistipes*, and *Bilophila* are known to be arsenic methylators (44).

Another taxa cluster composed of *Lactobacillus*, *Erysipelatoclostridium*, *Intestinibacter*, and *Bacteroides thetaiotaomicron* was found in feces from infants with maternal exposure to PYR and Hg. *Erysipelatoclostridium* is part of normal gut microbiota but could become an opportunistic pathogen (50). Also, increased *Lactobacillus* associated with high metal exposure could indicate detoxification and gut remediation, numerous *Lactobacillus* strains have been shown to alleviate metal toxicity through binding capacity in vitro and mouse models (44, 51).

We found three different genera classified within the phylum Firmicutes affected by most of the pollutants investigated. Members of *Faecalibacterium* responded to all maternal pollutants and *Megasphaera* in feces was affected across all cord pollutants except Cd. *Veillonella* was also significantly increased in meconium under arsenic, Cd, Pb, and PFAS exposures and remained increased in later feces with increasing levels of all metals assessed. This could indicate similarities in the interaction between pollutants and these bacteria.

Potential limitations of our study should be considered. The low number of fecal sampling during the follow-ups did not allow stratification by timepoint. Even though some strata such as exclusive breastfeeding, delivery mode within the breastfeeding strata, and CS-born-preterm, exerted a great magnitude of association with the pollutant effect. Although the study was limited in size regarding the follow-up, the findings highlight the importance of more studies to improve our understanding of pollutant exposure effects in microbiota development. In general, studies restrict the study population to VG delivered and exclusively breastfed infants, but other baby groups should be considered when evaluating the effect of pollutant exposure as we observed that the effect may be compounded if the baby is CS-born or CS-born-preterm. Even controlling for several potential confounders, residual confounding due to unmeasured variables (e.g. maternal fecal diversity) could explain part of the associations that we have described. Nevertheless, this study deserves appreciation for evaluating a vast array of environmental pollutants and their effect on the developmental microbiome and for considering different baby groups in this association. Moreover, even analyzing a developmental microbiota, recognized for its high variability and, for still being reflective of the birth mode, we could identify some microbiome signatures.

In conclusion, our study shows that maternal exposure to pollutants – at the late gestational period and during birth - associates with alterations in the infant's microbiome development. Also, early life stressors were found to aggravate the pollutant effect on microbiome. Microbiome alterations found in fecal samples from breastfed infants suggest exposure via breastmilk. Future studies should use metabolomics to identify microbiota functional alterations and to address the mechanisms underlying pollutants toxicity.

Methods

Study population

We used longitudinal data from the pilot study of the PIPA Project (The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development) conducted in a public School Maternity located in Rio de Janeiro, Brazil, between October 2017 and August 2018 (52). Briefly, a cohort of pregnant women ($n = 142$) during the third trimester of pregnancy was enrolled in a birth cohort study to investigate the effects of environmental pollutants on maternal-child health. The study population was all consented pregnant women who delivered their offspring at the School Maternity ($n = 131$).

Sample collection

At enrolment, pregnant women were at the 28th and 32nd weeks of gestation and had blood, urine, and questionnaire-derived information collected. The enrollment questionnaire and birth form were designed to collect data on the prevalence and pattern of environmental pollutant exposure, sociodemographic and clinical information. It was applied by trained interviewers and encompassed questions on

demographic characteristics (per-capita family income, ethnicity, age, and educational attainment), diet, smoking and alcohol habits, drug consumption, and physical activity.

At the time of delivery, umbilical cord blood and meconium samples were collected, and a birth form with clinical information concerning the newborn was filled up by copying birth health records from the hospital charts.

Fecal samples were collected during the follow-up visits which consisted of a clinical evaluation by the study team comprising pediatricians, physiotherapists, nutritionists, and nurses. This sampling and monitoring were performed at the 1st, 3rd, and 6th months of age, and growth, respiratory and neurological systems were evaluated.

Exposure assessment to environmental pollutants

A total of 49 environmental chemicals were quantified in maternal third-trimester blood and urine, and umbilical cord blood samples. Twenty-four organochlorine pesticides; 17 polychlorinated biphenyls (PCBs); the metalloid arsenic and three metals, cadmium (Cd), lead (Pb), and mercury (Hg); two metabolites of pyrethroid insecticides (3-PBA [3-phenoxybenzoic acid] and 4-FPBA [4-fluor 3-phenoxy benzoic acid]) and; two perfluoroalkyl chemicals (PFAS: perfluorooctanoic acid [PFOA] and perfluorooctanesulfonic acid [PFOS]). However, only metals, pyrethroids, DDT metabolites, and PFAS were detected in over 25% of this population and were included in the analysis. For analysis purposes, PFAS will be presented as the sum concentration of PFOA and PFOS, pyrethroids as the sum concentration of 3-PBA and 4-FPBA, DDT in umbilical cord blood as the sum concentration of 2,4'-DDT, 4,4'-DDE and 4,4'-DDT and, DDT in maternal blood as the sum concentration of 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, and 4,4'-DDT.

The metals analysis was carried out at the National Institute of Quality Control in Health Laboratory (INCQS) using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) technique. PFAS, pyrethroid metabolites, organochlorine pesticides, and PCBs were performed at the Fiocruz Toxicology Laboratory using liquid chromatographic analysis coupled to a sequential mass spectrometer with a triple quadrupole detector (LC/MS). All pollutants were assessed in maternal and cord blood samples except the pyrethroid metabolites which were determined in maternal urine. The metal's limits of detection (LOD) were: Pb 0.015 µg/dL, Hg 0.007 µg/L, Cd 0.002 µg/L, As 0.003 µg/L; DDT's metabolites LOD ranged from 0.02 to 0.07 ng/mL and; PFAS LOD were: PFOA: 0.07 ng/mL and PFOS: 0.24 ng/mL and; pyrethroid's metabolites LOD were 3BPA: 0.06 ng mL⁻¹ and 4FPBA: 0.05 ng mL⁻¹. For values below the LODs, we imputed the square rooted divided per LOD. When imputation was greater than 50%, the variables were categorized as exposed/non-exposed. The metals and PFAS were analyzed as continuous variables, DDT and pyrethroids were categorized.

Microbiome analysis and statistics

Neonate fecal DNA extraction and library preparation were performed according to the Earth Microbiome Project (EMP) standard protocols described on the website (<http://press.igsb.anl.gov/earthmicrobiome/protocols-and-standards/>). Briefly, DNA from the meconium and fecal samples were extracted using the DNeasy PowerSoil HTP Kit according to the manufacturer's instructions. The V4 region of the 16S rRNA gene of the DNA extracted was amplified with a set of primers and molecular markers. PCR products with expected fragment size were cleaned using the

UltraClean-htp 96-well PCR Cleanup kit (QIAGEN), and the 16S amplicons were sequenced on an Illumina HiSeq platform at the Dept. of Biochemistry and Microbiology located at Rutgers University (NJ/USA).

A total of 4,941,932 sequences were obtained from 160 samples, with a minimum of 485 sequences per sample, a maximum of 164,832 frequencies per sample, a median of 30,732 frequencies per sample, and an average of 30,887 frequencies per sample. For comparisons across samples with different sequencing depths, analysis of meconium and fecal communities was rarefied to 5,000 reads per sample leading to 12 meconium samples being removed due to naturally low total bacterial load present in this sample type, resulting in 94 meconium samples included in the analysis.

Sequences were demultiplexed and denoised and the operational taxonomic units (OTUs) were assigned using SILVA database. Alpha diversity for each sample and distances between samples (beta diversity) were calculated using QIIME pipeline (53). Alpha diversity or within-sample diversity was measured using Pielou evenness, Faith's phylogenetic distance (PD), and Shannon index.

The unweighted/weighted UniFrac distances and the Bray-Curtis similarity data were calculated to obtain the pairwise beta diversity. UniFrac incorporates phylogenetic information when determining the distance between OTUs, weighted UniFrac also takes relative abundance into account while Bray-Curtis is aware of relative abundance but not phylogeny.

Covariates

The adjusted model of meconium included these three variables: delivery mode (Caesarean-section/Vaginal), preterm delivery (< 37 weeks gestation) (Yes/No), antibiotic use during gestation (Yes/No). The adjusted model of developmental feces included delivery mode, preterm delivery, exclusive breastfeeding (Yes/No), and infant age (week06, week14, week28). None of the infants received antibiotics during the stool collection period.

Statistical analysis

To evaluate correlation within and between classes of pollutants Spearman's rank correlation coefficients were assessed.

To determine significant differences between alpha diversity metrics and pollutants exposure multiple linear regression models were carried out. We tested for significant differences in beta diversity metrics with Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) using the R package *vegan* (54) to test the significance with 999 permutations and visualized with principal coordinates analysis (PCoA). This analysis also reports R^2 (effect size) and p-values, in which R^2 values of different factors affecting distances are directly comparable.

The Maaslin2 R package (Microbiome Multivariable Association with Linear Models) (55) was performed to detect overrepresented/depleted bacterial taxa in pollutant exposure comparisons with correction for false discoveries (q-value ≤ 0.25 ; q-value are FDR-adjusted p-values as computed by MaAsLin). The significantly altered taxa were then used for the construction of the heatmaps and hierarchical clustering, using the package "ComplexHeatmap" (56) (R software). For better visualization of the relative differences, the OUT counts were log-transformed. All alpha and beta diversity models were carried out combined (all newborns/infants) and stratified analyses were conducted to evaluate the potential

modifying effect of the covariates. Interaction factors were included in the models indicating stratification when $p < 0.05$.

Construction of baby groups: For meconium analysis, newborns were separated into seven groups: vaginal born (VG), cesarean-section born (CS), CS and preterm born (CS-preterm), CS and full-term born (CS-full term), full-term, indirectly exposed to antibiotic during pregnancy (AT yes) and non-exposed (AT no). For developmental feces analysis, infants were separated in nine groups: vaginal born (VG), cesarean-section born (CS), CS and preterm born (CS-preterm), exclusively breastfed (EBF), EBF and VG born (EBF-VG), EBF and CS born (EBF-CS), overall non-breastfed (non-EBF), non-EBF and VG born (non-EBF-VG), non-EBF and CS born (non-EBF-CS).

References

1. Balsan R. Impactos decorrentes da modernização da agricultura brasileira. *Revista de geografia agrária*; 2006. p. 123-51.
2. Muniz DHdF, Oliveira-Filho EC. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente *Universitas: Ciências da Saúde*; 2006. p. 83-100.
3. Porto MF, Soares WL. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. São Paulo: *Rev. bras. Saúde ocup.*; 2012. p. 17-50.
4. Milhome MAL, Holanda JWB, de Araújo Neto JR, do Nascimento RF. Diagnóstico da Contaminação do Solo por Metais Tóxicos Provenientes de Resíduos Sólidos Urbanos e a Influência da Matéria Orgânica. *Rev. Virtual Quim*; 2018. p. 59-72.
5. Moreira JC, Jacob SC, Peres F, Lima JS, Meyer A, Oliveira-Silva JJ, et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ São Paulo: *Ciênc. saúde coletiva*; 2002. p. 299-311.
6. Smits SA, Leach J, Sonnenburg ED, Gonzalez CG, Lichtman JS, Reid G, et al. Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science*. 2017;357(6353):802-6.
7. McCall LI, Callewaert C, Zhu Q, Song SJ, Bouslimani A, Minich JJ, et al. Home chemical and microbial transitions across urbanization. *Nat Microbiol*. 2020;5(1):108-15.
8. Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, Belzer C, Knol J. The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014;25(5):428-38.
9. Mbakwa CA, Scheres L, Penders J, Mommers M, Thijs C, Arts IC. Early Life Antibiotic Exposure and Weight Development in Children. *J Pediatr*. 2016;176:105-13.e2.
10. Subramanian S, Huq S, Yatsunenkov T, Haque R, Mahfuz M, Alam MA, et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature*. 2014;510(7505):417-21.
11. Fujimura KE, Sitarik AR, Havstad S, Lin DL, Levan S, Fadrosh D, et al. Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nat Med*. 2016;22(10):1187-91.
12. Putignani L, Del Chierico F, Vernocchi P, Cicala M, Cucchiara S, Dallapiccola B, et al. Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood-Adulthood Transition. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(2):487-504.
13. Pärty A, Kalliomäki M, Wacklin P, Salminen S, Isolauri E. A possible link between early probiotic intervention and the risk of neuropsychiatric disorders later in childhood: a randomized trial. *Pediatr Res*. 2015;77(6):823-8.
14. Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J, et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*. 2017;5(1):24.
15. ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) - Relatório de atividades de 2013 e 2015. Brasília: Depósito Legal na Biblioteca Nacional: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2016.
16. Santos TC, Carvalho VSB, Reboita MS. Avaliação da influência das condições meteorológicas em dias com altas concentrações de material

particulado na Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Eng. Sanit. Ambient.; 2016.

17. Almeida GL, Schmitt GC, Bairros AV, Emanuelli T, Garcia SC. Os riscos e danos nas intoxicações por paraquat em animais domésticos. *Ciência Rural*. 2007;37(5):1506-12.
18. Iszatt N, Janssen S, Lenters V, Dahl C, Stigum H, Knight R, et al. Environmental toxicants in breast milk of Norwegian mothers and gut bacteria composition and metabolites in their infants at 1 month. *Microbiome*. 2019;7(1):34.
19. Asmus C, Camara V, Landrigan P, Luz C. A Systematic Review of Children's Environmental Health in Brazil. *Ann. Glob. Health*; 2016. p. 132–48.
20. Fleming TP, Watkins AJ, Velazquez MA, Mathers JC, Prentice AM, Stephenson J, et al. Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. *Lancet*. 2018;391(10132):1842-52.
21. Claus SP, Guillou H, Ellero-Simatos S. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016;2:16003.
22. Condetto CJ, Bach V, Mayeur C, Gay-Quéheillard J, Khorsi-Cauet H. Chlorpyrifos Exposure During Perinatal Period Affects Intestinal Microbiota Associated with Delay of Maturation of Digestive Tract in Rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015;61(1):30-40.
23. Breton J, Massart S, Vandamme P, De Brandt E, Pot B, Foligné B. Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2013;14:62.
24. Richardson JB, Dancy BCR, Horton CL, Lee YS, Madejczyk MS, Xu ZZ, et al. Exposure to toxic metals triggers unique responses from the rat gut microbiota. *Sci Rep*. 2018;8(1):6578.
25. Nasuti C, Coman MM, Olek RA, Fiorini D, Verdenelli MC, Cecchini C, et al. Changes on fecal microbiota in rats exposed to permethrin during postnatal development. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016;23(11):10930-7.
26. Kan H, Zhao F, Zhang XX, Ren H, Gao S. Correlations of Gut Microbial Community Shift with Hepatic Damage and Growth Inhibition of *Carassius auratus* Induced by Pentachlorophenol Exposure. *Environ Sci Technol*. 2015;49(19):11894-902.
27. Assefa S, Köhler G. Intestinal Microbiome and Metal Toxicity. *Curr Opin Toxicol*. 2020;19:21-7.
28. Dong X, Shulzhenko N, Lemaitre J, Greer RL, Peremyslova K, Quamruzzaman Q, et al. Arsenic exposure and intestinal microbiota in children from Sirajdikhan, Bangladesh. *PLoS One*. 2017;12(12):e0188487.
29. WHO. The optimal duration of exclusive breastfeeding: report of the expert consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001. p. 6.
30. WHO. Guiding principles for feeding non-breastfed children 6-24 months of age. Geneva, Switzerland World Health Organization; 2005. p. 42.
31. PAHO. Guiding principles for complementary feeding of the breastfed child. Washington, DC Pan American Health Organization; 2003. p. 40.
32. Talarico ST, Santos FE, Brandt KG, Martinez MB, Taddei CR. Anaerobic bacteria in the intestinal microbiota of Brazilian children. *Clinics (Sao Paulo)*. 2017;72(3):154-60.

33. Taddei CR, Oliveira FF, Duarte RT, Talarico ST, Takagi EH, Ramos Carvalho II, et al. High abundance of *Escherichia* during the establishment of fecal microbiota in Brazilian children. *Microb Ecol.* 2014;67(3):624-34.
34. Fróes-Asmus CIR, Meyer A, da Cunha AJLA, Damasceno N, Gomes LE, Luiz RR, et al. Multiple Environmental Exposure in Pregnant Women and Their Children in the City of Rio de Janeiro, Brazil, Rio Birth Cohort Study: PIPA Project. *Exposure and Health.* 2021.
35. Milan M, Carraro L, Fariselli P, Martino ME, Cavaliere D, Vitali F, et al. Microbiota and environmental stress: how pollution affects microbial communities in Manila clams. *Aquat Toxicol.* 2018;194:195-207.
36. Azad MB, Konya T, Persaud RR, Guttman DS, Chari RS, Field CJ, et al. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG.* 2016;123(6):983-93.
37. Gasparrini AJ, Wang B, Sun X, Kennedy EA, Hernandez-Leyva A, Ndao IM, et al. Persistent metagenomic signatures of early-life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome. *Nat Microbiol.* 2019;4(12):2285-97.
38. Coryell M, McAlpine M, Pinkham NV, McDermott TR, Walk ST. The gut microbiome is required for full protection against acute arsenic toxicity in mouse models. *Nat Commun.* 2018;9(1):5424.
39. Breton J, Le Clère K, Daniel C, Sauty M, Nakab L, Chassat T, et al. Chronic ingestion of cadmium and lead alters the bioavailability of essential and heavy metals, gene expression pathways and genotoxicity in mouse intestine. *Arch Toxicol.* 2013;87(10):1787-95.
40. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(6):371-84.
41. Selma-Royo M, Calatayud Arroyo M, García-Mantrana I, Parra-Llorca A, Escuriet R, Martínez-Costa C, et al. Perinatal environment shapes microbiota colonization and infant growth: impact on host response and intestinal function. *Microbiome.* 2020;8(1):167.
42. Ma B, McComb E, Gajer P, Yang H, Humphrys M, Okogbule-Wonodi AC, et al. Microbial Biomarkers of Intestinal Barrier Maturation in Preterm Infants. *Front Microbiol.* 2018;9:2755.
43. Gilmour CC, Podar M, Bullock AL, Graham AM, Brown SD, Somenahally AC, et al. Mercury methylation by novel microorganisms from new environments. *Environ Sci Technol.* 2013;47(20):11810-20.
44. Duan H, Yu L, Tian F, Zhai Q, Fan L, Chen W. Gut microbiota: A target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy. *Sci Total Environ.* 2020;742:140429.
45. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;81(4).
46. Hoen AG, Madan JC, Li Z, Coker M, Lundgren SN, Morrison HG, et al. Sex-specific associations of infants' gut microbiome with arsenic exposure in a US population. *Sci Rep.* 2018;8(1):12627.

47. Carey MA, Medlock GL, Alam M, Kabir M, Uddin MJ, Nayak U, et al. Megasphaera in the stool microbiota is negatively associated with diarrheal cryptosporidiosis. *Clin Infect Dis*. 2021.
48. Gonçalves RM, Gonçalves JR, Fornés NS. [Cadmium in human milk: concentration and relation with the lifestyle of women in the puerperium period]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2010;32(7):340-5.
49. Bassil M, Daou F, Hassan H, Yamani O, Kharma JA, Attieh Z, et al. Lead, cadmium and arsenic in human milk and their socio-demographic and lifestyle determinants in Lebanon. *Chemosphere*. 2018;191:911-21.
50. Mancabelli L, Milani C, Lugli GA, Turrone F, Cocconi D, van Sinderen D, et al. Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. *FEMS Microbiol Ecol*. 2017;93(12).
51. Giri SS, Jun JW, Yun S, Kim HJ, Kim SG, Kang JW, et al. Characterisation of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Gut of *Cyprinus carpio* That May Be Effective Against Lead Toxicity. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019;11(1):65-73.
52. Asmus CIRF, Barbosa AP, Meyer A, Damasceno N, Rosa ACS, Medronho R, et al. Rio Birth Cohort Study on Environmental Exposure and Childhood Development - PIPA Project. *Ann Glob Health*. 2020;86(1):59.
53. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7(5):335-6.
54. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, et al. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6. ed. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan2019>.
55. Mallick H, Rahnvard A, McIver L. Maaslin2: Maaslin2. R package version 1.4.0 ed. <http://huttenhower.sph.harvard.edu/maaslin2.2020>.
56. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016;32(18):2847-9.

Acknowledgments

The authors are grateful to the pregnant women who participated in this study, to the School Maternity of the Federal University of Rio de Janeiro for their technical and logistical assistance, and the Oswaldo Cruz Foundation and Federal University of Rio de Janeiro for their research support.

Funding:

National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS, P30-ES005022)
 Pan American Health Organization (PAHO, TC 69 - SCON2018-00192)
 NFN received a doctoral scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, CGC 00.889.834/0001-08)
 NFN received a research scholarship abroad (CAPES, 88887.363948/2019-00)

Author contributions:

Conceptualization: NFN, AM, MGDB, JCM
 Methodology: NFN, AM, HS, MGDB
 Project coordination and funding acquisition: CIFA
 Supervision: AM, JCM, MGDB

Writing—original draft: NFN

Writing—review & editing: NFN, AM, MGDB

Competing interests: The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Data availability: If requested, NFN will fully cooperate in obtaining and providing full access to all 16S rRNA sequence data.

Tables and Figures

Table 1. Information of the infant-mother dyad cohort. PIPA Project, 2017–2018, Rio de Janeiro/Brazil.

Maternal characteristics	N (%)	Birth and infants' characteristics	N (%)
Age (years)		Delivery mode	
≤ 24	39 (41.5)	Vaginal	39 (41.5)
25 – 31	24 (25.5)	C-section	55 (58.5)
≥ 32	31 (33.0)	Gestational age	
Ethnicity		Full-term	86 (91.5)
Non-white	71 (75.5)	Pre-term	8 (8.5)
White	21 (22.3)	Sex	
Educational level (years)		Female	40 (42.6)
≤ 12	36 (39.1)	Male	53 (56.4)
> 12	56 (60.9)	Birth weight	
Family income¹		Low birth weight	8 (8.5)
≤ R\$1.700,00	29 (36.3)	Adequate birth weight	77 (81.9)
R\$1.701,00 – 3.000,00	31 (38.8)	High birth weight	9 (9.6)
> R\$3.000,00	20 (25)	Feeding practice	
Pre-pregnancy BMI		<i>Firth follow-up</i>	
< 18,5	2 (2.4)	Exclusive breastfed	11 (61.1)
18,5-24,9	40 (47.1)	Non-Exclusive breastfed	7 (38.8)
25-25,9	30 (35.3)	<i>Second follow-up</i>	
≥ 30	13 (15.3)	Exclusive breastfed	7 (41.2)
Antibiotic use during pregnancy		Non-exclusive breastfed	10 (58.8)
No	85 (90.4)	<i>Third follow-up²</i>	
Yes	9 (9.6)	Appropriate	9 (47.4)
		Inappropriate	10 (52.6)

¹ 1 US dollar corresponds to nearly 1.39 Brazilian currency.

² Feeding practice in the third follow-up was classified according to WHO recommendation for infants at ≥6 months of age.

Table 2. Levels of environmental pollutants assessed in maternal blood, urine, and umbilical cord blood. PIPA Project, 2017–2018, Rio de Janeiro/Brazil.

Pollutants	Sample	N	N > LOD	Mean (SD)	Min	P25	P50	P75	Max	Rho	p-value
Metals											
Arsenic	Maternal blood	93	93	11.40 (4.83)	0.33	8.85	11.21	13.19	36.49	0.673	0.000
	Cord blood	90	90	10.87 (3.16)	4.9	8.44	10.92	12.90	19.95		
Cadmium	Maternal blood	93	93	1.39 (3.15)	0.01	0.19	0.45	0.94	22.44	0.588	0.000
	Cord blood	90	90	1.12 (2.45)	0.01	0.21	0.43	0.91	16.9		
Lead	Maternal blood	93	93	4.51 (2.55)	1.11	2.55	4.12	5.79	14.65	0.641	0.000
	Cord blood	90	90	4.44 (2.78)	1.43	2.90	3.76	4.90	16.03		
Mercury	Maternal blood	93	93	2.74 (2.77)	0.33	0.67	1.25	4.49	13.33	0.677	0.000
	Cord blood	90	90	1.54 (1.31)	0.35	0.70	0.99	2.16	6.39		
PFAS											
	Maternal blood	93	86	3.66 (3.33)	0.22	1.07	2.40	6.18	13.35	0.348	0.000
	Cord blood	88	62	1.36 (1.14)	0.22	0.22	1.14	1.96	5.45		
DDT											
				Exposed		Non-exposed		-	-	-	-
	Maternal blood	93	26	26 (27.7%)		67 (71.3)		-	-		
						-		-	-		
	Cord blood	92	23	23 (25%)		69 (75%)		-	-		
∑Pyrethroids											
	Maternal urine	93	31	31 (33.3)		62 (66.7)		-	-	-	-

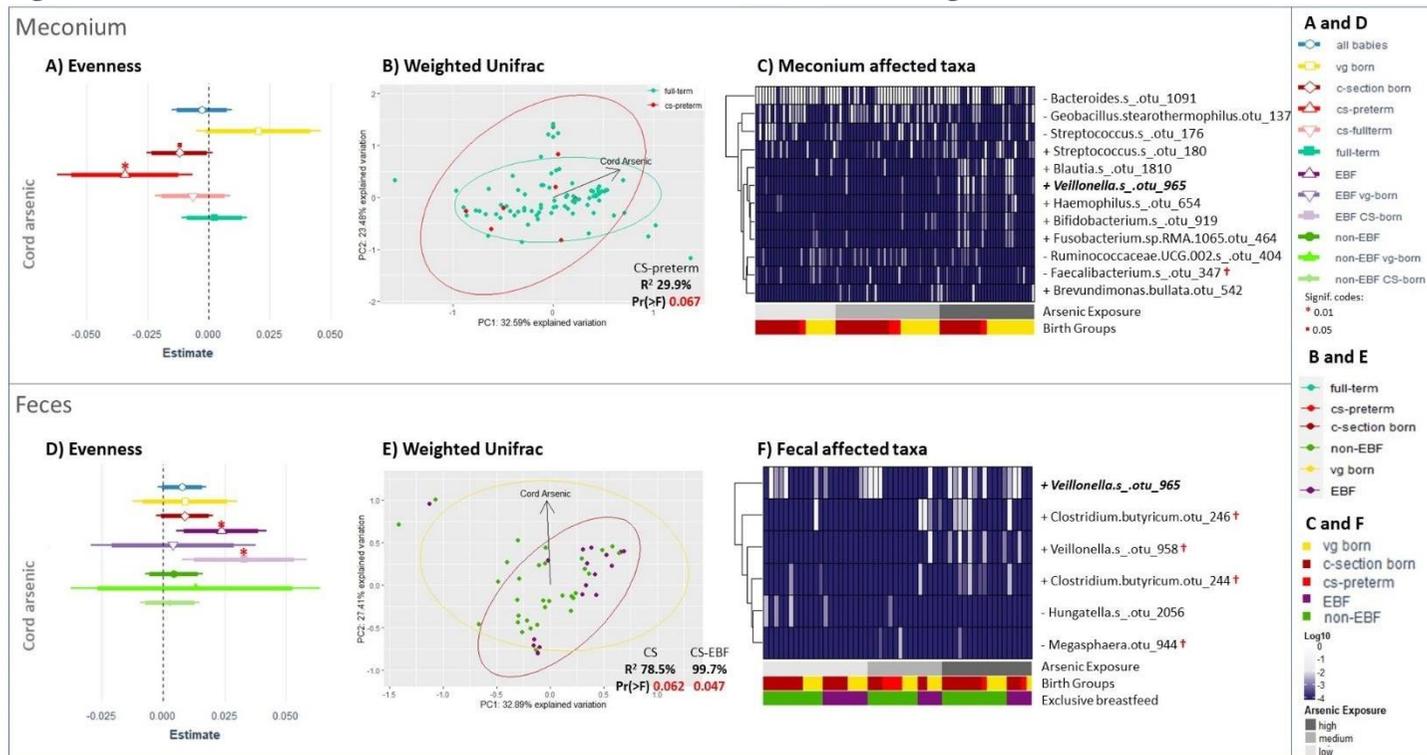
Metals units are µg/L except for lead, which is µg/dL; pyrethroids: ng mL⁻¹; DDT and PFAS: ng/mL

Metals limits of detection: Pb 0.015 µg/dL; Hg 0.007 µg/L; Cd 0.002 µg/L; As 0.003 µg/L

DDT's metabolites limits of detection: 0.02 to 0.07 ng/mL

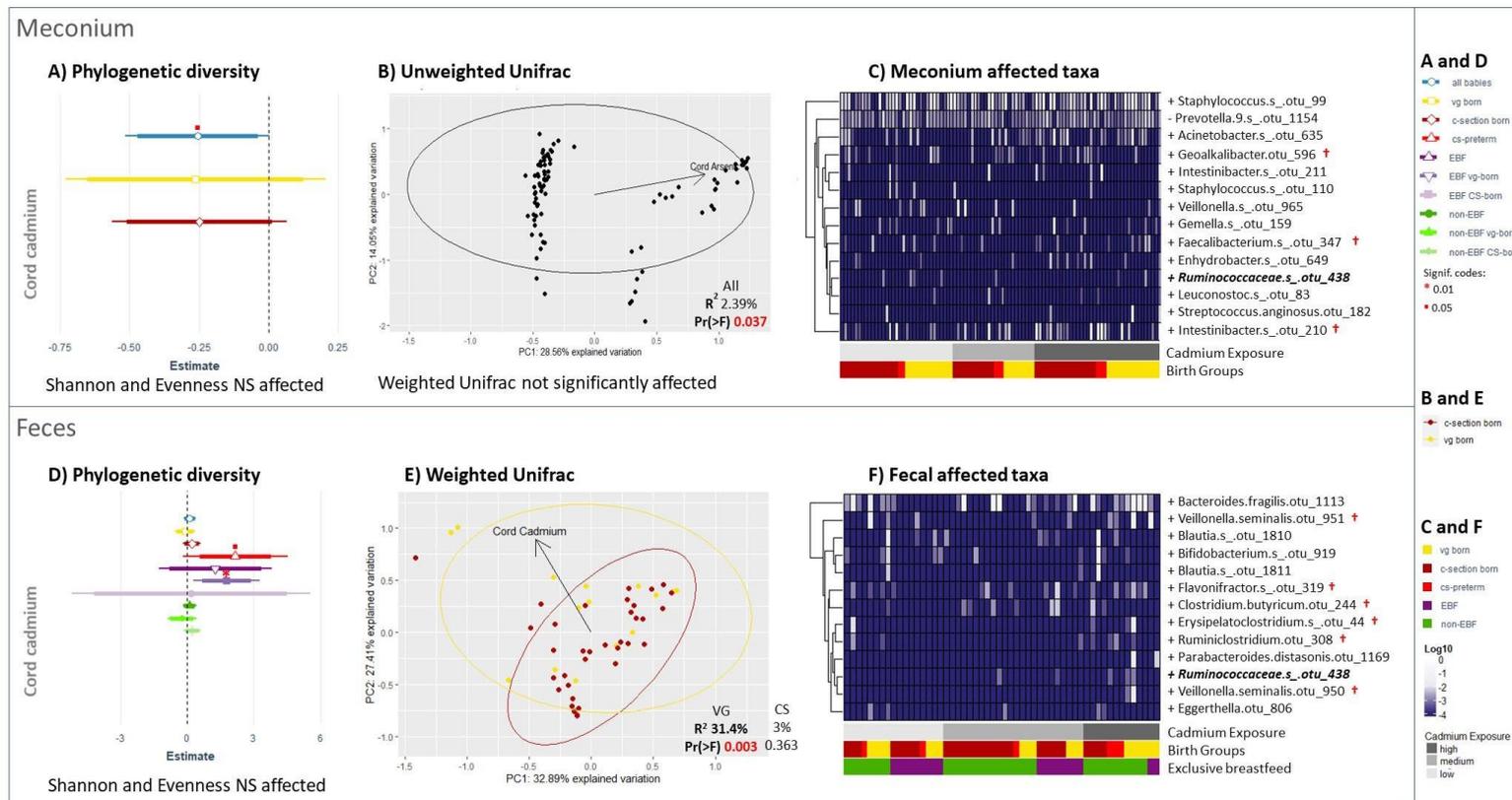
PFAS limits of detection: PFOA: 0.07 ng/mL; PFOS: 0.24 ng/mL

Fig. 1. The meconium and fecal microbiome structures with increasing arsenic in cord blood.



Increasing levels of arsenic in cord blood associate with infant developmental microbiome alterations. A and D) The point indicates the β estimate of cord arsenic effect on alpha diversity within each baby group, the horizontal thicker band represents the 90% CI and the thin 95% CI; **B)** Principal Coordinate Analysis (PcoA) using the weighted UniFrac distance metric, the arrow indicates the effect of cord arsenic on the PcoA plot, the ellipses and colors indicates preterm delivery (yes/no); **E)** the ellipses were calculated for delivery mode (c-section/vg) and the colors indicates EBF status (non-EBF/EBF); **C and F)** Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with increasing arsenic in cord blood by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods). All meconium models were adjusted for delivery mode (c-section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal antibiotic exposure (yes/no). All fecal models were adjusted for age (week6, week14 and week28) and/or infant diet (EBF, yes/no) and/or delivery mode (c-section/vg). Arsenic unit is ug/L. EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery. Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

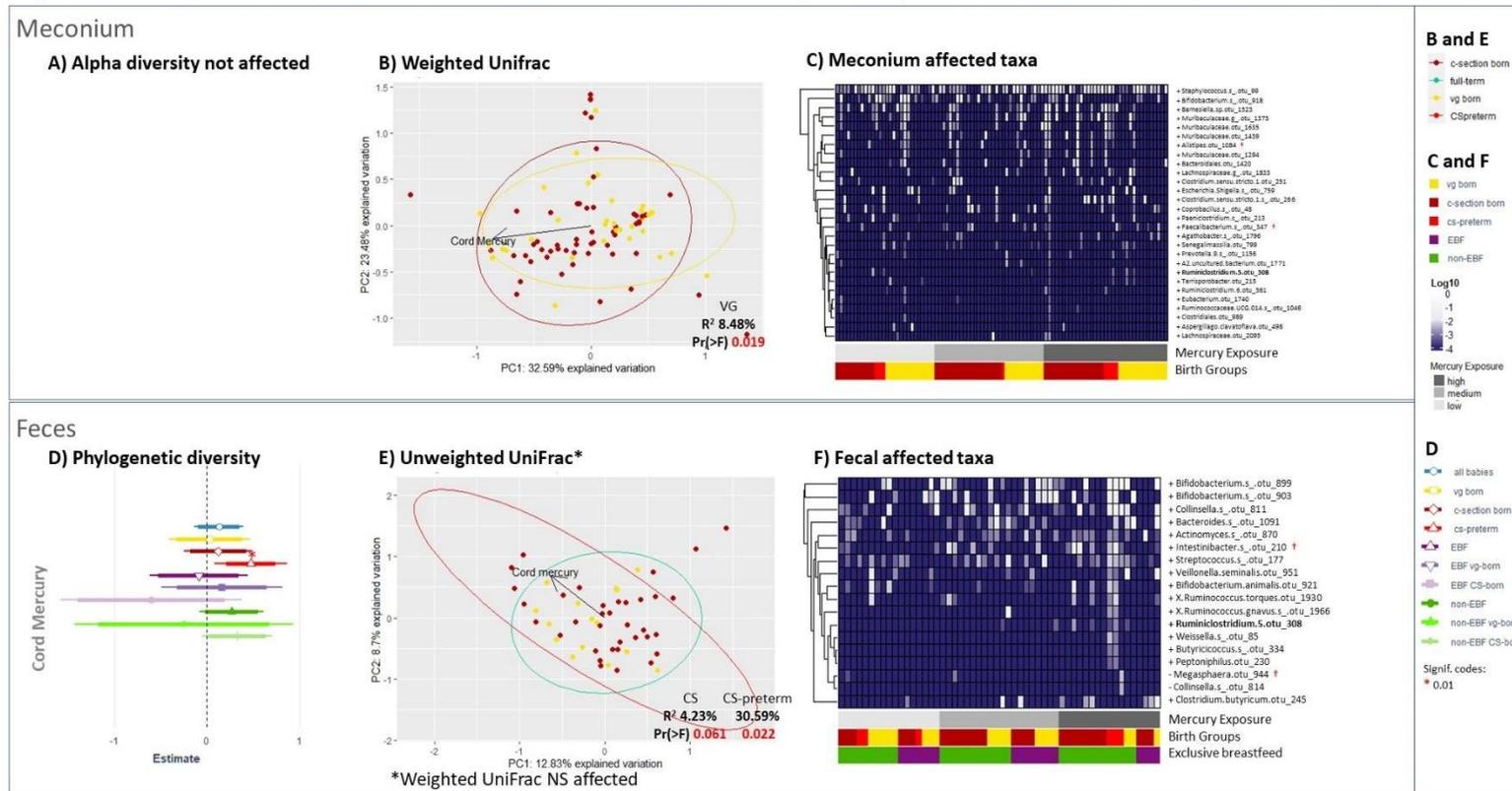
Fig. 2. The meconium and fecal microbiome structures with increasing cadmium in cord blood.



Increasing levels of cadmium in cord blood associate with infant developmental microbiome alterations. **A and D)** The point indicates the β estimate of cord cadmium effect on alpha diversity within each baby group, the horizontal thicker band represents the 90% CI and the thin 95% CI; **B)** Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the unweighted UniFrac distance metric (weighted UniFrac not significant), the arrow indicates the effect of cord cadmium on the PcoA plot; **E)** PCoA using weighted UniFrac, the ellipses were calculated for delivery mode (c-section/vg) and the colors indicates EBF status (non-EBF/EBF); **C and F)** Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with increasing cadmium in cord blood by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods). All meconium models were adjusted for delivery mode (c-section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal antibiotic exposure (yes/no). All fecal models were adjusted for age (week6, week14 and week28) and/or infant diet (EBF,

yes/no) and/or delivery mode (c-section/vg). Cadmium unit is ug/L. EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery. Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

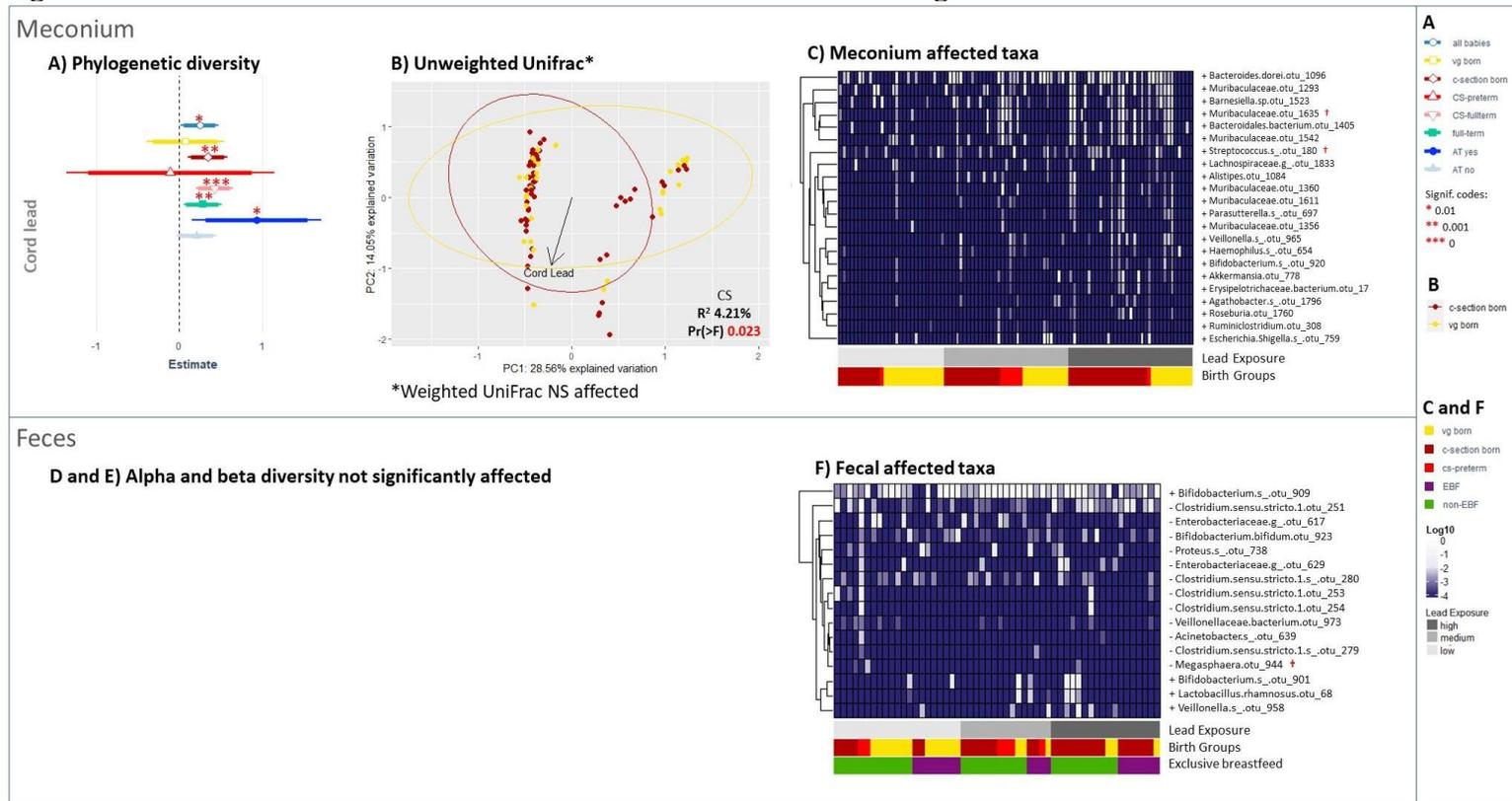
Fig. 3. The meconium and fecal microbiome structures with increasing mercury in cord blood.



Increasing levels of mercury in cord blood associate with infant developmental microbiome alterations. **A)** Meconium alpha diversity did not show significant differences; **B)** Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the weighted UniFrac distance metric, the arrow indicates the effect of cord mercury on the PcoA plot, the ellipses were calculated for delivery mode (c-section/vg); **C and F)** Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with increasing mercury in cord blood by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods); **D)** The point indicates the β estimate of cord mercury effect on alpha diversity within each baby group, the horizontal thicker band represents the 90% CI and the thin 95% CI; **E)** PCoA using the unweighted

UniFrac distance metric, the arrow indicates the effect of cord mercury on the PcoA plot, the ellipses were calculated for preterm delivery (yes/no). All meconium models were adjusted for delivery mode (c-section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal antibiotic exposure (yes/no). All fecal models were adjusted for age (week6, week14 and week28) and/or infant diet (EBF, yes/no) and/or delivery mode (c-section/vg). Mercury unit is ug/L. EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery. Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

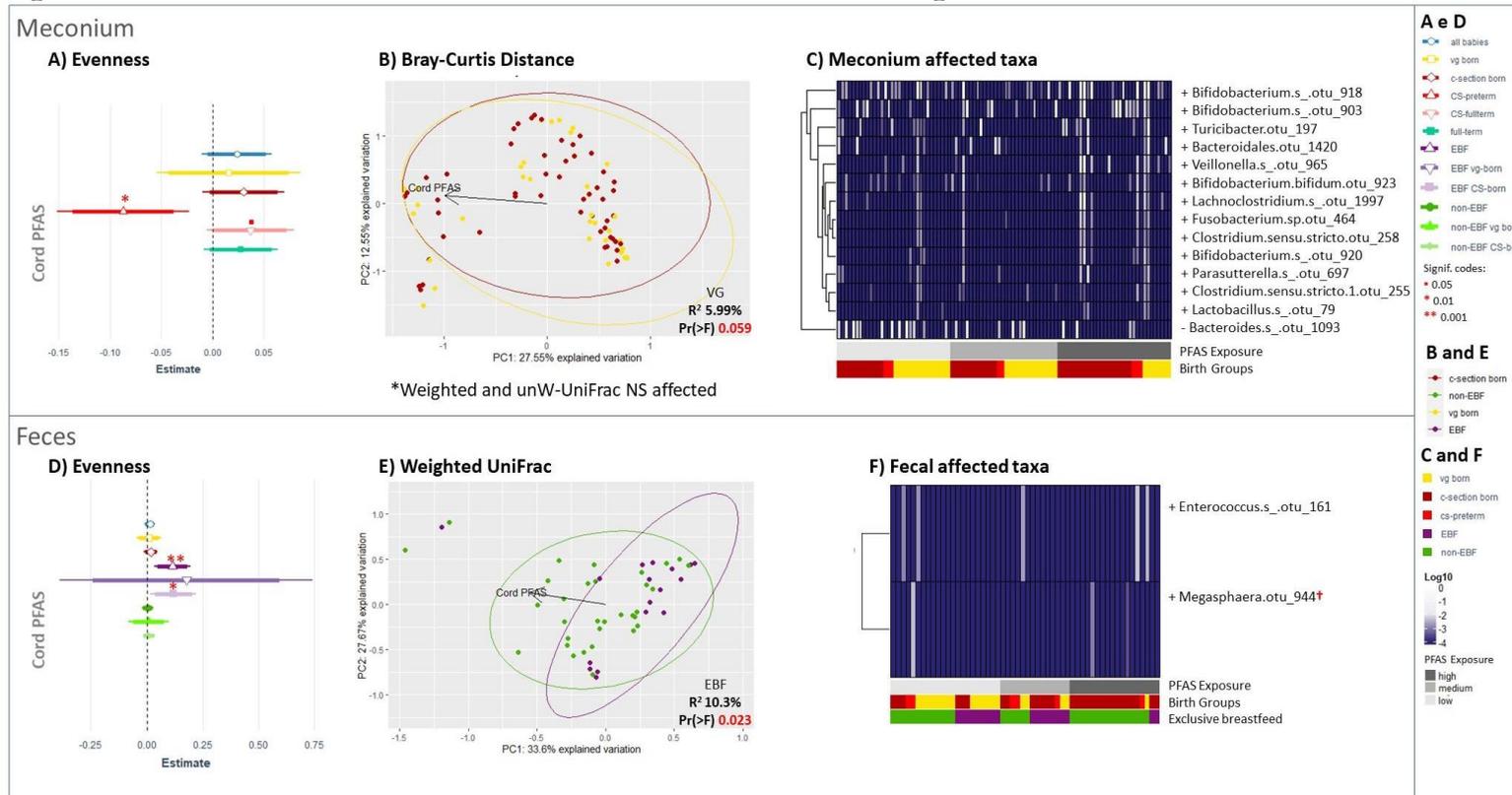
Fig. 4. The meconium and fecal microbiome structures with increasing lead in cord blood.



Increasing levels of lead in cord blood associate with infant developmental microbiome alterations. **A)** The point indicates the β estimate of cord lead effect on alpha diversity within each baby group, the horizontal thicker band represents the 90% CI and the thin 95% CI; **B)** Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the unweighted UniFrac distance metric (weighted UniFrac not significant), the arrow indicates the effect of

cord lead on the PcoA plot, the ellipses were calculated for delivery mode (c-section/vg); **C and F**) Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with increasing lead in cord blood by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods). All meconium models were adjusted for delivery mode (c-section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal antibiotic exposure (yes/no). Lead unit is ($\mu\text{g}/\text{dL}$). EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery; NS, not significant. Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

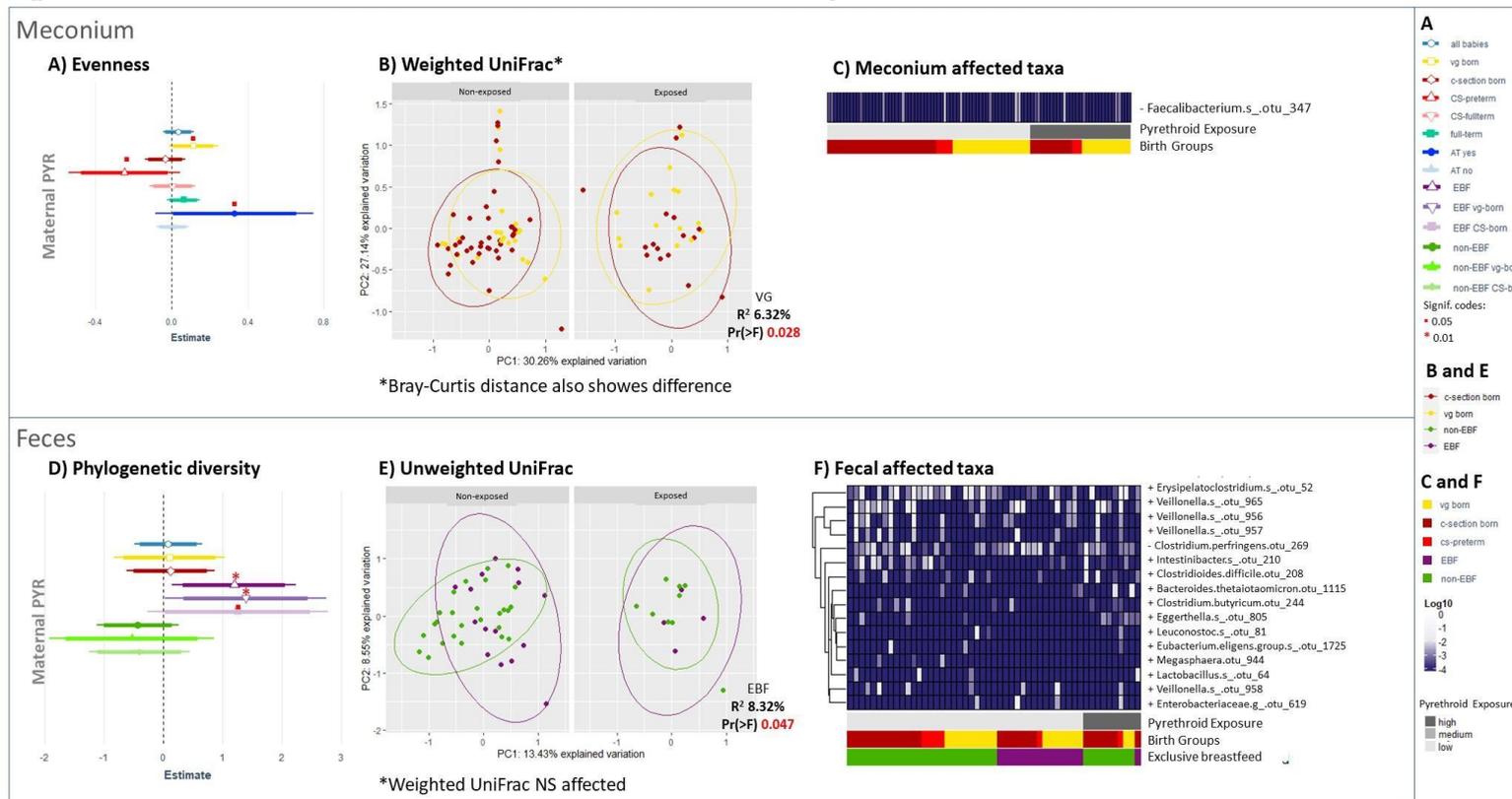
Fig. 5. The meconium and fecal microbiome structures with increasing PFAS in cord blood.



Increasing levels of PFAS in cord blood associate with infant developmental microbiome alterations. **A and D)** The point indicates the β estimate of cord PFAS effect on alpha diversity within each baby group, the horizontal thicker band represents the 90% CI and the thin 95% CI;

B e E) Principal Coordinate Analysis (PCoA) using (b) Bray-Curtis and (e) weighted UniFrac distance metrics, the arrow indicates the effect of cord PFAS on the PcoA plot, the ellipses were calculated for delivery mode (c-section/vg) and EBF status (non-EBF/EBF); **C and F)** Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with increasing lead in cord blood by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods). All meconium models were adjusted for delivery mode (c-section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal antibiotic exposure (yes/no). All fecal models were adjusted for age (week6, week14 and week28) and/or infant diet (EBF, yes/no) and/or delivery mode (c-section/vg) and/or preterm delivery (yes/no). PFAS unit is (ng/mL). EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery; NS, not significant. Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

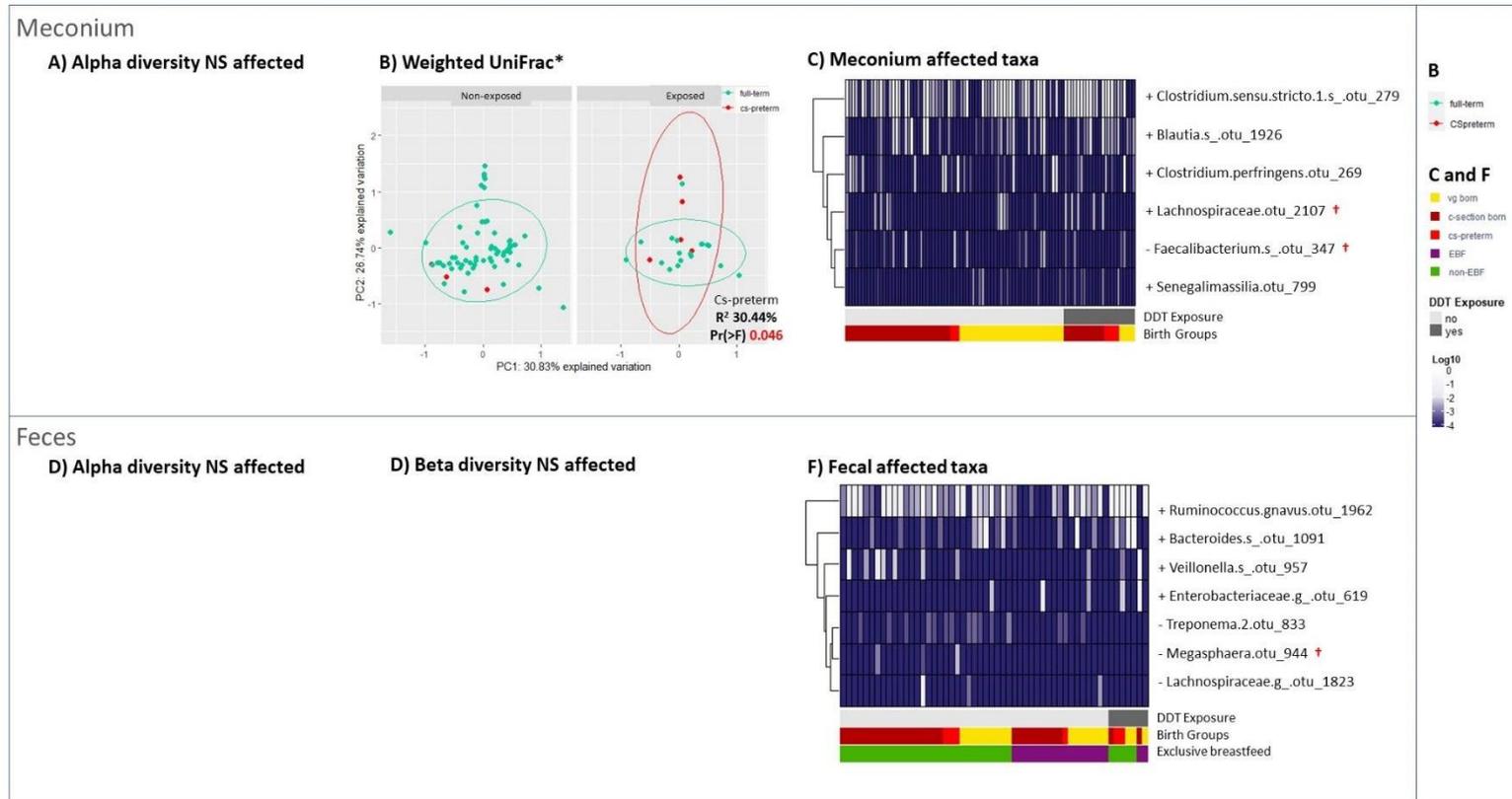
Fig. 6. The meconium and fecal microbiome structures with Pyrethroids in maternal urine.



Increasing levels of PYR in maternal urine associate with infant developmental microbiome alterations. **A** and **D**) The point indicates the β estimate of maternal PYR effect on alpha diversity within each baby group, the horizontal thicker band represents the 90% CI and the thin 95% CI; **B**) Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the Bray-Curtis metric, colors and ellipses were calculated for delivery mode (c-section/vg), split by pyrethroid exposure; **E**) PCoA using unweighted UniFrac metric, colors and ellipses were calculated for EBF status (non-EBF/EBF), split by pyrethroid exposure; **C** and **F**) Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with increasing PYR in maternal urine by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods). All meconium models were adjusted for delivery mode (c-section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal antibiotic exposure (yes/no). All fecal models were adjusted for age (week6, week14 and week28) and/or infant diet (EBF, yes/no) and/or delivery mode (c-section/vg) and/or preterm delivery (yes/no). PYR unit is ng mL⁻¹. EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery; NS, not significant. Taxa

in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

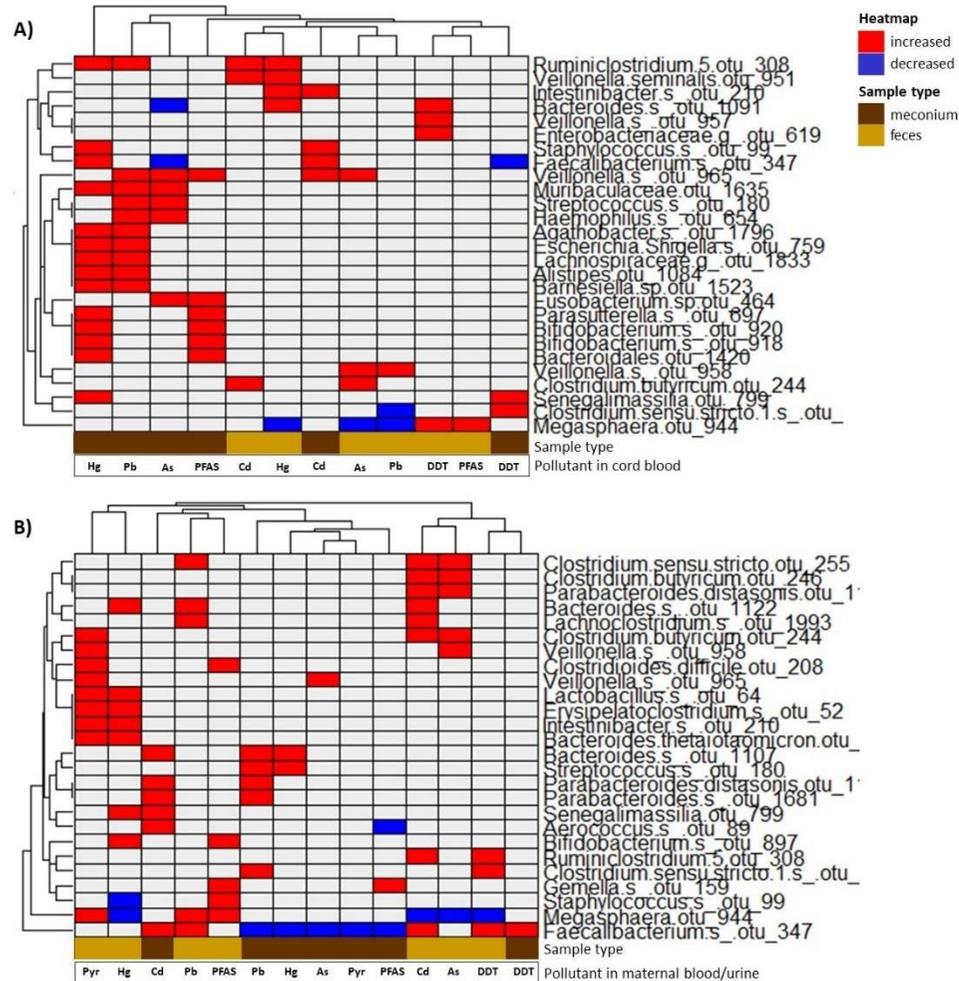
Fig. 7. The meconium and fecal microbiome structures with DDT in cord blood.



Increasing levels of DDT in cord blood associate with infant developmental microbiome alterations. A and D) Alpha diversity not significantly affected; **B)** Principal Coordinate Analysis using weighted UniFrac metric, the ellipses were calculated for pre-term delivery (yes/no), split by DDT exposure; **C and F)** Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with DDT in cord blood (yes/no) by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods). All meconium models were adjusted for delivery mode (c-section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal antibiotic exposure

(yes/no). DDT unit is ng mL⁻¹. EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery; NS, not significant. Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

Fig. 8. The meconium and fecal altered taxa across pollutants.



Significant altered taxa ($q\text{-value} \leq 0.25$) from multivariate associations between OTUs and single pollutants were hierarchically clustered (rows and columns) with ComplexHeatmap. **A)** Pollutants assessed in umbilical cord blood and **B)** pollutants assessed in maternal blood and urine.

SUPPLEMENTAL FILES

Table S1.

Correlation within and between classes of pollutants in umbilical cord blood. PIPA Project, 2017–2018, Rio de Janeiro/Brazil.

		Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury	PFAS
Arsenic	rho	1.000	0.174	0.173	-0.243*	0.113
	P value		0.102	0.104	0.021	0.302
	N	90	90	90	90	85
Cadmium	rho	0.174	1.000	0.290**	0.395**	-0.106
	P value	0.102		0.006	0.000	0.334
	N	90	90	90	90	85
Lead	rho	0.173	0.290**	1.000	0.302**	-0.052
	P value	0.104	0.006		0.004	0.640
	N	90	90	90	90	85
Mercury	rho	-0.243*	0.395**	0.302**	1.000	-0.207
	P value	0.021	0.000	0.004		0.057
	N	90	90	90	90	85
PFAS	rho	0.113	-0.106	-0.052	-0.207	1.000
	P value	0.302	0.334	0.640	0.057	
	N	85	85	85	85	88

Table S2.

Correlation within and between classes of pollutants in maternal blood and urine. PIPA Project, 2017–2018, Rio de Janeiro/Brazil.

		Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury	PFAS	Pyrethroid
Arsenic	rho	1.000	0.205*	0.215*	0.381**	0.109	0.315**
	P value		0.049	0.038	.000	0.298	0.002
	N	93	93	93	93	93	93
Cadmium	rho	0.205*	1.000	0.503**	0.289**	0.203	0.047
	P value	0.049		0.000	0.005	0.051	0.656
	N	93	93	93	93	93	93
Lead	rho	0.215*	0.503**	1.000	0.560**	-0.047	0.114
	P value	0.038	0.000		0.000	0.653	0.277
	N	93	93	93	93	93	93
Mercury	rho	0.381**	0.289**	0.560**	1.000	-0.006	0.254*
	P value	0.000	0.005	0.000		0.957	0.014
	N	93	93	93	93	93	93
PFAS	rho	0.109	0.203	-0.047	-0.006	1.000	-0.001
	P value	0.298	0.051	0.653	0.957		0.993
	N	93	93	93	93	93	93
Pyrethroid	rho	0.315**	0.047	0.114	0.254*	-0.001	1.000
	P value	0.002	0.656	0.277	0.014	0.993	
	N	93	93	93	93	93	93

Table S3.

Distribution of diversity metrics in infant meconium and fecal samples. PIPA Project, 2017–2018, Rio de Janeiro/Brazil.

	N	min.	mean	Median (SD)	max.
Shannon Index					
meconium	94	0.21	2.73	2.71 (1.34)	6.40
feces	54	0.49	2.55	2.50 (0.82)	4.17
Phylogenetic					
meconium	94	2.85	8.22	8.36 (3.05)	19.29
feces	54	2.74	4.79	4.60 (0.91)	7.04
Pielou Evenness					
meconium	94	0.05	0.45	0.47 (0.18)	0.77
feces	54	0.12	0.48	0.49 (0.13)	0.69

Fig. S1.

The meconium and fecal microbiome structures with increasing arsenic in maternal blood.

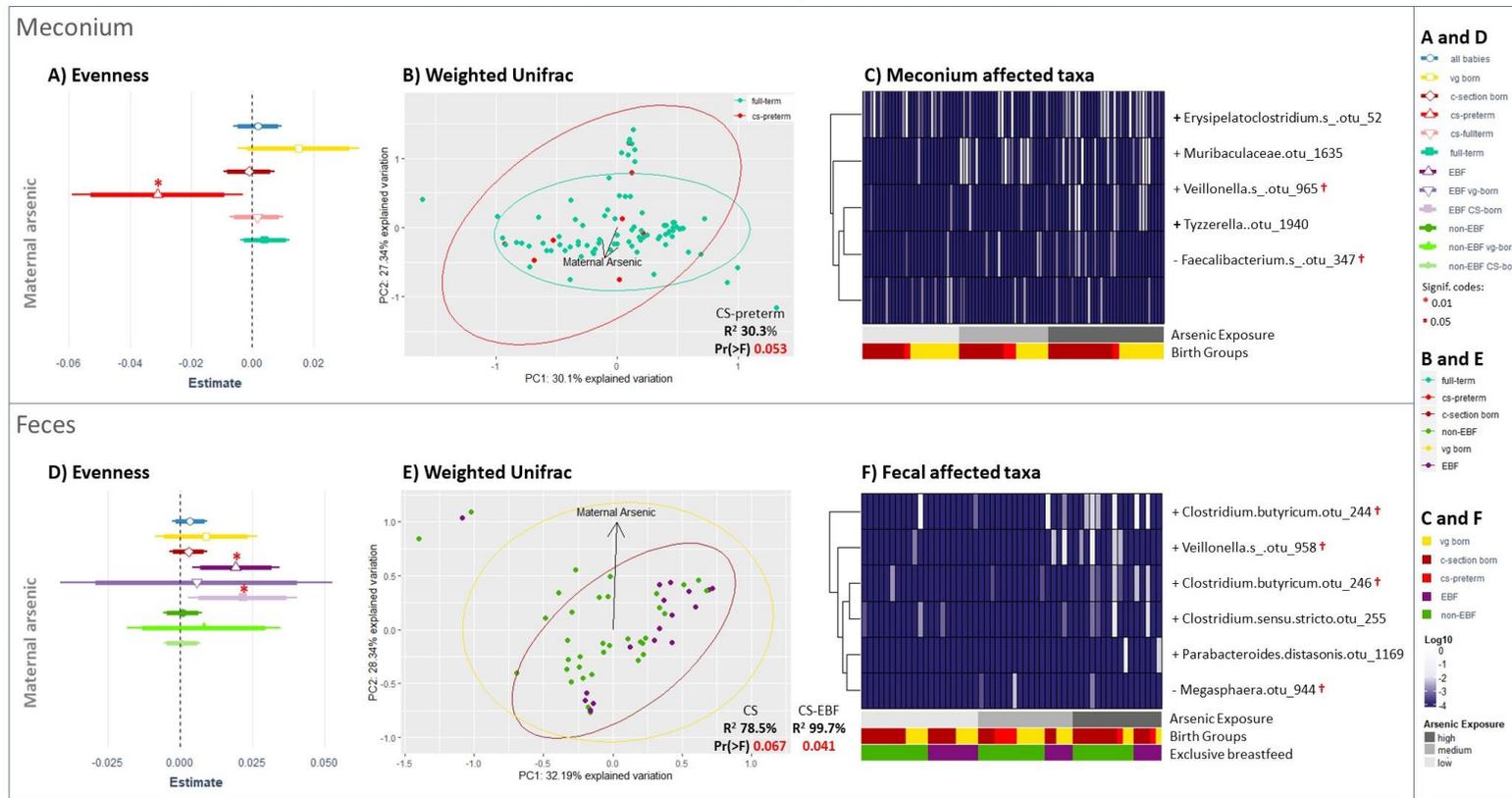
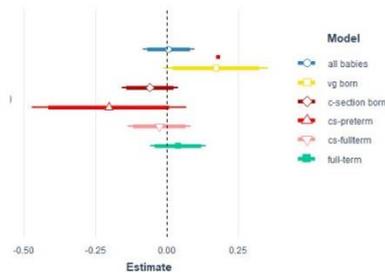


Fig. S1. A and D) The point indicates the β estimate of maternal arsenic effect on alpha diversity within each baby group, the horizontal thicker band represents the 90% CI and the thin 95% CI; **B)** Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the weighted UniFrac distance metric, the arrow indicates the effect of maternal arsenic on the PCoA plot, the ellipses and colors indicates preterm delivery (yes/no); **E)** the ellipses were calculated for delivery mode (c-section/vg) and the colors indicates EBF status (non-EBF/EBF); **C and F)** Shown is a heatmap of the taxa (y-

axis) significantly associated with increasing arsenic in maternal blood by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods). All meconium models were adjusted for delivery mode (c-section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal antibiotic exposure (yes/no). All fecal models were adjusted for age (week6, week14 and week28) and/or infant diet (EBF, yes/no) and/or delivery mode (c-section/vg). Arsenic unit is ug/L. EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery. Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

Supplemental material supporting Fig. 1. The meconium and fecal microbiome structures with increasing arsenic in cord blood.

Supp. A) Shannon



S Table B) Effect of umbilical cord arsenic on meconium β -diversity by preterm delivery status.

	CS-preterm N=8	Full-term N=82
R2	29.9%	0.48%
Pr(>F)	0.067	0.858

S Table E) Effect of umbilical cord arsenic on developmental feces β -diversity by delivery mode and BF status.

	Vag N=15	CS N=34	VAG-EBFy N=7	CS-EBFy N=11
R2	74.0%	78.5%	93.9%	99.7%
Pr(>F)	0.270	0.062	0.432	0.047

Supplemental material supporting Fig. S1. The meconium and fecal microbiome structures with increasing arsenic in maternal blood.

S Table B) Effect of maternal arsenic on meconium β -diversity by preterm delivery status.

	CS-preterm N=8	Full-term N=85
R2	30.3%	1.00%
Pr(>F)	0.053	0.491

S Table E) Effect of maternal arsenic on developmental feces β -diversity by delivery mode and BF status.

	Vg N=18	C-sec N=34	EBFy-VAG N=7	EBFy-CS N=11
R2	70.1%	78.5%	94.0%	99.7%
Pr(>F)	0.095	0.067	0.448	0.041

Fig. S2.

The meconium and fecal microbiome structures with increasing cadmium in maternal blood.

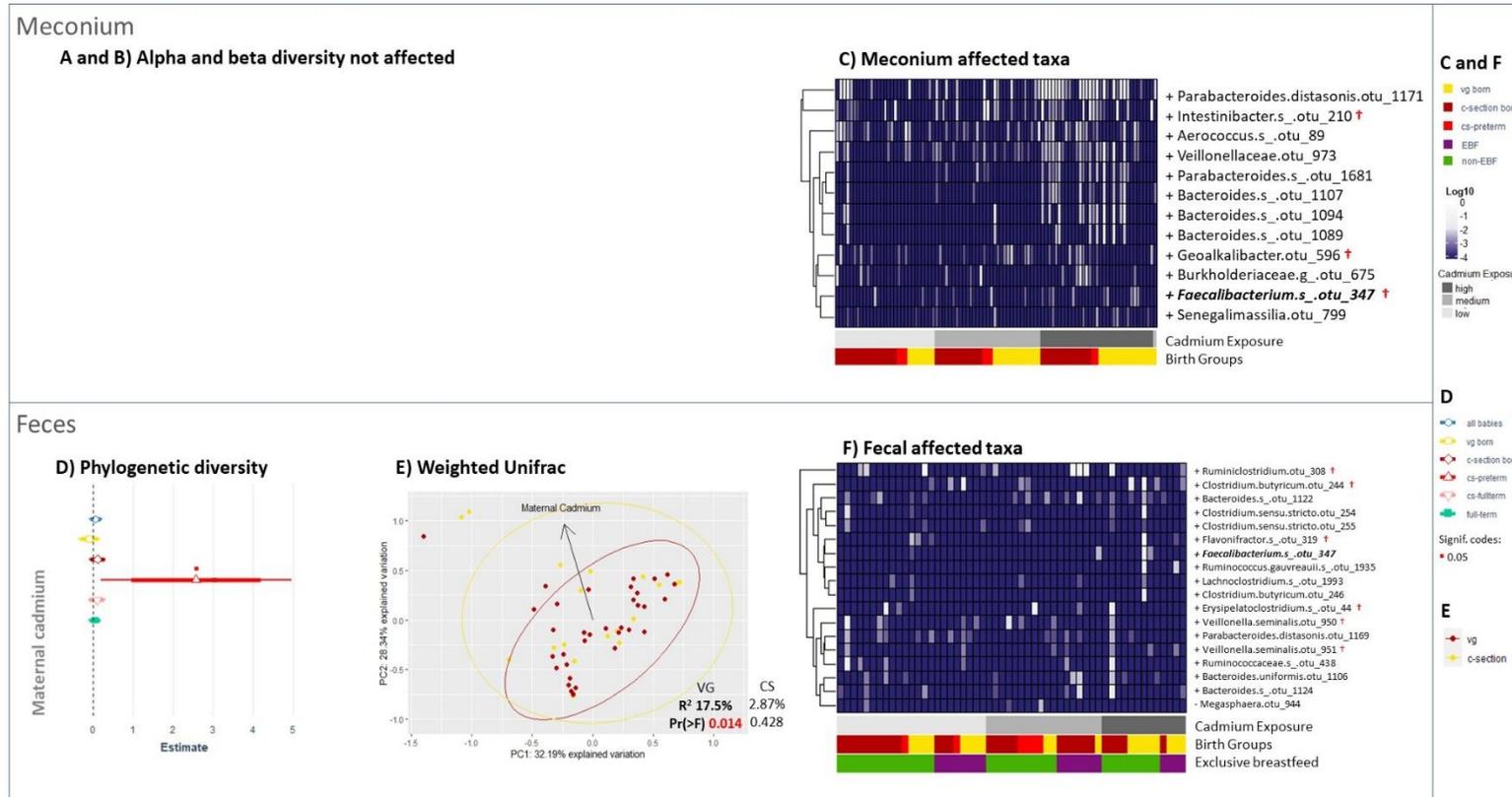


Fig. S2. A and D) The point indicates the β estimate of cord cadmium effect on alpha diversity within each baby group, the horizontal thicker band represents the 90% CI and the thin 95% CI; **B)** Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the unweighted UniFrac distance metric (weighted UniFrac not significant), the arrow indicates the effect of cord cadmium on the PcoA plot; **E)** PCoA using weighted UniFrac, the ellipses were calculated for delivery mode (c-section/vg) and the colors indicates EBF status (non-EBF/EBF); **C and F)** Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with increasing cadmium in cord blood by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using

generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods). All meconium models were adjusted for delivery mode (c-section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal antibiotic exposure (yes/no). All fecal models were adjusted for age (week6, week14 and week28) and/or infant diet (EBF, yes/no) and/or delivery mode (c-section/vg). Cadmium unit is ug/L. EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery. Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

Supplemental material supporting Fig. 2. The meconium and fecal microbiome structures with increasing cadmium in cord blood.

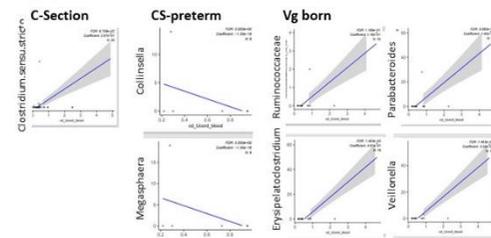
S Table B) Effect of umbilical cord cadmium on meconium β -diversity by gestational age.

	All babies N=90	CS-preterm N=8	Full-term N=82
R2	2.39%	16.3%	2.7%
Pr(>F)	0.037	0.355	0.031

S Table E) Effect of cord cadmium on developmental fecal β -diversity by delivery mode and BF status.

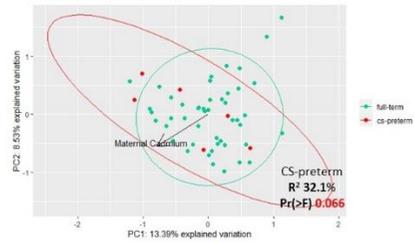
	Vg N=15	CS N=34	EBFy-CS N=11	EBFn-VAG N=8
R2	31.4%	3%	28.5%	41.5%
Pr(>F)	0.003	0.363	0.068	0.012

S Fig. F) Fecal affected taxa in



Supplemental material supporting Fig. S2. The meconium and fecal microbiome structures with increasing cadmium in maternal blood.

S Fig. E) Unweighted UniFrac



S Table C. Effect of maternal cadmium on developmental fecal unweighted UniFrac by preterm delivery status.

	CS-preterm N=5	Fullterm N=47
R²	32.1%	1.27%
Pr(>F)	0.066	0.903

S Table D. Effect of maternal cadmium on developmental fecal W-UniFrac by delivery mode and BF status.

	Vag N=18	C-sec N=34	EBFy- VAG N=7	EBFn-VAG N=11
R²	17.52%	2.87%	5.34%	24.14%
Pr(>F)	0.014	0.428	0.919	0.075

S Fig. F) Fecal affected taxa in

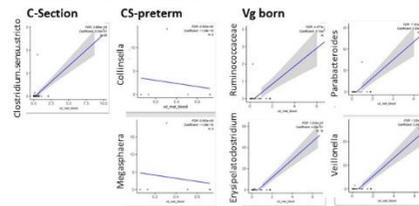


Fig. S3.

The meconium and fecal microbiome structures with increasing mercury in maternal blood.

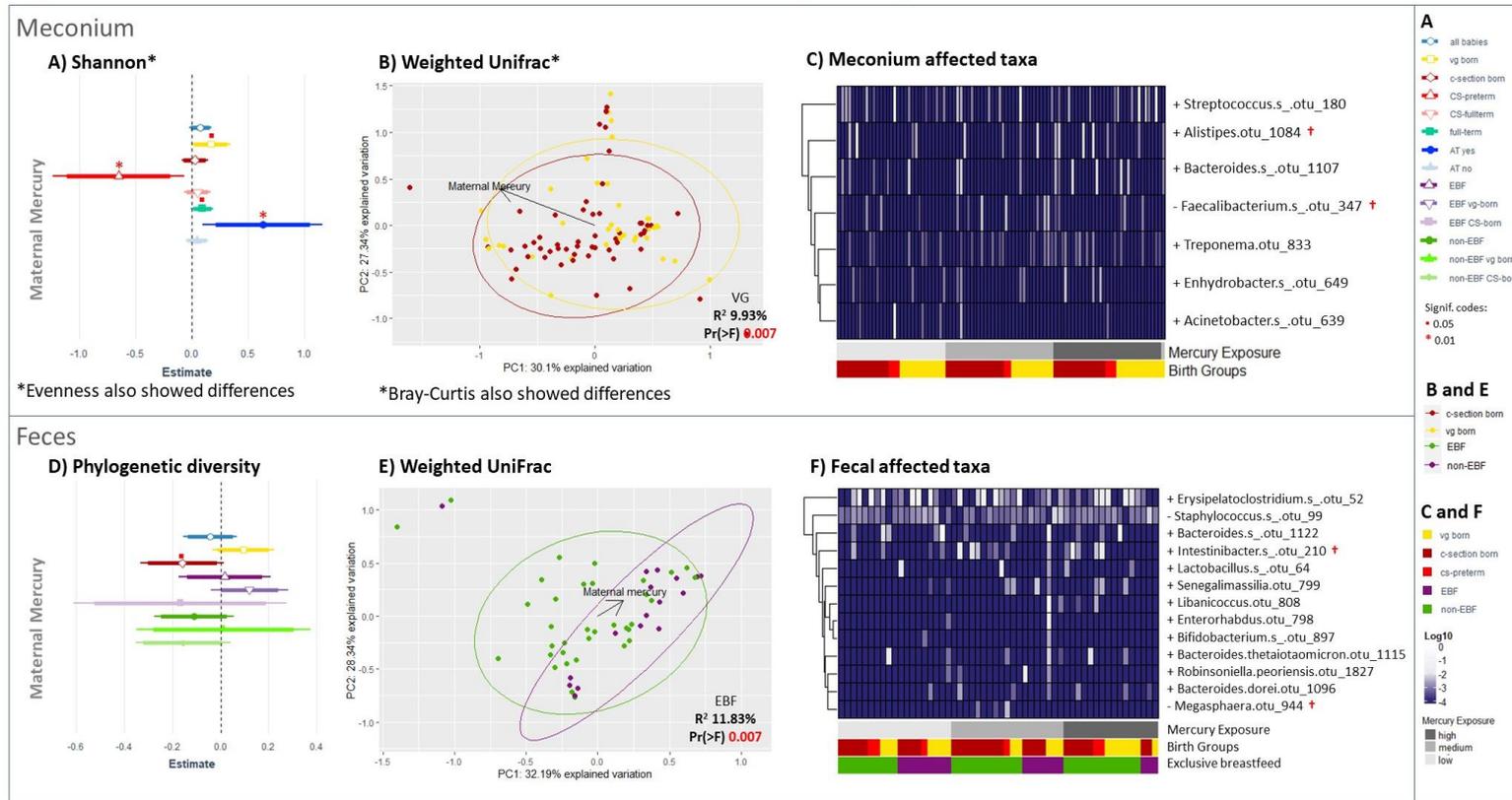
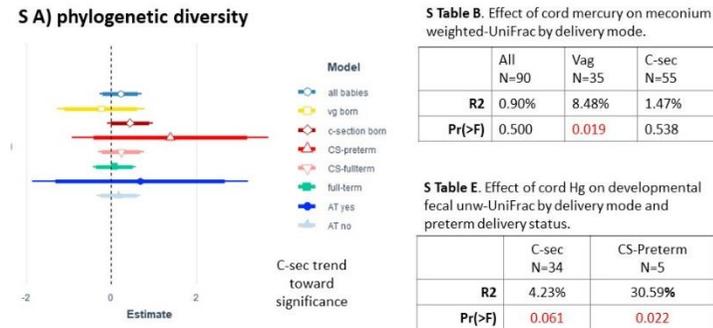


Fig. S3. A and D) The point indicates the β estimate of maternal mercury effect on alpha diversity within each baby group, the horizontal thicker band represents the 90% CI and the thin 95% CI; **B e E)** Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the weighted UniFrac distance metric, the arrow indicates the effect of maternal mercury on the PcoA plot. In B, the ellipses were calculated for delivery mode (c-section/vg) and, in E for EBF status (yes/no); **C and F)** Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with increasing mercury in maternal blood by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods). All

meconium models were adjusted for delivery mode (c-section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal antibiotic exposure (yes/no). All fecal models were adjusted for age (week6, week14 and week28) and/or infant diet (EBF, yes/no) and/or delivery mode (c-section/vg) and/or preterm delivery (yes/no). Mercury unit is ($\mu\text{g/L}$). Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

Supplemental material supporting Fig. 3. The meconium and fecal microbiome structures with increasing mercury in cord blood.



Supplemental material supporting Fig. S3. The meconium and fecal microbiome structures with increasing mercury in maternal blood.

S Table B. Effect of maternal mercury on meconium W-UniFrac by delivery mode.

	All N=93	Vag N=38	C-sec N=55
R2	0.38%	9.93%	1.17%
Pr(>F)	0.880	0.007	0.617

S Table E. Effect of maternal Hg on developmental fecal w-UniFrac by breastfeeding status.

	EBFyes N=18	EBFno N=34
R2	11.83%	2.08%
Pr(>F)	0.007	0.662

Fig. S4.

The meconium and fecal microbiome structures with increasing lead in maternal blood.

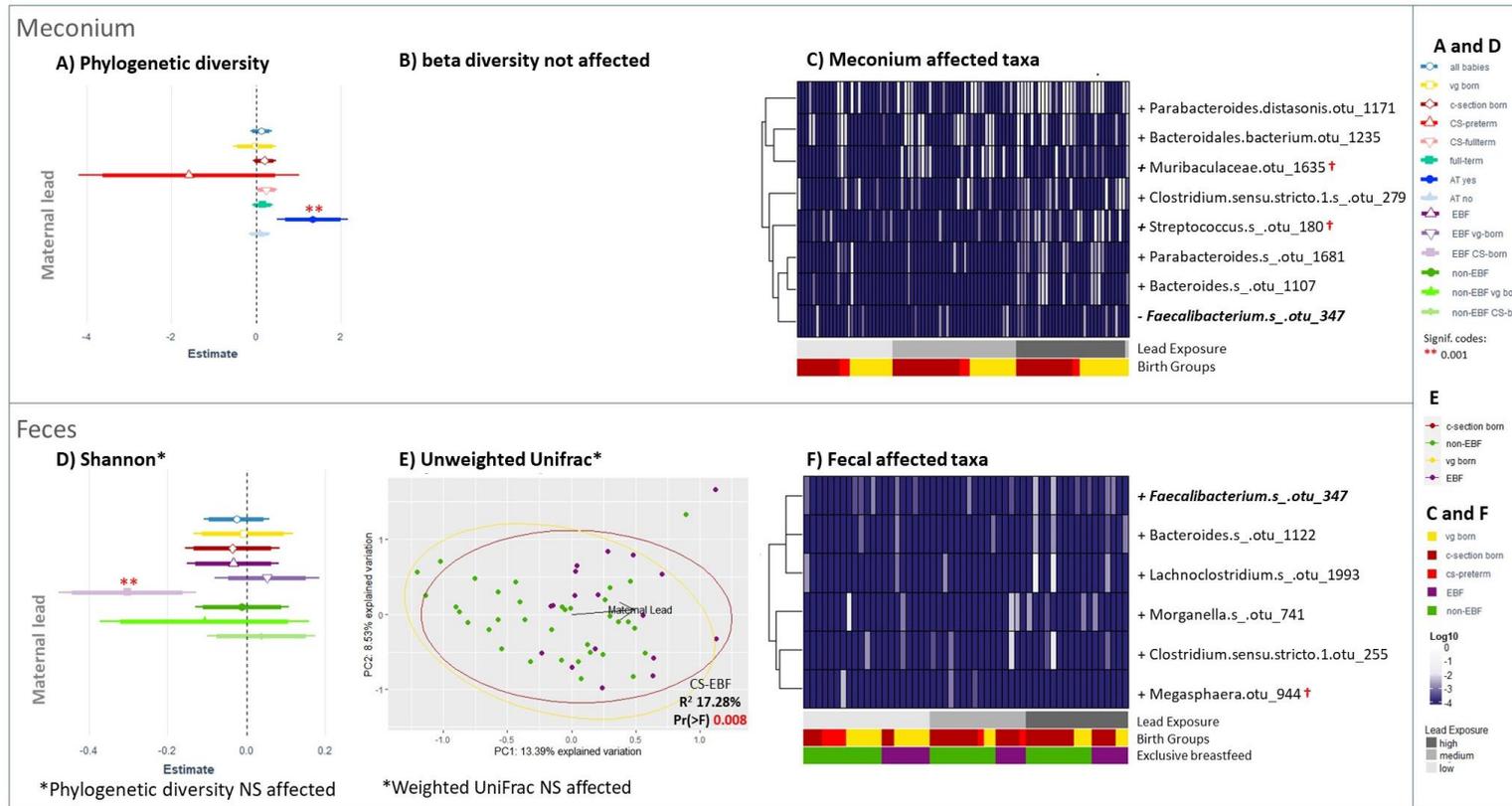


Fig. S4. A and D) The point indicates the β estimate of maternal lead effect on alpha diversity within each baby group, the horizontal thicker band represents the 90% CI and the thin 95% CI; **C e F)** Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with increasing lead in maternal blood by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods); **E)** Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the unweighted UniFrac distance metric, the arrow indicates the effect of maternal lead on the PcoA plot. All meconium models were adjusted for delivery mode (c-section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal

antibiotic exposure (yes/no). All fecal models were adjusted for age (week6, week14 and week28) and/or infant diet (EBF, yes/no) and/or delivery mode (c-section/vg) and/or preterm delivery (yes/no). Lead unit is ($\mu\text{g}/\text{dL}$). EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery; NS, not significant. Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

Supplemental material supporting Fig. 4. The meconium and fecal microbiome structures with increasing lead in maternal blood.

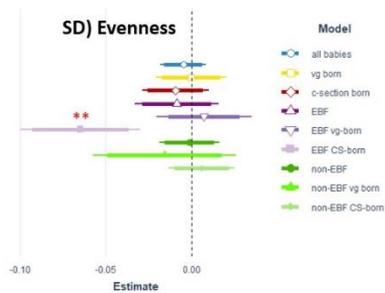
S Table B. Effect of cord lead on meconium unweighted Unifrac by delivery mode.

	All N=90	Vag N=38	C-sec N=55
R2	2.05%	1.73%	4.21%
Pr(>F)	0.060	0.831	0.023

S Table B. Effect of cord lead on meconium weighted unifrac by AT use.

	All N=90	Yes N=9	No N=81
R2	1.13%	24.3%	0.76%
Pr(>F)	0.369	0.095	0.684

Supplemental material supporting Fig. S4. The meconium and fecal microbiome structures with increasing lead in maternal blood.



S Table E. Effect of maternal lead on fecal unweighted UniFrac

	All babies N=52	Vag N=18	C-sec N=34	EBF y N=18	EBFy- VAG N=7	EBFy-CS N=11	EBF no N=35	EBFno- VAG N=11
R2	2.08%	6.34%	3.42%	6.27%	16.54%	17.28%	2.41%	11.90%
Pr(>F)	0.329	0.285	0.209	0.320	0.496	0.008	0.722	0.231

S Fig. F) Fecal affected taxa in

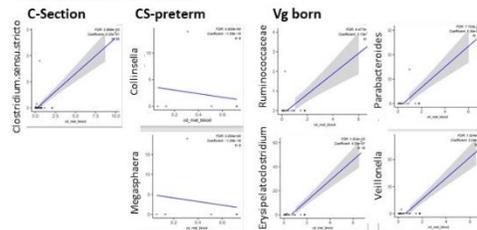


Fig. S5.

The meconium and fecal microbiome structures with increasing PFAS in maternal blood.

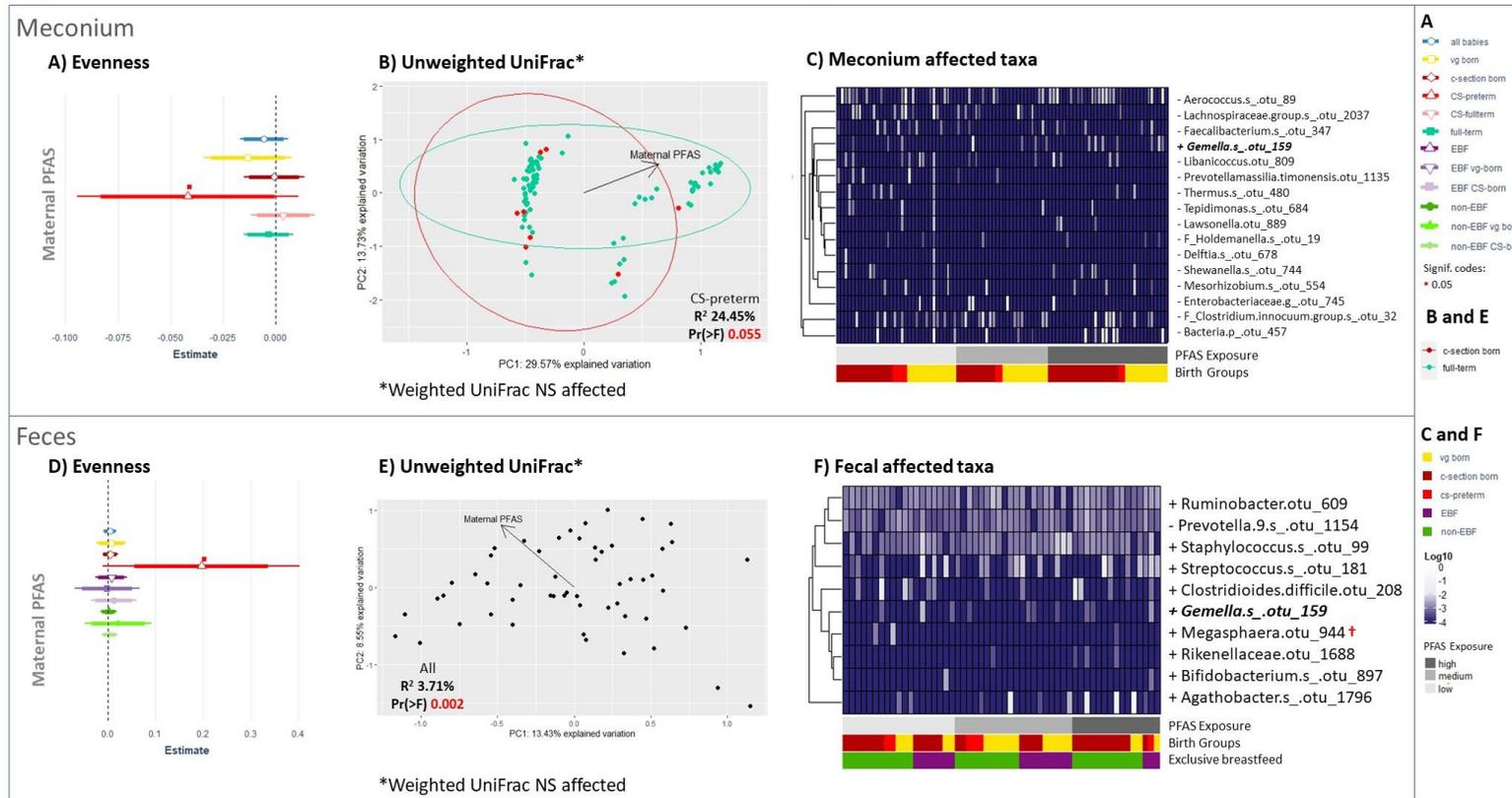


Fig. S5. A and D) The point indicates the β estimate of maternal PFAS effect on alpha diversity within each baby group, the horizontal thicker band represents the 90% CI and the thin 95% CI; **B e E)** Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the unweighted UniFrac metric, the arrow indicates the effect of maternal PFAS on the PcoA plot, the ellipses were calculated for preterm delivery (yes/no); **C and F)** Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with increasing PFAS in maternal blood by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods). All meconium models were adjusted for delivery mode (c-

section/vg), and/or preterm delivery (yes/no), and/or maternal antibiotic exposure (yes/no). All fecal models were adjusted for age (week6, week14 and week28) and/or infant diet (EBF, yes/no) and/or delivery mode (c-section/vg) and/or preterm delivery (yes/no). PFAS unit is (ng/mL). EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery; NS, not significant. Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

Supplemental material supporting Fig. 5. The meconium and fecal microbiome structures with increasing PFAS in cord blood.

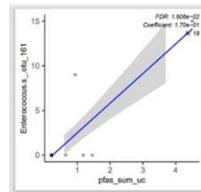
S Table B. Effect of cord PFAS on meconium Bray-Curtis distance.

	All N=88	Vag N=36	C-sec N=52	CS- preterm N=7	Full- term N=81
R2	2.14%	5.99%	2.12%	8.80%	2.46%
Pr(>F)	0.064	0.059	0.360	0.946	0.048

S Table E. Effect of cord PFAS on fecal weighted-UniFrac by delivery mode and breastfeeding status.

	Vag N=16	C-sec N=34	EBF yes N=19	EBF no N=34
R2	2.10%	7.62%	10.3%	6.21%
Pr(>F)	0.847	0.041	0.023	0.084

S Fig. F.

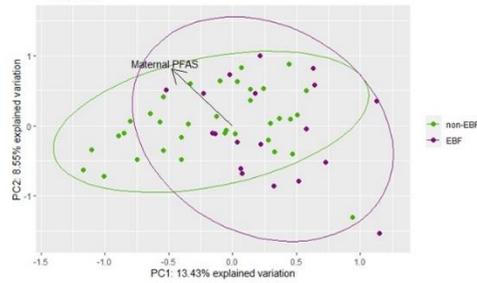


Supplemental material supporting Fig. S5. The meconium and fecal microbiome structures with increasing PFAS in maternal blood.

S Table B. Effect of maternal PFAS on meconium unweighted-unifrac by gestational duration.

	All N=93	CS-preterm N=8	Full-term N=85
R2	1.07%	24.45%	1.11%
Pr(>F)	0.365	0.055	0.421

S Fig E)



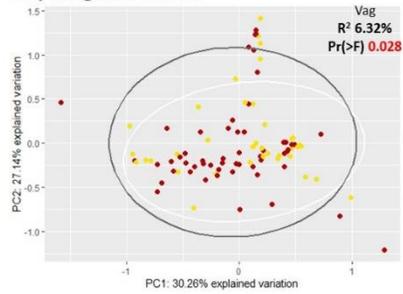
S Table E. Effect of maternal PFAS on developmental fecal unweighted-unifrac by delivery mode and breastfeeding status.

	All N=54	Vag N=19	C-sec N=35	EBF yes N=19	EBF no N=34
R2	3.71%	5.32%	4.09%	6.98%	4.56%
Pr(>F)	0.002	0.465	0.061	0.204	0.037

Supplemental material supporting **Fig. 6.**

The meconium and fecal microbiome structures with increasing PYR in maternal urine.

S B) Weighted UniFrac



A) Shannon also significantly increased in vg born babies

S Table B. Effect of maternal pyrethroid on meconium Weighted UniFrac by delivery mode groups.

	All N=94	Vag N=38	C-sec N=55
R2	0.98%	6.32%	0.37%
Pr(>F)	0.428	0.028	0.946

S Table E. Effect of maternal pyrethroid on developmental feces unweighted-Unifrac by EBF status.

	All N=54	EBF Yes N=19	EBF No N=35
R2	1.62%	8.32%	2.51%
Pr(>F)	0.659	0.047	0.674

Fig. S7.

The meconium and fecal microbiome structures with DDT in maternal blood.

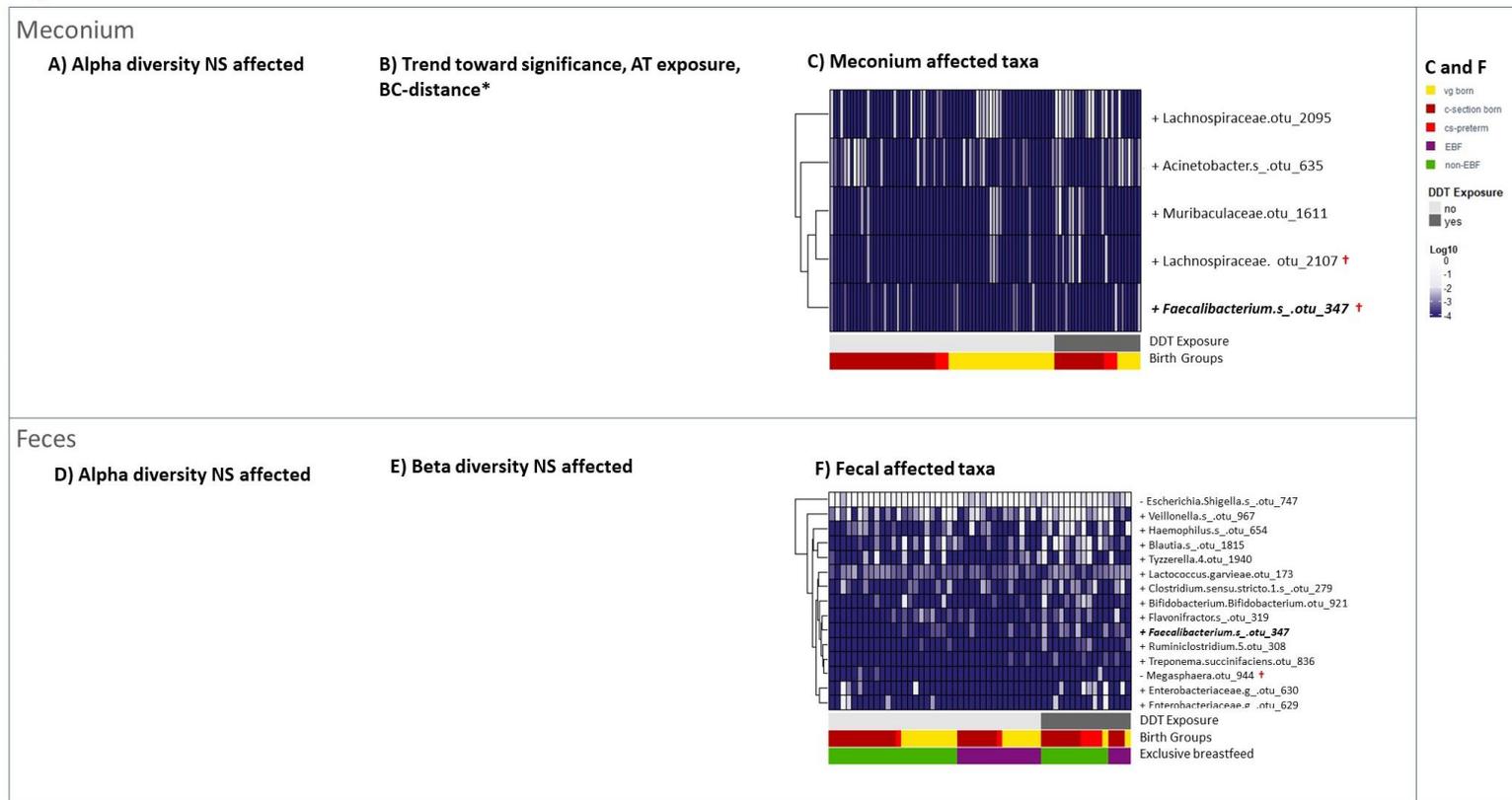
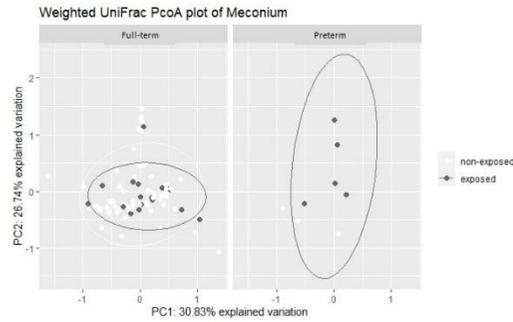


Fig. S7. Alpha and beta diversity not significantly affected; **C and F** Shown is a heatmap of the taxa (y-axis) significantly associated with DDT in maternal blood (yes/no) by birth groups and breastfeeding status (x-axis) using generalized linear models (Maaslin) adjusted for confounding factors (see Methods). DDT unit is ng mL⁻¹. EBF, exclusive breastfeeding; vg, vaginal delivery; NS, not significant. Taxa in bold indicate sustained alteration from meconium to fecal samples and † means that taxon was equally affected regardless of the pollutant source.

Supplemental material supporting Fig. S7. The meconium and fecal microbiome structures with increasing DDT in cord blood.

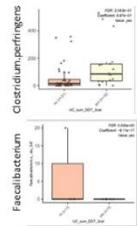
S B) Weighted UniFrac



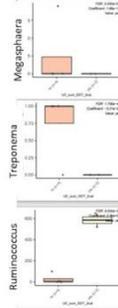
S Table B. Effect of umbilical cord Σ DDT on meconium weighted-UniFrac by gestational age.

	All N=92	Preterm N=8	Full-term N=84
R²	1.41%	30.44%	1.03%
Pr(>F)	0.268	0.046	0.492

S Fig. C) Meconium affected taxa



S Fig F) Fecal affected taxa



5. O CONSUMO MATERNO DE ALIMENTOS DE ACORDO COM O GRAU DE PROCESSAMENTO, DIVERSIDADE ALIMENTAR E A CONTRIBUIÇÃO DE FATORES SOCIODEMOGRÁFICOS.

Este capítulo apresenta o artigo “Food consumption according to the degree of processing, dietary diversity and socio-demographic factors among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil: The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA project)”. Este artigo foi publicado no periódico *Nutrition and Health* em 2020.

Para citação: Napolini NF, Machado PP, Fróes-Asmus CIR, Câmara VM, Moreira JC, Meyer A. Food consumption according to the degree of processing, dietary diversity and socio-demographic factors among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil: The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA project). *Nutr Health*. 2021 Mar;27(1):79-88. doi: 10.1177/0260106020960881. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33076740.

Food consumption according to the degree of processing, dietary diversity and socio-demographic factors among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil: The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA project)

Nathalia Ferrazzo Naspolini¹ , Priscila Pereira Machado², Carmen Ildes Rodrigues Fróes-Asmus³, Volney de M Câmara³, Josino Costa Moreira⁴ and Armando Meyer⁵

Nutrition and Health
1–10
© The Author(s) 2020
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/0260106020960881
journals.sagepub.com/home/nah


Abstract

Background: Relevant evidence has addressed the negative impact of food processing on health. However, maternal ultra-processed food consumption is poorly investigated. **Aim:** To analyze food consumption according to the degree of food processing, dietary diversity, and associated socio-demographic factors during pregnancy. **Methods:** Cross-sectional data was taken from a birth cohort in Rio de Janeiro, Brazil, with 142 pregnant women. We assessed diet using a qualitative food frequency questionnaire and classified food items according to the NOVA classification system as non-ultra-processed-foods and ultra-processed-foods. Non-ultra-processed-food and ultra-processed-food scores were calculated, reflecting weekly intake of more than one subgroup. Dietary diversity of the non-ultra-processed-food diet fraction was described according to the Food and Agriculture Organization guidelines. The association between food consumption and socio-demographic factors were investigated using logistic regression models. **Results:** Over 60% of the pregnant women reported consumption of at least three non-ultra-processed-food groups. However, only 25% had adequate dietary diversity. The level of education (Complete high school: odds ratio, 5.36; 95% confidence interval, 1.73–16.65) was associated with regular intake of “meat and eggs.” Among the ultra-processed-food score, 27% of the participants described a weekly consumption of at least two ultra-processed-food subgroups. White women (odds ratio, 2.63; 95% confidence interval, 1.05–6.63) had a higher chance of reporting “packaged ready meals” consumption. **Conclusions:** This study shows a high weekly consumption of ultra-processed-food subgroups and low dietary diversity of the non-ultra-processed-food fraction of the diet of pregnant women in Brazil. Our results elucidate the influence of socio-demographic characteristics on diet quality during pregnancy.

Keywords

Food consumption, pregnancy nutrition, ultra-processed foods, socio-demographic factors, food processing

Introduction

The hypothesis that early nutrition is part of the programming of obesity and associated co-morbidities at later ages is likely to be multifactorial. It has been demonstrated that maternal diet and lifestyle factors during the fetal period and early life are related to long-lasting fetal programming and might affect the risk of non-communicable diseases in adulthood (Ojha et al., 2013; Koletzko et al., 2012). Moreover, the global prevalence of obesity in children and adolescents has increased around 10% in the last four decades and has achieved about a 20% rise in several

¹ National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

² Institute for Physical Activity and Nutrition, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia

³ School of Medicine, Maternity School Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Workers' Health and Human Ecology Center, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Public Health Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding author:

Nathalia Ferrazzo Naspolini, R. Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos, 21041-210, Rio de Janeiro, Brazil.
Email: nfnaspolini@gmail.com

low- and middle-income countries, including Brazil (NCD-RisC, 2017).

Industrial food processing is now shaping global food systems and is a key determinant of diet and health (Baker et al., 2020). A food classification system based on the nature, extent, and purpose of food processing, named NOVA, has been applied worldwide to understand the impact of modern industrial food systems on human health (Monteiro et al., 2018). NOVA classifies foods into four groups: unprocessed and minimally processed foods; processed culinary ingredients; processed foods; and ultra-processed foods (UPF). The Brazilian Dietary Guidelines recommend a healthy diet pattern based on a variety of unprocessed and minimally processed foods, mostly from plants, and avoiding the consumption of UPFs (Brazil Ministry of Health, 2014).

UPF are formulations manufactured from cheap ingredients that result from a sequence of industrial processes (hence “ultra-processed”). As well as high amounts of fat, sugar, and salt, the manufacture of UPF typically includes industrial ingredients, such as hydrogenated fat, modified starches, protein isolates, and synthetic substances such as additives (colors, flavors, artificial sweeteners, emulsifiers) to provide sensory qualities of natural foods or disguise undesirable qualities in the final product (Monteiro et al., 2019). The consumption of UPF has been associated with overall mortality, overweight, obesity, cancer, cardiometabolic risks, type 2 diabetes, cardiovascular diseases, irritable bowel syndrome, and depression (Elizabeth et al., 2020).

In contrast, unprocessed or minimally processed foods, such as rice, beans, fruits and legumes, meats, eggs, and fish and culinary preparations made up of these foods can provide nutritious, delicious, and culturally appropriate meals adequate for a healthy diet (Brazil Ministry of Health, 2014). Recent studies have highlighted the importance of dietary diversity on pregnancy and offspring outcomes as maternal body mass index (BMI) (Kornatowski and Comstock, 2018), birth weight, and preterm delivery (Zerfu et al., 2016).

In Brazil, the caloric share of UPF significantly increased in recent decades (Martins et al., 2013), and these products currently account for 20.4% of the total energy intake of adults and adolescents (Louzada et al., 2017). Despite growing literature linking the degree of food processing to all forms of malnutrition (Kelly and Jacoby, 2018; Monteiro et al., 2018) and the potential impact of the maternal diet on offspring health (Ojha et al., 2013), there is a gap in the literature concerning the diet quality of pregnant women considering the degree of industrial food processing. For these reasons, this study aims to describe the food intake of pregnant women who attended public prenatal care according to the degree of food processing. A secondary aim of the study was to describe the diversity of the diet. The results will inform further studies with pregnant women and/or their offspring, and in particular analysis aiming to investigate the association between the maternal diet and the

infants’ microbiome as part of the Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA project).

Methods

Study population and data collection

We used cross-sectional data from the pilot study of the PIPA Project conducted in a public Maternity School located in the south area of Rio de Janeiro, Brazil, between October 2017 and August 2018. Briefly, a cohort of pregnant women ($n = 142$) during the third trimester of pregnancy were enrolled in a birth cohort study to investigate the effects of environmental pollutants on maternal-child health (Asmus et al., 2020).

A broader questionnaire was designed to collect data on the prevalence and pattern of maternal environmental pollutant exposure. It was applied by trained interviewers and encompassed questions on demographic characteristics (per-capita family income, ethnicity, age, and educational attainment), diet, smoking and alcohol habits, drug consumption, and physical activity, among others.

Dietary assessment

Dietary assessment was based on a qualitative food frequency questionnaire (FFQ) structured on 79 specified food items. It was designed to be a short survey of foods commonly consumed in Brazil, such as rice, beans, meat, fruits, vegetables, fish, reconstituted meat products (e.g. sausages, ham, meat paste), fast food dishes, and frozen ready meals. For each food item, participants were asked to indicate their frequency of consumption by month (< 1, 2, or 3 times), week (1–2, 3–4, 5–6, or 7 times) or day (1, 2, or ≥ 3 times). Portion sizes and the number of servings consumed were not assessed. Out of the 142 pregnant women, 133 cohort participants completed the dietary assessment of the questionnaire.

Description of variables and construction of food groups and subgroups

First, we classified foods reported in the 79-item FFQ according to the NOVA food classification system into two groups: non-UPF (including unprocessed or minimally processed foods, processed culinary ingredients, and processed foods); and UPF. More information regarding the NOVA system can be found elsewhere (Monteiro et al., 2019).

Then, food items were divided into the following seven subgroups: fruits and vegetables; rice and beans; meat and eggs; fish; sausages and other reconstituted meat products; fast food dishes; and packaged ready meals (Louzada et al., 2017). The first four groups were considered non-UPF and the remainder of the subgroups UPF.

Food intake of these subgroups was categorized by whether a food type was regularly consumed: at least five times per week for “fruits and vegetables” and “rice and

beans;" at least three times per week for "meat and eggs," "fish" and "sausages and other reconstituted meat products;" at least once per week for "fast food dishes" and "packaged ready meals." Different consumption frequencies were used for the food subgroups considering the FAO/World Health Organization and the Brazilian Ministry of Health recommendations on pregnancy healthy dietary practices (FAO, 2010; Brazil Ministry of Health, 2014; Brazil Ministry of Health, 2013).

Scores of non-UPF and UPF were created to evaluate regular weekly consumption of more than one of the groups and subgroups. The non-UPF score was calculated based on the regular weekly consumption of each of the four non-UPF groups ("fruits and vegetables," "rice and beans," "meat and eggs," and "fish"). The total non-UPF score ranged from 0–4, with 0 representing non-consumption of non-UPF and 4 representing regular consumption of the four non-UPF. The UPF score was calculated based on the regular intake of each of the three UPF subgroups ("sausages and other reconstituted meat products," "fast food dishes," and "packaged ready meals"). Total UPF score ranged from 0–3, with 0 representing non-consumption of UPF and 3 representing regular consumption of the three UPF subgroups weekly. Further, the scores were categorized into regular weekly consumption of two or more subgroups (yes/no).

Dietary diversity was described based on the daily consumption of 41 non-UPF items that were divided into nine food groups according to the Women's Dietary Diversity Score (not specific for pregnant women): "cereals," "white roots and tubers," "vegetables," "fruits," "organ meat," "meat and fish," "eggs," "legumes, nuts, and seeds," and "milk and milk products" (FAO, 2011).

Socio-demographic variables

The socio-demographic variables considered in this study were: age group (16–19 years old (yo), 20–29 yo, 30+ yo); ethnicity/skin color (non-white, white); per-capita family income (low, R\$259.54, SD = 179.59; middle, R\$814.51, SD = 162.55; high, 1725.11, SD = 689.09; created by dividing the total monthly household income by the number of residents, with 1 US dollar nearly 1.39 Brazilian currency); education level (complete middle school: 8 years; complete high school: 11 years; complete higher education: 15 years, including postgraduate); parity (number of parturition, continuous); and pre-gestational and gestational tobacco exposure (yes/no).

Data analysis

First, the population was described by their socio-demographic characteristics and according to regular consumption of dietary groups and subgroups. Crude and multiple logistic regression models were carried out to investigate the association between consumption of non-UPF and UPF (individually and aggregated in the scores) with socio-demographic variables. All socio-demographic

Table 1. Participant characteristics. PIPA, 2017 (n = 142).

Variables	n	%
Age (years)		
16–19	12	8.6
20–29	73	52.5
≥ 30	54	38.8
Ethnicity		
Non-white	108	76.1
White	34	23.9
Per-capita family income^a		
Low	49	38.0
Middle	50	38.8
High	30	23.3
Education^b		
Complete middle school	24	17.5
Complete high school	93	67.9
Complete higher education	20	14.6
Parity		
Primiparous	55	40.1
Multiparous	82	59.9

PIPA project: The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development.

^aPer capita household income divided into tertiles. Mean (range): first tertile (low) = R\$259.53 (R\$0 to R\$500); second tertile (middle) = R\$814.50 (R\$535.00 to R\$1,000.00); third tertile (high) = R\$1725.11 (R\$1017.50 to R\$4000.00). 1 US dollar corresponds to nearly 1.39 Brazilian currency.

^bComplete middle school: 8 years; complete high school: 11 years; complete higher education: 15 years including postgraduate.

variables were included in the adjusted model (age, ethnicity/skin color, family income, education level, and parity). Dietary diversity was described as a percentage of daily consumption of non-UPF according to the FAO guidelines for dietary diversity assessment. All statistical analyses were performed using *Stata Software* version 14.0 (Stata Corp., College Station, United States). The significance level was set to $p < 0.05$.

Results

Participant characteristics

Table 1 shows the characteristics of the participants. Women were mostly 20 yo or older (89%), with mean age of 28 years (SD = 6.9) and non-white (76%). About 17% of the women had a low education level (complete middle school), 68% completed high school, and 15% had a high education level (complete higher education). Most of them had low (38%) or middle (39%) per-capita family income and almost 60% of the women were multiparous (Table 1).

Dietary habits

More than 80% of the pregnant women reported regular consumption of all the non-UPF groups, except fish, in which the intake was reported by only 10% of individuals. Concerning the intake of UPF, most regular intakes came from

fast food dishes (42%) and sausages and other reconstituted meat products (40%). Regular consumption of packaged ready meals was reported by 20% of the women.

Table 2 shows the chance to consume each non-UPF subgroup regularly within socio-demographic variables. Pregnant women with complete high school education (odds ratio (OR), 5.36; 95% confidence interval (CI), 1.73–16.65) were more likely to report regular intake of “meat and eggs” and the higher level of education (OR, 5.04; 95% CI, 0.78–32.63) trended toward significance. Although not significant, the chance to report regular intake of “rice and beans” and “fruits and vegetables” was of great magnitude among 30+ yo women. Elevated ORs (≥ 1.60) were also observed for “fruit and vegetable” consumption and respondents with middle and high per-capita family income.

Regarding the regular intake of UPF subgroups, white women (OR, 2.63; 95% CI, 1.05–6.63) reported a higher chance of consuming “packaged ready meals”. Elevated, but not significant, associations were observed among respondents with complete higher education and “sausage and other reconstituted meat products” consumption whereas the older women reported a lower chance of consuming this subgroup and “packaged ready meals.” The consumption of “packaged ready meals” decreased across the increasing level of education. The older, less educated, and primiparous reported a higher consumption of “fast food dishes” (Table 3).

Figure 1 shows the percentage of participants that scored 0–4 in the non-UPF score and 0–3 in the UPF score. At least three non-UPF groups were regularly consumed by 61% of pregnant women and only 8% of participants reported regularly consuming the four non-UPF groups investigated. Over 27% of the women reported regular consumption of two UPF subgroups and 33% of at least one UPF subgroup during pregnancy. Although the multivariate models showed no significant differences, elevated ORs (≥ 2.80) to achieve a higher non-UPF score were observed among women 30+ yo, who were white with middle per-capita family income. Also, white and less educated women were more likely to achieve a higher UPF score (Table 4).

The diversity of the non-UPF fraction of the diet was another focus of the study, shown in Table 5. Only 25% of the participants reported consumption of at least four different food groups of the FAO guidelines. These groups were “starchy staples,” of which the consumption of rice was reported by 79% of participants; “other fruits and vegetables,” of which onions (33%), bananas (43%), and oranges (25%) were most frequently consumed; of “meat and fish,” chicken was the most frequently consumed (26%), followed by lean beef (5%). Few participants (2%) reported the intake of fish and the last most consumed group was “legumes, nuts, and seeds” mainly represented by beans 74%.

Discussion

This cross-sectional study of pregnant women assisted by public healthcare in Brazil shows that only 8% of the participants reported weekly consumption of all four non-UPF-groups investigated during pregnancy. We found a strong association of regular intake of “meat and eggs” among respondents with high school education. Although not significant, the non-UPF score presented a strong association with older, white, and middle per-capita family income women. Regarding UPF, the regular intake of “packaged ready meals” was significantly higher among white respondents. More than 40% of the women reported regular consumption of “sausages and other reconstituted meat products” and “fast food dishes” and consumption was higher among younger respondents, but not significantly. The weekly consumption of all three UPF subgroups investigated was reported by 4% of the women and was associated with white and less educated women, but not significantly. Besides, only 25% of the participants reported a diverse diet.

In a previous study, with a sample population similar to ours, the unprocessed or minimally processed food group represented 49% of total energy intake of pregnant women attending to public healthcare, but among UPF, the total energy intake represented 41% and cannot be disregarded (Alves-Santos et al., 2016). Gomes et al. (2019) described a high content of energy (67%) provided by maternal consumption of unprocessed or minimally processed food groups and lower energy intake from UPF (24.6%). Comparisons with our results should be made cautiously as we did not assess the UPF consumption through 24 h recall.

The weekly intake of at least two UPF subgroups (28%) and at least one UPF subgroup (33%) was most prominent. Considering the questionnaire was not specifically designed to classify food items according to the degree of processing, it may lead to underestimation of UPF consumption commonly consumed in Brazil, such as salty snacks, sweet biscuits, confectionaries, and sugar-sweetened beverages.

Interestingly, UPF consumption among pregnant Brazilian women seems to be higher than that in Brazilian adults and adolescents (Louzada et al., 2017). However, it is lower compared to the results described in high-income countries such as the United States (Rohatgi et al., 2017). The studies carried out in public health centers in Brazil reported that the UPF subgroups most consumed by pregnant women were cookies and ultra-processed sweets (27%), sugar-sweetened beverages (18.7%), and reconstituted meats (12.7%) in Botucatu (Gomes et al., 2019); and bread (9.9%), cakes, and cookies (5.6%), candies (5.4%), and fried/baked salted pastries (4.9%) in Rio de Janeiro (Alves-Santos et al., 2016).

We found a positive and statistically significant association of “packaged ready meals” with white women. It can potentially be explained by the fact that, in Brazil, ready meals are more expensive than meals prepared at

Table 3. Odds ratio of regular consumption of ultra-processed foods and socio-demographic variables among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil, PIPA, 2017 (n = 134).

Variable	Ultra-processed subgroups														
	Sausage and other reconstituted meat products ^a					Fast food dishes ^b					Packaged ready meals ^b				
	N (%)	OR	95% CI	OR	95% CI	N (%)	OR	95% CI	OR ^c	95% CI	N (%)	OR	95% CI	OR ^c	95% CI
Age range															
16–19	5 (42)	1.00	Ref	1.00	Ref	4 (33)	1.00	Ref	1.00	Ref	3 (25)	1.00	Ref	1.00	Ref
20–29	31 (42)	1.03	0.30–3.56	0.78	0.18–3.39	34 (47)	1.74	0.48–6.30	2.23	0.48–10.43	13 (18)	0.65	0.15–2.74	0.48	0.09–2.41
≥ 30	21 (39)	0.89	0.25–3.18	0.62	0.13–2.88	20 (37)	1.18	0.31–4.40	1.89	0.38–9.39	12 (22)	0.86	0.20–3.67	0.63	0.12–3.36
Ethnicity/skin color															
Non-white	42 (39)	1.00	Ref	1.00	Ref	45 (42)	1.00	Ref	1.00	Ref	17 (16)	1.00	Ref	1.00	Ref
White	15 (44)	1.24	0.57 – 2.70	1.16	0.51 – 2.64	13 (38)	0.87	0.39 – 1.91	0.92	0.41 – 2.10	11 (32)	2.56^d	1.05– 6.21	2.63^d	1.05 – 6.63
Per-capita family income															
Low	16 (33)	1.00	Ref	1.00	Ref	21 (43)	1.00	Ref	1.00	Ref	12 (24)	1.00	Ref	1.00	Ref
Middle	25 (50)	2.06	0.91 – 4.66	2.10	0.91– 4.83	21 (42)	0.96	0.43 – 2.14	0.99	0.44– 2.23	10 (20)	0.77	0.30– 1.99	0.87	0.32 – 2.35
High	12 (40)	1.37	0.53 – 3.53	1.17	0.41 – 3.30	12 (40)	0.89	0.35 – 2.24	0.93	0.34– 2.55	6 (20)	0.77	0.25 – 2.33	0.94	0.28 – 3.15
Education level															
Compl. middle school	7 (29)	1.00	Ref	1.00	Ref	11 (46)	1.00	Ref	1.00	Ref	7 (29)	1.00	Ref	1.00	Ref
Compl. high school	40 (43)	1.83	0.69 – 4.84	2.36	0.78 – 7.15	40 (43)	0.89	0.36 – 2.20	0.52	0.19– 1.40	18 (19)	0.58	0.21 – 1.61	0.48	0.16 – 1.42
Compl. higher education	10 (50)	2.43	0.70– 8.41	2.88	0.67– 12.31	7 (35)	0.64	0.19 – 2.15	0.38	0.09– 1.55	3 (15)	0.43	0.09– 1.94	0.30	0.05 – 1.67
Parity															
Primiparous	24 (44)	1.00	Ref	1.00	Ref	26 (47)	1.00	Ref	1.00	Ref	9 (16)	1.00	Ref	1.00	Ref
Multiparous	33 (40)	0.87	0.43– 1.74	1.21	0.55– 2.68	31 (38)	0.68	0.34 – 1.35	0.64	0.29– 1.41	19 (23)	1.54	0.64– 3.71	1.26	0.47– 3.36
Total	57 (40)					57 (42)					28 (20)				

PIPA Study, Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development; R: odds ratio; CI: confidence interval; Compl.: complete.

^a≥3 times/week.^b≥1 times/week.^cAdjusted to the remaining socio-demographic variables in the model.^dSignificance level set to $p < 0.05$.

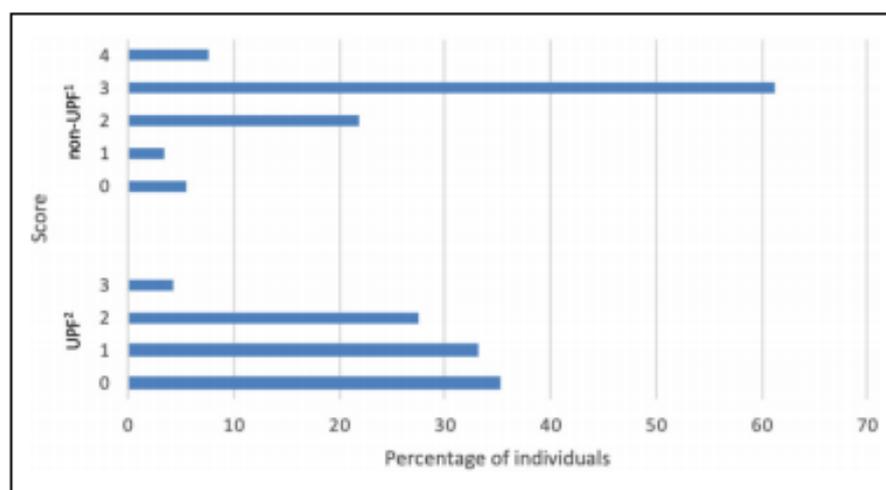


Figure 1. Percentage of pregnant women and weekly consumption of 0-4 non-processed groups (non-UPF Score) and of 0-3 ultra-processed subgroups (UPF Score). PIPA, 2017 (N=133). (1) Composed of non-ultra-processed-subgroups: "fruits and vegetables," "rice and beans," "meat and eggs" and "fish." (2) Composed of ultra-processed-subgroups: "sausages and other reconstituted meat products," "fast food dishes" and "packaged ready meals."

Table 4. Odds ratio of dietary scores and socio-demographic variables among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil. PIPA, 2017 (n = 133).

Variable	N (%)	Dietary scores								
		non-UPF score ^a				UPF score ^b				
		Crude	95% CI	Adjusted ^c	95% CI	Crude	95% CI	Adjusted ^c	95% CI	
Age (years)										
16 – 19	11 (92)	1.00	Ref	1.00	Ref	3 (25)	1.00	Ref	1.00	Ref
20 – 29	66 (90)	0.86	0.1–7.7	2.14	0.2–27.2	26 (36)	1.66	0.4–6.7	1.13	0.2–5.3
≥ 30	52 (96)	2.36	0.2–28.4	9.57	0.4–245.6	16 (30)	1.26	0.3–5.3	0.94	0.2–4.7
Ethnicity										
Non-white	96 (89)	1.00	Ref	1.00	Ref	31 (29)	1.00	Ref	1.00	Ref
White	33 (97)	4.10	0.5–32.9	2.88	0.3–26.2	14 (42)	1.74	0.8–3.9	1.84	0.8–4.2
Per-capita family income										
Low	43 (88)	1.00	Ref	1.00	Ref	18 (37)	1.00	Ref	1.00	Ref
Middle	48 (96)	3.35	0.6–17.5	3.32	0.6–18.4	16 (32)	0.81	0.3–1.9	0.88	0.4–2.1
High	30 (100)	–	–	–	–	9 (30)	0.74	0.3–1.9	0.85	0.3–2.4
Education										
Compl. middle school	23 (96)	1.00	Ref	1.00	Ref	8 (33)	1.00	Ref	1.00	Ref
Compl. high school	86 (92)	0.53	0.1–4.6	0.63	0.1–5.9	32 (34)	1.05	0.4–2.7	0.78	0.3–2.1
Compl. higher education	20 (100)	–	–	–	–	5 (25)	0.67	0.2–2.5	0.51	0.1–2.3
Parity										
Primiparous	53 (96)	1.00	Ref	1.00	Ref	17 (31)	1.00	Ref	1.00	Ref
Multiparous	75 (91)	0.40	0.1–2.1	0.35	0.0–2.3	28 (34)	1.16	0.6–2.4	1.21	0.5–2.8
Total	129 (91)					45 (32)				

PIPA project, The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development; OR: odds ratio; CI: confidence interval; compl: complete; ref: reference.

^aRegular consumption of ≥1 group weekly.

^bRegular consumption of ≥1 subgroup weekly.

^cAdjusted to for the remaining socio-demographic variables in the model.

home (Claro et al., 2016), and non-white women are more vulnerable and spend more time in domestic work than men and white women (IBGE, 2018). Additionally, the regular consumption of "sausages and other reconstituted meat

products" showed a positive but not significant association with middle income and education in a dose-response manner. Other authors described the consumption of UPF differently according to socio-demographic status, younger women, with

Table 5. Daily non-ultra-processed food intake according to FAO major food groups for dietary diversity assessment. PIPA, 2017 ($n = 133$).

Food groups	n	(%)
Group 1 – starchy staples		
Cereals		
Rice	105	79.5
Wholegrain rice	7	5.3
Corn	3	2.3
White roots and tubers		
Potato	18	13.6
Cassava	2	1.6
Group 2 – dark green leafy vegetables		
Kale	9	6.8
Broccoli	3	2.3
Group 3 – Vitamin A rich vegetables and fruits		
Vitamin A rich vegetables and tubers		
Carrot	20	15.1
Pumpkin	5	3.8
Vitamin A rich fruits		
Mango	9	6.8
Papaya	7	5.3
Passion Fruit	2	1.5
Group 4 – Other fruits and vegetables		
Other vegetables		
Onion	43	32.6
Sweet pepper	22	16.5
Lettuce	15	11.3
Cucumber	6	4.6
Cabbage	5	3.8
Zucchini	4	3
Cauliflower	3	2.3
Okra	3	2.3
Other fruits		
Banana	57	42.8
Orange	33	24.8
Apple	22	16.5
Grape	10	7.7
Strawberry	7	5.4
Watermelon	7	5.3
Melon	6	4.7
Group 5 – Organ meat		
Liver, heart, tongue	6	4.4
Group 6 – Meat and fish		
Flesh meats		
Chicken	34	26.0
Chicken with skin	2	1.6
Lean beef	7	5.4
Fat beef	3	2.3
Pork	1	0.8
Fish and seafood		
Sardine	1	0.8
Salmon	1	0.8
Seafood	0	0
Group 7 – Eggs		
Eggs	27	20.3
Group 8 – Legumes, nuts and seeds		
Beans	99	74.5
Peas	1	0.8
Group 9 – Milk and milk products*		

PIPA project: The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development.

*Not included in the questionnaire.

a lower education level, and white had the highest percentage of energy coming from UPFs (Gomes et al., 2019).

Our results support previous studies showing that maternal socio-demographic characteristics can influence diet during pregnancy (Alves-Santos et al., 2016; Shapiro et al., 2016; Gomes et al., 2019). A study of American pregnant women ($n = 200$) found regular consumption (1–3 times per week) of ultra-processed desserts (37%), canned food (29%), and fast foods (26%). The income was inversely correlated with canned food consumption, suggesting that women of low socioeconomic status may be at risk (Santiago et al., 2013). In Brazil, better socioeconomic status is likely to provide healthier eating behavior during pregnancy with higher consumption of legumes, vegetables, and fruits (de Castro et al., 2016).

The direct relationships between UPF consumption and gestational weight gain, as well as neonatal outcomes (e.g., body fat percentage), have been demonstrated in a sample of American pregnant women (Rohatgi et al., 2017). Although health outcomes were not evaluated in this study, a considerable part of the studied pregnant women may be at risk given their regular consumption of the UPF. It also goes against the Brazilian Ministry of Health (2013) recommendations for a healthy diet during pregnancy for mother and fetus wellbeing and to avoid complications during pregnancy, childbirth, and development (Brazil Ministry of Health, 2013).

Furthermore, the Brazilian Dietary Guidelines recommend that most of the dietary intake must come from a variety of fresh and minimally processed foods (Brazil Ministry of Health, 2014). It is relevant considering that higher and diverse dietary share of fresh and minimally processed foods is related to micronutrient adequacy (Nguyen et al., 2018), positive pregnancy outcomes and child health (Zerfu et al., 2016). Dietary diversity and maternal pre-pregnancy BMI have been inversely correlated in a US pregnancy cohort. Nevertheless, only 25% of the participants in our study reported consumption of at least four different food groups. Zerfu et al. (2016) described the daily intake of at least four food groups as a cutoff of adequate micronutrient intake. Another study reported a cutoff of six food groups as the correct classification for dietary micronutrient adequacy during pregnancy (Nguyen et al., 2018).

This scenario calls for interventions aiming to reduce UPF consumption and to improve dietary diversity among pregnant women. Gomes et al. (2019) described a positive impact of training healthcare professionals to discourage the consumption of soft drinks and industrially processed cookies and encouraging the consumption of fruits, vegetables, and beans (Gomes et al., 2019). Pregnancy is considered a more accessible time for professionals to communicate the importance of healthy eating to women (Shapiro et al., 2016). Moreover, actions aiming at increasing the healthiness of food environments, by pricing interventions, improving food labeling, limiting promotion and advertising of UPF, and increasing the availability of

unprocessed and minimally processed foods would bring benefits for the whole population (Popkin, 2020).

Potential limitations of our study should be considered. The population size of the survey did not guarantee high statistical power and some potential differences could not reach statistical significance, even though some socio-demographic variables such as age, skin color, and education level exerted a great magnitude of association. Besides, this is a cross-sectional analysis that can account for underreporting and recall bias and the dietary changes due to pregnancy must also be dissembled. Another potential limitation is that the diet module is not a complete dietary assessment, which may lead to misestimation of either non-UPF or UPF consumption and dietary diversity. However, other authors have used non-complete dietary assessment before (Santiago et al., 2013). Also, the FFQ has not been validated. Nevertheless, this study deserves appreciation for being innovative in assessing both food intake according to the degree of food processing and dietary diversity of the non-UPF fraction of the diet during pregnancy. The use of the NOVA system is a key strength, as it has been considered the most specific, coherent, and comprehensive food classification system based on food processing (Moubarac et al., 2014), as well as a relevant approach for linking dietary intakes and all forms of malnutrition (FAO, 2016). It is important to highlight that, different from other studies on dietary diversity, our study was applied considering only the non-UPF fraction of the diet, befitting from the Brazilian Dietary Guidelines recommendations. Also, these results will inform future analysis of infants' microbiome in the PIPA project.

In conclusion, our study showed that despite most of the pregnant women reporting regular intake of non-UPF groups, only a quarter of the individuals reported a diverse diet. Additionally, more than one-third reported weekly consumption of at least two UPFsubgroups. A positive association was observed between education level and regular intake of "meat and eggs." Besides, white pregnant women had reported higher consumption of "packaged ready meals." Our findings suggest that food consumption during pregnancy may differ according to sociodemographic factors. Healthier maternal eating should be encouraged, given the window of opportunity to improve dietary quality during pregnancy for the long-term benefits for both mothers and their children.

Notes

If requested, the corresponding author will fully cooperate in obtaining and providing full access to all aspects of the research and writing process and take ultimate responsibility for the paper.

Acknowledgments

The authors are grateful to the pregnant women who participated in this study, to the Maternity School of the Federal University of Rio de Janeiro for their technical and logistical assistance, and the Oswaldo Cruz Foundation and

Federal University of Rio de Janeiro for their research support.

Author contributions

NFN and PPM: Conceptualization, formal analyses, and writing the original draft. AM: Methodology. JCM and AM: Supervision, reviewing, and editing. CIRFA and VC: Project administration and funding acquisition.

Consent for publication

All authors have reviewed, approved, and consent the final version for publication.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Ethical statement

This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures involving research study participants were approved by the Researches Ethics Committees of the Maternity School (number: 2.092.440) and the Oswaldo Cruz Foundation (number: 2.121.397). All pregnant women over 16 yo who attended the Maternity School visit for delivery orientation were recruited with informed consent.

Funding

This work was carried out under a pilot study of the "Prospective Study Project of Environmental Pollutants Exposure and Children's Health – Birth Cohort" funded by the Pan American Health Organization (TC 69 - SCON2018-00192) and by the Brazilian Ministry of Health. NFN received a doctoral scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; CGC 00.889.834/0001-08). The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

ORCID ID

Nathalia Ferrazzo Naspolini  <https://orcid.org/0000-0002-0768-3284>

References

- Asmus CIRF, Barbosa AP, Meyer A, et al. (2020) Rio Birth Cohort Study on Environmental Exposure and Childhood Development: PIPA Project. *Ann Glob Health* 86(1): 59.
- Alves-Santos NH, Eshriqui I, Franco-Sena AB, et al. (2016) Dietary intake variations from pre-conception to gestational period according to the degree of industrial processing: A Brazilian cohort. *Appetite* 105: 164–171.
- Baker P, Machado P, Santos T, et al. (2020) Ultra-processed foods and the nutrition transition: Global, regional and national

- trends, food systems transformations and political economy drivers. *Obes Rev*: 1–22.
- Claro RM, Maia EG, Costa BV, et al. (2016) Food prices in Brazil: Prefer cooking to ultra-processed foods. *Cad Saude Publica* 32(8).
- de Castro MB, Freitas Vilela AA, de Oliveira AS, et al. (2016) Sociodemographic characteristics determine dietary pattern adherence during pregnancy. *Public Health Nutr* 19(7): 1245–1251.
- Elizabeth L, Machado P, Zinöcker M, et al. (2020) Ultra-processed foods and health outcomes: a narrative review. *Nutrients* 12(7).
- FAO (2010) *Report of the joint FAO/WHO expert consultation on the risks and benefits of fish consumption*. Rome: FAO.
- FAO (2011) *Guidelines for measuring household and individual dietary diversity*. Rome: FAO.
- FAO (2016) *Plates, pyramids, planet. Developments in national healthy and sustainable dietary guidelines: A state of play assessment*. University of Oxford: FAO.
- Gomes CB, Malta MB, Louzada MLDC, et al. (2019) Ultra-processed food consumption by pregnant women: The effect of an educational intervention with health professionals. *Matern Child Health J* (23): 692–703.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2018) *Estatísticas de Gênero: Indicadores sociais das mulheres no Brasil*. Rio de Janeiro: IBGE.
- Kelly B and Jacoby E (2018) Public Health Nutrition special issue on ultra-processed foods. *Public Health Nutr* 21(1): 1–4.
- Koletzko B, Brands B, Poston L, et al. (2012) Early nutrition programming of long-term health. *Proc Nutr Soc* 71(3): 371–378.
- Kornatowski BM and Comstock SS. (2018) Dietary diversity is inversely correlated with pre-pregnancy body mass index among women in a Michigan pregnancy cohort. *Peer J* 6: e5526.
- Louzada MLDC, Ricardo CZ, Steele EM, et al. (2017) The share of ultra-processed foods determines the overall nutritional quality of diets in Brazil. *Public Health Nutr* 21(1): 94–102.
- Martins AP, Levy RB, Claro RM, et al. (2013) Increased contribution of ultra-processed food products in the Brazilian diet (1987–2009). *Rev Saude Publica* 47(4): 656–665.
- Ministry of Health of Brazil (2013) *Instructive manual of the actions on food and nutrition in "Rede Cegonha"*. Brazil: Ministry of Health of Brazil.
- Ministry of Health of Brazil (2014) *Dietary Guidelines for the Brazilian Population*. Brazil: Ministry of Health of Brazil.
- Monteiro CA, Cannon G, Levy RB, et al. (2019) Ultra-processed foods: What they are and how to identify them. *Public Health Nutr* 22(5): 936–941.
- Monteiro CA, Cannon G, Moubarac JC, et al. (2018) The UN Decade of Nutrition, the NOVA food classification and the trouble with ultra-processing. *Public Health Nutr* 21(1): 5–17.
- Moubarac JC, Parra DC, Cannon G, et al. (2014) Food classification systems based on food processing: Significance and implications for policies and actions: A systematic literature review and assessment. *Curr Obes Rep* 3(2): 256–272.
- NCD Risk Factor Collaboration (2017) Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: A pooled analysis of 2416 population-based measured studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet* 390(10113): 2627–2642.
- Nguyen PH, Huybregts L, Sanghvi TG, et al. (2018) Dietary diversity predicts the adequacy of micronutrient intake in pregnant adolescent girls and women in Bangladesh, but use of the 5-group cutoff poorly identifies individuals with inadequate intake. *J Nutr* 148(5): 790–797.
- Ojha S, Robinson L, Symonds ME, et al. (2013) Suboptimal maternal nutrition affects offspring health in adult life. *Early Hum Dev* 89(11): 909–913.
- Popkin B (2020) Ultra-processed foods' impacts on health. 2030 – Food, Agriculture and rural development in Latin America and the Caribbean, No. 34. Santiago de Chile: FAO.
- Rohatgi KW, Tinius RA, Cade WT, et al. (2017) Relationships between consumption of ultra-processed foods, gestational weight gain and neonatal outcomes in a sample of US pregnant women. *Peer J* 5: e4091.
- Santiago SE, Park GH and Huffman KJ. (2013) Consumption habits of pregnant women and implications for developmental biology: A survey of predominantly Hispanic women in California. *Nutr J* 12: 91.
- Shapiro AL, Kaar JL, Crume TL, et al. (2016) Maternal diet quality in pregnancy and neonatal adiposity: The Healthy Start Study. *Int J Obes (Lond)* 40(7): 1056–1062.
- Zerfu TA, Umata M and Baye K (2016) Dietary diversity during pregnancy is associated with reduced risk of maternal anemia, preterm delivery, and low birth weight in a prospective cohort study in rural Ethiopia. *Am J Clin Nutr* 103(6): 1482–1488.

6. O CONSUMO MATERNO DE ALIMENTOS ULTRAPROCESSADOS E AS CONCENTRAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS PERFLUOROALQUILADAS EM AMOSTRAS DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL.

Este capítulo apresenta a comunicação breve “Maternal consumption of ultra-processed foods and newborn exposure to perfluoroalkyl substances (PFAS): Rio Birth Cohort Study on Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA Project)” que será submetida para publicação no periódico Cadernos de Saúde Pública.

Maternal consumption of ultra-processed foods and newborn exposure to perfluoroalkyl substances (PFAS): Rio Birth Cohort Study on Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA Project).

Author's names: Nathalia Ferrazzo Naspolini¹, Priscila Pereira Machado², Josino Costa Moreira³, Armando Meyer⁴

¹Brazilian School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

²Institute for Physical Activity and Nutrition, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia

³Center for the Studies on Workers' Health and Human Ecology, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴Public Health Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Abstract

Evolving evidence has shown that ultra-processed food (UPF) consumption may increase exposure to chemicals used in food packaging and production, such as per- and poly-fluoroalkyl substances, phthalates, and bisphenols. Studies have suggested that these contaminants may be transferred from mother to child across the placenta, increasing concerns for both maternal and child health. This study aimed to investigate the association of maternal consumption of UPFs with newborn exposure to perfluoroalkyl substances (PFAS) in the PIPA birth cohort. A pilot cohort study conducted with 142 pregnant women and their newborns in a Public Maternity School in Rio de Janeiro, Brazil was assessed. Maternal dietary intake in the third trimester of pregnancy was evaluated using a qualitative food frequency questionnaire. Food items were classified as non-UPF and UPF using the NOVA system and regular consumption of UPFs was estimated. The PFAS were determined on umbilical cord blood. Newborns of pregnant women who consumed three or more subgroups of UPF weekly presented the highest level of PFAS (2.51 ng/mL; SD 1.64), compared to consumption of zero or one UPF subgroup (0 UPF=1.67 ng/mL; SD 1.12 and 1 UPF=1.88 ng/mL; SD 1.15). A dose-response effect trended toward significance (p for trend was 0.059). Additionally, cluster analysis grouped UPF, fish, and PFAS levels. In conclusion, it was found increased levels of PFAS in newborns whose mothers were higher consumers of UPFs.

Keywords: Food processing; pregnancy; contaminants; exposure assessment; endocrine disruptors

Introduction

Ultra-processed foods are becoming dominant in diets globally (BAKER; MACHADO; SANTOS; SIEVERT *et al.*, 2020). These are formulations manufactured from substances derived from foods (e.g. oils, sugars, starches, hydrogenated oil, high fructose corn syrup, protein isolates, and other chemically altered ingredients), with little if any whole food and typically including flavors, colors, and other cosmetic additives (MONTEIRO; CANNON; LEVY; MOUBARAC *et al.*, 2019). Evidence for the health implications of ultra-processing is rapidly building, and adverse health outcomes associated with their consumption include obesity, cardiovascular diseases, cancer, and mortality (ELIZABETH; MACHADO; ZINOCKER; BAKER *et al.*, 2020; LANE; DAVIS; BEATTIE; GOMEZ-DONOSO *et al.*, 2021). Some of these studies have hypothesized that exposure to endocrine-disrupting chemicals may be a pathway by which UPFs are linked to adverse health outcomes since UPFs are often packaged in synthetic materials containing chemicals such as bisphenol-A and phthalates (BUCKLEY; KIM; WONG; REBHOLZ, 2019; MARTINEZ STEELE; KHANDPUR; DA COSTA LOUZADA; MONTEIRO, 2020).

There is growing interest in how maternal diet and lifestyle factors during the fetal period are related to long-lasting fetal programming and affect the risk of non-communicable diseases in adulthood (KOLETZKO; BRANDS; POSTON; GODFREY *et al.*, 2012; OJHA; ROBINSON; SYMONDS; BUDGE, 2013). Of particular concern, maternal dietary contaminants may be transferred from mother to child across the placenta, increasing concerns for both maternal and child health (FILARDI; PANIMOLLE; LENZI; MORANO, 2020; PHILIPS; JADDOE; TRASANDE, 2017).

Brazilian studies have found high consumption of UPFs among pregnant women (ALVES-SANTOS; ESHRIQUI; FRANCO-SENA; COCATE *et al.*, 2016; NASPOLINI; MACHADO; FROES-ASMUS; CAMARA *et al.*, 2020). A previous study using data from The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development found that more than one-third of women reported weekly consumption of UPFs like sausages and other reconstituted meat, fast foods, and packaged ready meals (NASPOLINI; MACHADO; FROES-ASMUS; CAMARA *et al.*, 2020). Higher maternal exposure to phthalates has been associated with higher fetal exposure to these compounds and child's metabolic dysfunction (ASHLEY-MARTIN; DODDS; ARBUCKLE; ETTINGER *et al.*, 2014). Nevertheless, it is unknown how maternal diet is associated with child's exposure to contaminants commonly presented in UPFs.

This study aimed to investigate the association of maternal consumption of UPFs with newborn exposure to perfluoroalkyl substances (PFAs) in the PIPA birth cohort.

Methodology

Data from a pilot cohort study conducted in a Public Maternity School in Rio de Janeiro, Brazil, involving 131 pregnant women-child pairs were assessed. Briefly, women during the third trimester of pregnancy were enrolled in a birth cohort study (The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development) to investigate the effects of environmental pollutants on maternal-child health. Data on socio-demographics (family income, education, ethnicity, and age), diet, smoking and alcohol habits, drug consumption, physical activity, and other information were collected between October 2017 and August 2018 by trained interviewers using broader questionnaires. Additional information on the study population can be found elsewhere (ASMUS; BARBOSA; MEYER; DAMASCENO *et al.*, 2020). The population in the present investigation included 118 mothers over 16 years of age, who informed free consent for participation in this study, had data on diet assessed and, cord blood samples suitable for analysis.

Dietary intake was evaluated using a qualitative food frequency questionnaire, and all food items were categorized according to the degree of industrial processing using the NOVA system (MONTEIRO; CANNON; LEVY; MOUBARAC *et al.*, 2019). Of particular interest for this study, maternal regular consumption of UPF was estimated by the consumption of sausage and other reconstituted meat products (≥ 3 times/week), fast food dishes (≥ 1 time/week), and packaged ready meals (≥ 1 time/week) (other UPF subgroups were not assessed in the cohort). Regular consumption of non-UPFs (≥ 5 times/week for fruits, vegetables, rice, and beans; and ≥ 3 times/week for meats, eggs, and fish) was also calculated.

Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) were determined in the 118 umbilical cord blood samples. Serum samples were stored at -40°C in polypropylene bottles and the triple quadrupole mass spectrometer with an API 3200 electrospray source (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used to detect the analytes, using a method adapted from Kuklennyik and colleagues. At these conditions, the observed retention times were 6.9 minutes for PFOA, and 7.5 and 7.9 for PFOS. Due to the low detection rate of PFOA found in this population (16.1%) leading to a small sample size within the UPF

consumption strata, we will present PFAS, comprising of the sum concentration of PFOA and PFOS.

Mean PFAS levels (in ng/mL) in umbilical cord blood were estimated according to maternal UPF consumption (0, 1, 2, or 3 subgroups consumed regularly). One-way ANOVA test was used to analyze the differences among means, with $p < 0.05$ indicative of statistical significance. The dose relationship was analyzed by Jonckheere's trend test. K-means clustering method was applied to identify how individual food subgroups ($n=11$) consumed during pregnancy were grouped with cord PFAS levels. The optimal number of clusters was found using the `fviz_nbclust` function (R software).

Results

Among the 131 pregnant women involved in The Rio Birth Cohort Study, over 25% of them reported regular consumption of at least two UPF subgroups (NASPOLINI; MACHADO; FROES-ASMUS; CAMARA *et al.*, 2020). We found a high detection rate of PFOS (67,8%) in this population. Pregnant women who consumed regularly three or more subgroups of UPF presented the highest level of PFAS (0 UPF=1.67 ng/mL; 95% CI 1.24-2.10 and 1 UPF=1.88 ng/mL; 95% CI 0.74-1.62). Trend test on means showed a significant dose-response for both PFAS ($P = 0.059$) and PFOS 0.021 (Table 1).

Table one

Also, two distinct clusters were derived from cluster analysis: one grouping all UPF subgroups and fish consumed during pregnancy and PFAS in umbilical cord blood; and another grouping all other non-UPF subgroups (Figure 1A). Similar grouping was found when including PFOA and PFOS separately (Figure 1B and C).

Figure one

Discussion

In this longitudinal birth cohort study of pregnant women-child pairs assisted by public health care in Brazil, we evaluated the association between maternal consumption of UPFs and PFAS umbilical cord blood levels. We found increased PFAS concentration in umbilical cord blood of newborns whose mothers were higher consumers of UPFs during the third trimester

of pregnancy. Also, cluster analysis grouped UPFs and fish with PFAS. To our knowledge, this is the first study to quantify relationships between ultra-processed food consumption and PFAS exposures in a cohort of mother-child.

Chemicals used in food packaging and production, such as PFAS, phthalates, and bisphenols, and UPFs have been previously associated with several cardiometabolic adverse outcomes (AGENCY); ELIZABETH; MACHADO; ZINOCKER; BAKER *et al.*, 2020; LANE; DAVIS; BEATTIE; GOMEZ-DONOSO *et al.*, 2021; RADKE; GALIZIA; THAYER; COOPER, 2019; RANCIÈRE; LYONS; LOH; BOTTON *et al.*, 2015; ROSENMAI; TAXVIG; SVINGEN; TRIER *et al.*, 2016; SHOSHTARI-YEGANEH; ZAREAN; MANSOURIAN; RIAHI *et al.*, 2019). Two recent cross-sectional studies using nationally representative sample data of the US population found associations between UPF consumption and urinary concentrations of phthalates and bisphenol (BUCKLEY; KIM; WONG; REBHOLZ, 2019; MARTINEZ STEELE; KHANDPUR; DA COSTA LOUZADA; MONTEIRO, 2020). Findings suggest the possibility of contact materials in UPFs as one link between UPF and these health outcomes. Besides, the American Environmental Protection Agency reports that living organisms including fish, in addition to food packing, are a potential source for PFAS exposure. Owing to the potential of these chemicals to bioaccumulate and biomagnify in the food chain (BOISVERT; SONNE; RIGÉT; DIETZ *et al.*, 2019).

Maternal exposure to contaminants during pregnancy is of concern due to its potential negative impact on both maternal and child health (FILARDI; PANIMOLLE; LENZI; MORANO, 2020; PHILIPS; JADDOE; TRASANDE, 2017). Infants are particularly vulnerable to such threats because their metabolic system is still developing and key organ maturation is susceptible to permanent and lifelong disruption, including via stressors on the early-life gut microbiota (UNICEF, 2019).

Potential limitations of our study should be considered. The population size of the survey did not guarantee high statistical power and some potential differences could not reach statistical significance. The diet module is not a complete dietary assessment, which inherently leads to an underestimation of UPF consumption. Nevertheless, this study deserves appreciation for being innovative in assessing the role of UPF consumption in maternal-child transferability of contaminants. Future studies could confirm findings and further explore these mechanisms of

action. A follow-up in a cohort of children could help determine how the observed associations manifest in childhood.

In conclusion, it was found increased levels of PFAS in newborns whose mothers were higher consumers of UPFs, and cluster analysis grouped UPFs and fish with PFAS cord levels. Considering all the harms associated with UPF consumption, including increased exposure to endocrine-disruptor chemicals, and showed in this study, the consumption of UPFs should be discouraged.

References

1. Baker P, Machado P, Santos T, Sievert K, Backholer K, Hadjidakou M, et al. Ultra-processed foods and the nutrition transition: Global, regional and national trends, food systems transformations and political economy drivers. *Obes Rev.* 2020;21(12):e13126.
2. Monteiro CA, Cannon G, Levy RB, Moubarac JC, Louzada ML, Rauber F, et al. Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. *Public Health Nutr.* 2019;22(5):936-41.
3. Lane MM, Davis JA, Beattie S, Gomez-Donoso C, Loughman A, O'Neil A, et al. Ultraprocessed food and chronic noncommunicable diseases: A systematic review and meta-analysis of 43 observational studies. *Obes Rev.* 2021;22(3):e13146.
4. Elizabeth L, Machado P, Zinocker M, Baker P, Lawrence M. Ultra-Processed Foods and Health Outcomes: A Narrative Review. *Nutrients.* 2020;12(7).
5. Martinez Steele E, Khandpur N, da Costa Louzada ML, Monteiro CA. Association between dietary contribution of ultra-processed foods and urinary concentrations of phthalates and bisphenol in a nationally representative sample of the US population aged 6 years and older. *PLoS One.* 2020;15(7):e0236738.
6. Buckley JP, Kim H, Wong E, Rebholz CM. Ultra-processed food consumption and exposure to phthalates and bisphenols in the US National Health and Nutrition Examination Survey, 2013-2014. *Environ Int.* 2019;131:105057.
7. Ojha S, Robinson L, Symonds ME, Budge H. Suboptimal maternal nutrition affects offspring health in adult life. *Early Hum Dev.* 2013;89(11):909-13.
8. Koletzko B, Brands B, Poston L, Godfrey K, Demmelmair H, Project EN. Early nutrition programming of long-term health. *Proc Nutr Soc.* 2012;71(3):371-8.
9. Philips EM, Jaddoe VWV, Trasande L. Effects of early exposure to phthalates and bisphenols on cardiometabolic outcomes in pregnancy and childhood. *Reprod Toxicol.* 2017;68:105-18.
10. Filardi T, Panimolle F, Lenzi A, Morano S. Bisphenol A and Phthalates in Diet: An Emerging Link with Pregnancy Complications. *Nutrients.* 2020;12(2).
11. Napolini NF, Machado PP, Froes-Asmus CIR, Camara VM, Moreira JC, Meyer A. Food consumption according to the degree of processing, dietary diversity and socio-demographic factors among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil: The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA project). *Nutr Health.* 2020;260106020960881.
12. Alves-Santos NH, Eshriqui I, Franco-Sena AB, Cocate PG, Freitas-Vilela AA, Benaim C, et al. Dietary intake variations from pre-conception to gestational period according to the degree of industrial processing: A Brazilian cohort. *Appetite.* 2016;105:164-71.
13. Ashley-Martin J, Dodds L, Arbuckle TE, Ettinger AS, Shapiro GD, Fisher M, et al. A birth cohort study to investigate the association between prenatal phthalate and bisphenol A exposures and fetal markers of metabolic dysfunction. *Environ Health.* 2014;13:84.
14. Asmus CIRF, Barbosa AP, Meyer A, Damasceno N, Rosa ACS, Medronho R, et al. Rio Birth Cohort Study on Environmental Exposure and Childhood Development - PIPA Project. *Ann Glob Health.* 2020;86(1):59.
15. Rancière F, Lyons JG, Loh VH, Botton J, Galloway T, Wang T, et al. Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence. *Environ Health.* 2015;14:46.
16. Radke EG, Galizia A, Thayer KA, Cooper GS. Phthalate exposure and metabolic effects: a systematic review of the human epidemiological evidence. *Environ Int.* 2019;132:104768.

17. Shoshtari-Yeganeh B, Zarean M, Mansourian M, Riahi R, Poursafa P, Teiri H, et al. Systematic review and meta-analysis on the association between phthalates exposure and insulin resistance. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(10):9435-42.
18. Rosenmai AK, Taxvig C, Svingen T, Trier X, van Vugt-Lussenburg BM, Pedersen M, et al. Fluorinated alkyl substances and technical mixtures used in food paper-packaging exhibit endocrine-related activity in vitro. *Andrology*. 2016;4(4):662-72.
19. US EPA. Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS). In: PFAS ECo, editor. Washington DC: United States Environmental Protection Agency.
20. Boisvert G, Sonne C, Rigét FF, Dietz R, Letcher RJ. Bioaccumulation and biomagnification of perfluoroalkyl acids and precursors in East Greenland polar bears and their ringed seal prey. *Environ Pollut*. 2019;252(Pt B):1335-43.
21. UNICEF. The State of the World's Children 2019. Children, Food and Nutrition: Growing well in a changing world. New York 2019.

Table 1. Mean PFAS levels in umbilical cord blood according to maternal UPF consumption. PIPA Project, 2017–2018, Rio de Janeiro/Brazil.

Regular consumption of UPF	N	PFAS Mean (SD)	N	PFOA Mean (SD)	N	PFOS Mean (SD)
0 subgroup	29	1.67 (1.12)	7	0.88 (0.65)	28	1.54 (1.01)
1 subgroups	29	1.88 (1.15)	4	0.36 (0.30)	29	1.87 (1.08)
2 subgroups	19	2.48 (1.43)	7	0.69 (0.44)	19	2.23 (1.10)
3 subgroups	6	2.51 (1.64)	-	-*	4	1.82 (0.97)
Total	81	1.98 (1.25)	19	0.80 (0.69)	80	1.84 (1.07)
P-value ¹	-	0.132	-	0.007	-	0.193
P-value for trend ²	-	0.059	-	0.736	-	0.021

*Data not show, $n = 1$.

PFAS limits of detection: PFOA: 0.07 ng/mL; PFOS: 0.24 ng/mL

¹One-way ANOVA

²Jonckheere Trend Test

Figure 1

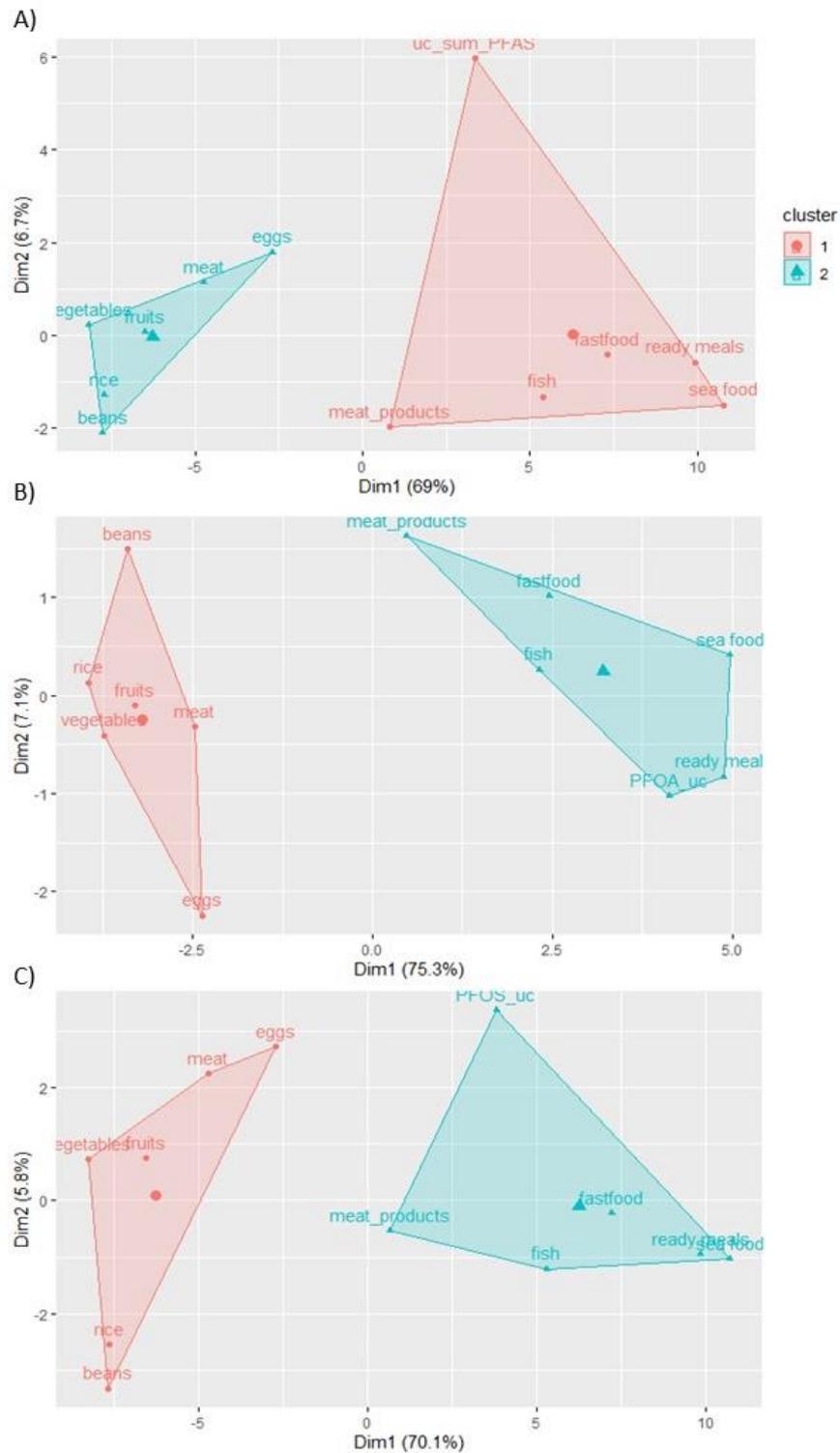


Figure 1. K means cluster analysis of regularly consumed food groups during pregnancy and (A) PFAS levels in umbilical cord blood (B) PFOA levels in umbilical cord blood and (C) PFOS levels in umbilical cord blood. Dim, dimension; Meat products: sausage and other reconstituted meat products; Ready meals: packaged ready meals; Fast-food: fast food dishes.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo trouxe resultados inéditos e robustos sobre a exposição a poluentes ambientais e sua influência na microbiota intestinal no início da vida. Uma ampla quantidade de poluentes foi investigada e a análise da microbiota foi realizada com apoio de uma equipe de reconhecimento internacional e a técnica empregada é considerada padrão ouro para descrever a composição de comunidades microbianas. Além disso, os achados são oriundos da população brasileira, ainda não investigada quanto ao efeito da exposição a poluentes ambientais na microbiota.

Nossa hipótese inicial, que a exposição a poluentes ambientais altera o microbioma humano em desenvolvimento foi confirmada. Não somente, o efeito da exposição a poluentes é agravado quando associado a fatores estressores do início da vida como, parto cesariano, prematuridade e exposição indireta a antibióticos. Nossos achados mostram também que o aleitamento materno exclusivo influenciou no efeito dos poluentes ambientais, o que pode sugerir contaminação deste alimento tão importante no início da vida. Mas conclusões devem ser tomadas com cautela, uma vez que não dosamos a concentrações de poluentes no leite materno. Além disso, o número de bebês no seguimento foi reduzido, o que limita a robustez desta associação. De toda forma, os resultados deste estudo confirmam que a exposição a poluentes pode apresentar um risco ao processo de desenvolvimento da microbiota humana o que pode ter importância para a saúde mais tarde na vida.

As evidências apresentadas no capítulo 5, de um alto consumo semanal de alimentos ultra processados por gestantes e no capítulo 6, que relaciona o consumo destes alimentos a uma maior exposição a determinados poluentes ambientais possuem implicações para a saúde pública. Já é comprovado que o consumo de alimentos ultraprocessados está relacionado com inúmeras doenças devido ao seu conteúdo nutricional desbalanceado. Somado a isso, vem crescendo o número de evidências que atribuem, pelo menos em parte, estes efeitos adversos às substâncias químicas oriundas do processamento, manufatura e contato com embalagens. Como discutido individualmente nos capítulos, o resultado que apresentamos do consumo de ultraprocessados está possivelmente subestimado, pois o questionário empregado apenas nos possibilitou aferir o consumo de alguns grupos destes alimentos e não o consumo total. Tal limitação evidencia a necessidade de estudos que avaliem o consumo destes alimentos, com uso de Recordatório Alimentar de 24h, e dos níveis biológicos de PFAS e outras substâncias como bisfenóis e ftalatos.

Frente ao exposto, esta tese apresenta um conjunto de informações inéditas, de que poluentes ambientais alteram o microbioma humano em desenvolvimento e que o consumo de alimentos ultraprocessados é uma via potencialmente importante de exposição a essas substâncias.

REFERÊNCIAS

AGENCY), E. U. S. E. P. Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS). PFAS, E. C. O. Washington DC: United States Environmental Protection Agency.

ALMEIDA, G. L.; SCHMITT, G. C.; BAIRROS, A. V.; EMANUELLI, T. *et al.* Os riscos e danos nas intoxicações por paraquat em animais domésticos. **Ciência Rural**, 37, n. 5, p. 1506-1512, 2007.

ALMEIDA, T. N. D. **Contaminação por agrotóxicos carbamatos e organofosforados em água para consumo humano de Dourados, MS, 2008 a 2009** 2010. 111 f. -, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Campo Grande.

ALVES-SANTOS, N. H.; ESHRIQUI, I.; FRANCO-SENA, A. B.; COCATE, P. G. *et al.* Dietary intake variations from pre-conception to gestational period according to the degree of industrial processing: A Brazilian cohort. **Appetite**, 105, p. 164-171, Oct 1 2016.

ANVISA. PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS (PARA) - RELATÓRIO DE ATIVIDADES DE 2013 E 2015. Brasília: Depósito

Legal na Biblioteca Nacional: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2016.

ASHLEY-MARTIN, J.; DODDS, L.; ARBUCKLE, T. E.; ETTINGER, A. S. *et al.* A birth cohort study to investigate the association between prenatal phthalate and bisphenol A exposures and fetal markers of metabolic dysfunction. **Environ Health**, 13, p. 84, Oct 2014.

ASMUS, C.; CAMARA, V.; LANDRIGAN, P.; LUZ, C. A Systematic Review of Children's Environmental Health in Brazil. *Ann. Glob. Health*. 82: 132–148 p. 2016.

ASMUS, C. I. R. F.; BARBOSA, A. P.; MEYER, A.; DAMASCENO, N. *et al.* Rio Birth Cohort Study on Environmental Exposure and Childhood Development - PIPA Project. **Ann Glob Health**, 86, n. 1, p. 59, Jun 2020.

ASSEFA, S.; KÖHLER, G. Intestinal Microbiome and Metal Toxicity. **Curr Opin Toxicol**, 19, p. 21-27, Feb 2020.

AVERINA, M.; BROX, J.; HUBER, S.; FURBERG, A. S. Perfluoroalkyl substances in adolescents in northern Norway: Lifestyle and dietary predictors. The Tromsø study, Fit Futures 1. **Environ Int**, 114, p. 123-130, 05 2018.

AZAD, M. B.; KONYA, T.; PERSAUD, R. R.; GUTTMAN, D. S. *et al.* Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. **BJOG**, 123, n. 6, p. 983-993, May 2016.

BAKER, P.; MACHADO, P.; SANTOS, T.; SIEVERT, K. *et al.* Ultra-processed foods and the nutrition transition: Global, regional and national trends, food systems transformations and political economy drivers. **Obes Rev**, 21, n. 12, p. e13126, Dec 2020.

BALSAN, R. Impactos decorrentes da modernização da agricultura brasileira. *Revista de geografia agrária*. 1: 123-151 p. 2006.

BAQUERO, F.; NOMBELA, C. The microbiome as a human organ. **Clin Microbiol Infect**, 18 Suppl 4, p. 2-4, Jul 2012.

BARKER, D. J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, 1, n. 8489, p. 1077-1081, May 1986.

BASSIL, M.; DAOU, F.; HASSAN, H.; YAMANI, O. *et al.* Lead, cadmium and arsenic in human milk and their socio-demographic and lifestyle determinants in Lebanon. **Chemosphere**, 191, p. 911-921, Jan 2018.

BEGLEY, T. H.; WHITE, K.; HONIGFORT, P.; TWAROSKI, M. L. *et al.* Perfluorochemicals: potential sources of and migration from food packaging. **Food Addit Contam**, 22, n. 10, p. 1023-1031, Oct 2005.

BHUTTA, Z. A.; AHMED, T.; BLACK, R. E.; COUSENS, S. *et al.* What works? Interventions for maternal and child undernutrition and survival. **Lancet**, 371, n. 9610, p. 417-440, Feb 2008.

BISANZ, J. E.; ENOS, M. K.; MWANGA, J. R.; CHANGALUCHA, J. *et al.* Randomized open-label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in Tanzanian pregnant women and school children. **MBio**, 5, n. 5, p. e01580-01514, Oct 2014.

BLASER, M. J. The theory of disappearing microbiota and the epidemics of chronic diseases. **Nat Rev Immunol**, 17, n. 8, p. 461-463, Jul 2017.

BOISVERT, G.; SONNE, C.; RIGÉ, F. F.; DIETZ, R. *et al.* Bioaccumulation and biomagnification of perfluoroalkyl acids and precursors in East Greenland polar bears and their ringed seal prey. **Environ Pollut**, 252, n. Pt B, p. 1335-1343, Sep 2019.

BRETON, J.; LE CLÈRE, K.; DANIEL, C.; SAUTY, M. *et al.* Chronic ingestion of cadmium and lead alters the bioavailability of essential and heavy metals, gene expression pathways and genotoxicity in mouse intestine. **Arch Toxicol**, 87, n. 10, p. 1787-1795, Oct 2013.

BRETON, J.; MASSART, S.; VANDAMME, P.; DE BRANDT, E. *et al.* Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome. **BMC Pharmacol Toxicol**, 14, p. 62, Dec 2013.

BROWNE, H. P.; NEVILLE, B. A.; FORSTER, S. C.; LAWLEY, T. D. Transmission of the gut microbiota: spreading of health. **Nat Rev Microbiol**, 15, n. 9, p. 531-543, Sep 2017.

BUCKLEY, J. P.; KIM, H.; WONG, E.; REBHOLZ, C. M. Ultra-processed food consumption and exposure to phthalates and bisphenols in the US National Health and Nutrition Examination Survey, 2013-2014. **Environ Int**, 131, p. 105057, Oct 2019.

BYNDLOSS, M. X.; BÄUMLER, A. J. The germ-organ theory of non-communicable diseases. **Nat Rev Microbiol**, 16, n. 2, p. 103-110, 02 2018.

BÄCKHED, F.; ROSWALL, J.; PENG, Y.; FENG, Q. *et al.* Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. **Cell Host Microbe**, 17, n. 6, p. 852, Jun 2015.

BÄUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, 535, n. 7610, p. 85-93, Jul 2016.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, 7, n. 5, p. 335-336, May 2010.

CAREY, M. A.; MEDLOCK, G. L.; ALAM, M.; KABIR, M. *et al.* Megasphaera in the stool microbiota is negatively associated with diarrheal cryptosporidiosis. **Clin Infect Dis**, Mar 2021.

CHANG, C.; LIN, H. Dysbiosis in gastrointestinal disorders. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, 30, n. 1, p. 3-15, Feb 2016.

CHARBONNEAU, M. R.; BLANTON, L. V.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D. A. *et al.* A microbial perspective of human developmental biology. **Nature**, 535, n. 7610, p. 48-55, Jul 2016.

CHU, D. M.; ANTONY, K. M.; MA, J.; PRINCE, A. L. *et al.* The early infant gut microbiome varies in association with a maternal high-fat diet. **Genome Med**, 8, n. 1, p. 77, 08 2016.

CLAUS, S. P.; GUILLOU, H.; ELLERO-SIMATOS, S. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? **NPJ Biofilms Microbiomes**, 2, p. 16003, 2016.

CLAUS, S. P.; GUILLOU, H.; ELLERO-SIMATOS, S. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? **Npj Biofilms And Microbiomes**, 2, p. 16003, 05/04/online 2016. Review Article.

CONDETTE, C. J.; BACH, V.; MAYEUR, C.; GAY-QUÉHEILLARD, J. *et al.* Chlorpyrifos Exposure During Perinatal Period Affects Intestinal Microbiota Associated With Delay of Maturation of Digestive Tract in Rats. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 61, n. 1, p. 30-40, Jul 2015.

CORYELL, M.; MCALPINE, M.; PINKHAM, N. V.; MCDERMOTT, T. R. *et al.* The gut microbiome is required for full protection against acute arsenic toxicity in mouse models. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 5424, 12 2018.

COX, A. J.; WEST, N. P.; CRIPPS, A. W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. **Lancet Diabetes Endocrinol**, 3, n. 3, p. 207-215, Mar 2015.

COX, L. M.; BLASER, M. J. Antibiotics in early life and obesity. **Nat Rev Endocrinol**, 11, n. 3, p. 182-190, Mar 2015.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; COSTELLO, E. K.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M. *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 26, p. 11971-11975, Jun 2010.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; GODOY-VITORINO, F.; KNIGHT, R.; BLASER, M. J. Role of the microbiome in human development. **Gut**, 68, n. 6, p. 1108-1114, 06 2019.

DONG, X.; SHULZHENKO, N.; LEMAITRE, J.; GREER, R. L. *et al.* Arsenic exposure and intestinal microbiota in children from Sirajdikhan, Bangladesh. **PLoS One**, 12, n. 12, p. e0188487, 2017.

DUAN, H.; YU, L.; TIAN, F.; ZHAI, Q. *et al.* Gut microbiota: A target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy. **Sci Total Environ**, 742, p. 140429, Nov 2020.

EHLERS, E. Agricultura sustentável: origens e perspectivas de um novo paradigma. Guaíba, RS: Livraria e Editora Agropecuária: 157 p. 1999.

ELIZABETH, L.; MACHADO, P.; ZINOCKER, M.; BAKER, P. *et al.* Ultra-Processed Foods and Health Outcomes: A Narrative Review. **Nutrients**, 12, n. 7, Jun 30 2020.

FILARDI, T.; PANIMOLLE, F.; LENZI, A.; MORANO, S. Bisphenol A and Phthalates in Diet: An Emerging Link with Pregnancy Complications. **Nutrients**, 12, n. 2, Feb 2020.

FLINT, H. J. **Why Gut Microbes Matter**. Aberdeen, UK 2020.

FRÓES-ASMUS, C. I. R.; MEYER, A.; DA CUNHA, A. J. L. A.; DAMASCENO, N. *et al.* Multiple Environmental Exposure in Pregnant Women and Their Children in the City of Rio de Janeiro, Brazil, Rio Birth Cohort Study: PIPA Project. **Exposure and Health**, 2021/04/26 2021.

FUJIMURA, K. E.; SITARIK, A. R.; HAVSTAD, S.; LIN, D. L. *et al.* Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. **Nat Med**, 22, n. 10, p. 1187-1191, 10 2016.

GASPARRINI, A. J.; WANG, B.; SUN, X.; KENNEDY, E. A. *et al.* Persistent metagenomic signatures of early-life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome. **Nat Microbiol**, 4, n. 12, p. 2285-2297, 12 2019.

GENSOLLEN, T.; IYER, S. S.; KASPER, D. L.; BLUMBERG, R. S. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, 352, n. 6285, p. 539-544, Apr 2016.

GEVERS, D.; KNIGHT, R.; PETROSINO, J. F.; HUANG, K. *et al.* The Human Microbiome Project: a community resource for the healthy human microbiome. **PLoS Biol**, 10, n. 8, p. e1001377, 2012.

GILBERT, J. A.; STEPHENS, B. Microbiology of the built environment. **Nat Rev Microbiol**, 16, n. 11, p. 661-670, 11 2018.

GILMOUR, C. C.; PODAR, M.; BULLOCK, A. L.; GRAHAM, A. M. *et al.* Mercury methylation by novel microorganisms from new environments. **Environ Sci Technol**, 47, n. 20, p. 11810-11820, Oct 2013.

GIRI, S. S.; JUN, J. W.; YUN, S.; KIM, H. J. *et al.* Characterisation of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Gut of *Cyprinus carpio* That May Be Effective Against Lead Toxicity. **Probiotics Antimicrob Proteins**, 11, n. 1, p. 65-73, 03 2019.

GONÇALVES, R. M.; GONÇALVES, J. R.; FORNÉS, N. S. [Cadmium in human milk: concentration and relation with the lifestyle of women in the puerperium period]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 32, n. 7, p. 340-345, Jul 2010.

GSCHWENDTNER, S.; KANG, H.; THIERING, E.; KUBLIK, S. *et al.* Early life determinants induce sustainable changes in the gut microbiome of six-year-old children. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 12675, 09 2019.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, 32, n. 18, p. 2847-2849, 09 2016.

HANSKI, I.; VON HERTZEN, L.; FYHRQUIST, N.; KOSKINEN, K. *et al.* Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109, n. 21, p. 8334-8339, May 2012.

HIMEL MALLICK; LAUREN J. MCIVER; ALI RAHNAVARD; SIYUAN MA *et al.*
Multivariable Association in Population-scale Meta-omics Studies.

HOEN, A. G.; MADAN, J. C.; LI, Z.; COKER, M. *et al.* Sex-specific associations of infants' gut microbiome with arsenic exposure in a US population. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 12627, 08 2018.

INDRIO, F.; MARTINI, S.; FRANCAVILLA, R.; CORVAGLIA, L. *et al.* Epigenetic Matters: The Link between Early Nutrition, Microbiome, and Long-term Health Development. **Front Pediatr**, 5, p. 178, 2017.

ISZATT, N.; JANSSEN, S.; LENTERS, V.; DAHL, C. *et al.* Environmental toxicants in breast milk of Norwegian mothers and gut bacteria composition and metabolites in their infants at 1 month. **Microbiome**, 7, n. 1, p. 34, 02 2019.

JENMALM, M. C. The mother-offspring dyad: microbial transmission, immune interactions and allergy development. **J Intern Med**, 282, n. 6, p. 484-495, Dec 2017.

JIN, Y.; WU, S.; ZENG, Z.; FU, Z. Effects of environmental pollutants on gut microbiota. **Environ Pollut**, 222, p. 1-9, Mar 2017.

JOLY CONDETTE, C.; BACH, V.; MAYEUR, C.; GAY-QUÉHEILLARD, J. *et al.* Chlorpyrifos Exposure During Perinatal Period Affects Intestinal Microbiota Associated With Delay of Maturation of Digestive Tract in Rats. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 61, n. 1, p. 30-40, Jul 2015.

JORDAN, S.; BAKER, B.; DUNN, A.; EDWARDS, S. *et al.* Maternal-Child Microbiome: Specimen Collection, Storage, and Implications for Research and Practice. **Nurs Res**, 66, n. 2, p. 175-183, 2017 Mar/Apr 2017.

KAN, H.; ZHAO, F.; ZHANG, X. X.; REN, H. *et al.* Correlations of Gut Microbial Community Shift with Hepatic Damage and Growth Inhibition of *Carassius auratus* Induced by Pentachlorophenol Exposure. **Environ Sci Technol**, 49, n. 19, p. 11894-11902, Oct 2015.

KIM, B. R.; SHIN, J.; GUEVARRA, R.; LEE, J. H. *et al.* Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. **J Microbiol Biotechnol**, 27, n. 12, p. 2089-2093, Dec 2017.

KNIP, M.; SILJANDER, H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, 12, n. 3, p. 154-167, Mar 2016.

KOLETZKO, B.; BRANDS, B.; POSTON, L.; GODFREY, K. *et al.* Early nutrition programming of long-term health. **Proc Nutr Soc**, 71, n. 3, p. 371-378, Aug 2012.

LANE, M. M.; DAVIS, J. A.; BEATTIE, S.; GOMEZ-DONOSO, C. *et al.* Ultraprocessed food and chronic noncommunicable diseases: A systematic review and meta-analysis of 43 observational studies. **Obes Rev**, 22, n. 3, p. e13146, Mar 2021.

LEMAS, D. J.; YOUNG, B. E.; BAKER, P. R.; TOMCZIK, A. C. *et al.* Alterations in human milk leptin and insulin are associated with early changes in the infant intestinal microbiome. **Am J Clin Nutr**, 103, n. 5, p. 1291-1300, May 2016.

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nat Rev Microbiol**, 11, n. 6, p. 371-384, Jun 2013.

LI, J.; JIA, H.; CAI, X.; ZHONG, H. *et al.* An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. **Nat Biotechnol**, 32, n. 8, p. 834-841, Aug 2014.

LI, Y.; LIU, K.; SHEN, J.; LIU, Y. Wheat bran intake can attenuate chronic cadmium toxicity in mice gut microbiota. **Food Funct**, 7, n. 8, p. 3524-3530, Aug 2016.

LOZUPONE, C. A.; HAMADY, M.; KELLEY, S. T.; KNIGHT, R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. **Appl Environ Microbiol**, 73, n. 5, p. 1576-1585, Mar 2007.

MALLICK, H.; RAHNAVARD, A.; MCIVER, L. **Maaslin2: Maaslin2**. Versão R package version 1.4.0. <http://huttenhower.sph.harvard.edu/maaslin2>.: 2020.

MANCABELLI, L.; MILANI, C.; LUGLI, G. A.; TURRONI, F. *et al.* Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. **FEMS Microbiol Ecol**, 93, n. 12, 12 2017.

MARTINEZ STEELE, E.; KHANDPUR, N.; DA COSTA LOUZADA, M. L.; MONTEIRO, C. A. Association between dietary contribution of ultra-processed foods and urinary concentrations of phthalates and bisphenol in a nationally representative sample of the US population aged 6 years and older. **PLoS One**, 15, n. 7, p. e0236738, 2020.

MARTÍNEZ STEELE, E.; KHANDPUR, N.; DA COSTA LOUZADA, M. L.; MONTEIRO, C. A. Association between dietary contribution of ultra-processed foods and urinary concentrations of phthalates and bisphenol in a nationally representative sample of the US population aged 6 years and older. **PLoS One**, 15, n. 7, p. e0236738, 2020.

MBAKWA, C. A.; SCHERES, L.; PENDERS, J.; MOMMERS, M. *et al.* Early Life Antibiotic Exposure and Weight Development in Children. **J Pediatr**, 176, p. 105-113.e102, Sep 2016.

MCCALL, L. I.; CALLEWAERT, C.; ZHU, Q.; SONG, S. J. *et al.* Home chemical and microbial transitions across urbanization. **Nat Microbiol**, 5, n. 1, p. 108-115, Jan 2020.

MILAN, M.; CARRARO, L.; FARISELLI, P.; MARTINO, M. E. *et al.* Microbiota and environmental stress: how pollution affects microbial communities in Manila clams. **Aquat Toxicol**, 194, p. 195-207, Jan 2018.

MILANI, C.; DURANTI, S.; BOTTACINI, F.; CASEY, E. *et al.* The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Microbiol Mol Biol Rev**, 81, n. 4, 12 2017.

MILHOME, M. A. L.; HOLANDA, J. W. B.; DE ARAÚJO NETO, J. R.; DO NASCIMENTO, R. F. Diagnóstico da Contaminação do Solo por Metais Tóxicos Provenientes de Resíduos Sólidos Urbanos e a Influência da Matéria Orgânica. **Rev. Virtual Quim.** 10: 59-72 p. 2018.

MONTEIRO, C. A.; CANNON, G.; LEVY, R. B.; MOUBARAC, J. C. *et al.* Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. **Public Health Nutr**, 22, n. 5, p. 936-941, Apr 2019.

MOOS, W. H.; FALLER, D. V.; HARPP, D. N.; KANARA, I. *et al.* Microbiota and Neurological Disorders: A Gut Feeling **BioResearch**. 5.1: 137-145 p. 2016.

MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ São Paulo: **Ciênc. saúde coletiva**. 7: 299-311 p. 2002.

MULLIGAN, C. M.; FRIEDMAN, J. E. Maternal modifiers of the infant gut microbiota: metabolic consequences. **J Endocrinol**, 235, n. 1, p. R1-R12, Oct 2017.

MUNIZ, D. H. D. F.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente *Universitas: Ciências da Saúde*. 4: 83-100 p. 2006.

NASPOLINI, N. F.; MACHADO, P. P.; FROES-ASMUS, C. I. R.; CAMARA, V. M. *et al.* Food consumption according to the degree of processing, dietary diversity and socio-demographic factors among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil: The Rio Birth Cohort Study of Environmental Exposure and Childhood Development (PIPA project). **Nutr Health**, p. 260106020960881, Oct 19 2020.

NASUTI, C.; COMAN, M. M.; OLEK, R. A.; FIORINI, D. *et al.* Changes on fecal microbiota in rats exposed to permethrin during postnatal development. **Environ Sci Pollut Res Int**, 23, n. 11, p. 10930-10937, Jun 2016.

OJHA, S.; ROBINSON, L.; SYMONDS, M. E.; BUDGE, H. Suboptimal maternal nutrition affects offspring health in adult life. **Early Hum Dev**, 89, n. 11, p. 909-913, Nov 2013.

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R. *et al.* **vegan: Community Ecology Package**. Versão R package version 2.5-6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>: 2019.

PAHO, P. A. H. O. Guiding principles for complementary feeding of the breastfed child. Washington, DC 40 p. 2003.

PALMA, D. C. D. A. **Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde – MT** 2011. 103 f. - Programa de Pós-Graduação em Saúde

Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT.

PARSONS, P. J.; BARBOSA JR., F. E. Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine. **Spectrochimica Acta Part B**, 62, p. 992 – 1003, 2007.

PHILIPS, E. M.; JADDOE, V. W. V.; TRASANDE, L. Effects of early exposure to phthalates and bisphenols on cardiometabolic outcomes in pregnancy and childhood. **Reprod Toxicol**, 68, p. 105-118, 03 2017.

PORTO, M. F.; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. São Paulo: Rev. bras. Saúde ocup. 37: 17-50 p. 2012.

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B. M. *et al.* SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Res**, 35, n. 21, p. 7188-7196, 2007.

PUTIGNANI, L.; DEL CHIERICO, F.; VERNOCCHI, P.; CICALA, M. *et al.* Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood-Adulthood Transition. **Inflamm Bowel Dis**, 22, n. 2, p. 487-504, Feb 2016.

PÄRTTY, A.; KALLIOMÄKI, M.; WACKLIN, P.; SALMINEN, S. *et al.* A possible link between early probiotic intervention and the risk of neuropsychiatric disorders later in childhood: a randomized trial. **Pediatr Res**, 77, n. 6, p. 823-828, Jun 2015.

RADKE, E. G.; GALIZIA, A.; THAYER, K. A.; COOPER, G. S. Phthalate exposure and metabolic effects: a systematic review of the human epidemiological evidence. **Environ Int**, 132, p. 104768, 11 2019.

RANCIÈRE, F.; LYONS, J. G.; LOH, V. H.; BOTTON, J. *et al.* Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence. **Environ Health**, 14, p. 46, May 2015.

RENZ, H.; HOLT, P. G.; INOUE, M.; LOGAN, A. C. *et al.* An exposome perspective: Early-life events and immune development in a changing world. **J Allergy Clin Immunol**, 140, n. 1, p. 24-40, Jul 2017.

RICCIO, P.; ROSSANO, R. The human gut microbiota is neither an organ nor a commensal. **FEBS Lett**, 594, n. 20, p. 3262-3271, Oct 2020.

RICHARDSON, J. B.; DANCY, B. C. R.; HORTON, C. L.; LEE, Y. S. *et al.* Exposure to toxic metals triggers unique responses from the rat gut microbiota. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 6578, 04 2018.

ROSA, A. C. S. **Avaliação dos Níveis Basais de Metabólitos de Agrotóxicos Piretroides na População Adulta da Cidade do Rio de Janeiro: Contribuição Para a Vigilância em Saúde do País.** . 2017. (Tese (Doutorado)) -, Fundação Oswaldo Cruz.

ROSENMAI, A. K.; TAXVIG, C.; SVINGEN, T.; TRIER, X. *et al.* Fluorinated alkyl substances and technical mixtures used in food paper-packaging exhibit endocrine-related activity in vitro. **Andrology**, 4, n. 4, p. 662-672, 07 2016.

RUTAYISIRE, E.; HUANG, K.; LIU, Y.; TAO, F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. **BMC Gastroenterol**, 16, n. 1, p. 86, Jul 2016.

SANTOS, T. C.; CARVALHO, V. S. B.; REBOITA, M. S. Avaliação da influência das condições meteorológicas em dias com altas concentrações de material particulado na Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Eng. Sanit. Ambient. 21 2016.

SARCINELLI, P. N.; PEREIRA, A. C.; MESQUITA, S. A.; OLIVEIRA-SILVA, J. J. *et al.* Dietary and reproductive determinants of plasma organochlorine levels in pregnant women in Rio de Janeiro. **Environ Res**, 91, n. 3, p. 143-150, Mar 2003.

SELMA-ROYO, M.; CALATAYUD ARROYO, M.; GARCÍA-MANTRANA, I.; PARRA-LLORCA, A. *et al.* Perinatal environment shapes microbiota colonization and infant growth: impact on host response and intestinal function. **Microbiome**, 8, n. 1, p. 167, 11 2020.

SHOSHTARI-YEGANEH, B.; ZAREAN, M.; MANSOURIAN, M.; RIAHI, R. *et al.* Systematic review and meta-analysis on the association between phthalates exposure and insulin resistance. **Environ Sci Pollut Res Int**, 26, n. 10, p. 9435-9442, Apr 2019.

SMITS, S. A.; LEACH, J.; SONNENBURG, E. D.; GONZALEZ, C. G. *et al.* Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. **Science**, 357, n. 6353, p. 802-806, 08 2017.

STIEMSMA, L. T.; MICHELS, K. B. The Role of the Microbiome in the Developmental Origins of Health and Disease. **Pediatrics**, 141, n. 4, Apr 2018.

STRATI, F.; CAVALIERI, D.; ALBANESE, D.; DE FELICE, C. *et al.* New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. **Microbiome**, 5, n. 1, p. 24, 02 2017.

SUBRAMANIAN, S.; HUQ, S.; YATSUNENKO, T.; HAQUE, R. *et al.* Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. **Nature**, 510, n. 7505, p. 417-421, Jun 2014.

TADDEI, C. R.; OLIVEIRA, F. F.; DUARTE, R. T.; TALARICO, S. T. *et al.* High abundance of Escherichia during the establishment of fecal microbiota in Brazilian children. **Microb Ecol**, 67, n. 3, p. 624-634, Apr 2014.

TALARICO, S. T.; SANTOS, F. E.; BRANDT, K. G.; MARTINEZ, M. B. *et al.* Anaerobic bacteria in the intestinal microbiota of Brazilian children. **Clinics (Sao Paulo)**, 72, n. 3, p. 154-160, Mar 2017.

TANG, M.; XU, C.; CHEN, K.; YAN, Q. *et al.* Hexachlorocyclohexane exposure alters the microbiome of colostrum in Chinese breastfeeding mothers. **Environ Pollut**, 254, n. Pt A, p. 112900, Nov 2019.

TERRA, F. H. B.; PELAEZ, V. A História da Indústria de Agrotóxicos no Brasil: das primeiras fábricas na década de 1940 aos anos 2000. *In: 47º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*, 2009, Porto Alegre. p. 1-21.

THOMAS, R. **Practical guide to ICP-MS - A tutorial for beginners**. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, 2013. 50 p.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochem J**, 474, n. 11, p. 1823-1836, 05 2017.

UNICEF. The State of the World's Children 2019. Children, Food and Nutrition: Growing well in a changing world. New York 2019.

VON MUTIUS, E. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: farm lifestyles and the hygiene hypothesis. **Clin Exp Immunol**, 160, n. 1, p. 130-135, Apr 2010.

VON MUTIUS, E.; VERCELLI, D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. **Nat Rev Immunol**, 10, n. 12, p. 861-868, 12 2010.

WATERLAND, R. A.; MICHELS, K. B. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. **Annu Rev Nutr**, 27, p. 363-388, 2007.

WHITE, R. A.; BJØRNHOLT, J. V.; BAIRD, D. D.; MIDTVEDT, T. *et al.* Novel developmental analyses identify longitudinal patterns of early gut microbiota that affect infant growth. **PLoS Comput Biol**, 9, n. 5, p. e1003042, 2013.

WHO, W. H. O. The optimal duration of exclusive breastfeeding: report of the expert consultation. Geneva, Switzerland: 6 p. 2001.

WHO, W. H. O. Guiding principles for feeding non-breastfed children 6-24 months of age. Geneva, Switzerland 42 p. 2005.

WOLFF, M. S.; RIVERA, M.; BAKER, D. B. Detection limits of organochlorine pesticides and related compounds in blood serum. **Bull Environ Contam Toxicol**, 47, n. 4, p. 499-503, Oct 1991.

WOPEREIS, H.; OOZEER, R.; KNIPPING, K.; BELZER, C. *et al.* The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. **Pediatr Allergy Immunol**, 25, n. 5, p. 428-438, Aug 2014.

ZHENG, P.; LI, Z.; ZHOU, Z. Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. **Diabetes Metab Res Rev**, 34, n. 7, p. e3043, 10 2018.

ANEXO I – QUESTIONÁRIO GESTANTE

Data: ____/____/____ Hora de início: ____:____ Entrevistador: _____

Bloco 1 – Identificação e contato			
1.1 - Nome completo: _____			
1.2 - Data de nascimento: ____/____/____ 1.3 - Idade: _____ 1.4 - Número de prontuário: _____			
1.5 - Nome da mãe: _____			
1.6 - CPF: _____		1.7 -Cartão do SUS: _____	
1.8 - Local onde realiza o pré natal: _____			
1.9 - Telefone da residência:() _____		1.10 - Celular: () _____	
1.11 - Outro telefone para contato: () _____			
1.12 - Email: _____		1.13 - Facebook: _____	
1.14 - Endereço: _____			
1.15 -Número: _____		1.16 - Complemento: _____	
1.17 - Bairro: _____		1.18 - Cep: _____	
1.19 - Referência: _____			
1.20 - Vai continuar morando nesta casa após o Nascimento do bebe?() sim () Não () Não sabe			
1.21 - Se for se mudar, qual o endereço? _____() NA			
1.22 -Número: _____		1.23 - Complemento: _____() NA	
1.24 -Bairro: _____() NA		1.25 - CEP: _____() NA	
1.26 - Referência: _____		1.27 -Telefone da residência: () _____	
1.28 – Poderia fornecer o endereço e telefone do seu trabalho? () Sim () Não () Não trabalha			
1.29 – Endereço do trabalho: _____() NA			
1.30 – Número do trabalho: _____		Complemento do trabalho: _____() NA	
1.31 – Telefone do trabalho: () _____		Ramal: _____() NA	
1.32 – Nome da empresa: _____() NA			
Você poderia fornecer o contato de pelo menos 3 pessoas de sua convivência?			
Parentesco	Nome	Telefone	Endereço
Mãe		()	
Pai		()	

Irmã/irmão		()	
Amiga (o)		()	

Bloco 2 - Características sócio demográficas			
2.1 a - Qual a sua cor (informada)? () Preto () Pardo () Branco () Amarelo () Indígena () NS () NR			
2.2 - Mora com o (a) companheiro (a)? () Sim () Não () NS () NR			
2.3 – Além de você, quantas pessoas moram na sua casa? _____ 2.4 - Sua casa tem quantos cômodos? ____			
2.5 – Das pessoas que moram com você, quantas exercem uma atividade remunerada sem contar com você? ____			
2.6 – Alguém na sua casa recebe bolsa família? () Sim () Não () NS () NR 2.6 a – Quantas pessoas? ____			
2.7 - Qual a renda total de sua família? _____			
2.8 - Você exerce alguma atividade remunerada? () Sim () Não () NS () NR			
2.8a – Se sim, esta atividade é: () em casa () fora de casa () NS () NR () NA			
2.8b - Qual tipo de atividade você desenvolve? _____ () NA			
2.8.c - Trabalha há quanto tempo nesta atividade? _____ anos () NA			
2.8 d – Trabalhou durante a gestação?			
() Não () 1º trimestre () 2º trimestre () 3º trimestre () Todos () NS () NR () NA			
2.9 – Até que ano/série você frequentou a escola?			
() Nunca estudou			
() Ensino Fundamental	() Ensino Médio	() Ensino Superior	() Pós graduação
() 1º ano (antigo CA)	() 1º ano	() Completo	() Especialização
() 2º ano (antiga 1ª série)	() 2º ano	() Incompleto	() Mestrado
() 3º ano (antiga 2ª série)	() 3º ano	() NS	() Doutorado
() 4º ano (antiga 3ª série)	() NS	() NR	() NS
() 5º ano (antiga 4ª série)	() NR	() NA	() NR
() 6º ano (antiga 5ª série)	() NA		() NA
() 7º ano (antiga 6ª série)			
() 8º ano (antiga 7ª série)			
() 9º ano (antiga 8ª série)			
() NS			
() NR			
() NA			

Bloco 3 - Nascimento da gestante	
3.1 a - Nasceu com baixo peso? (<2500g) ()Sim ()Não ()NS ()NR	
3.1 b - Qual o peso ao nascimento? _____	
3.2 a - Nasceu prematura? ()Sim ()Não ()NS ()NR	
3.3 b - Nasceu com quanto tempo de gestação? _____ ()Meses ()Semanas()NS ()NR	

Bloco 4 - Gestações anteriores	
4.1 – Você Já engravidou antes desta gravidez atual? ()Sim ()Não ()NS ()NR	
4.2 - Fez fertilização artificial em gestações anteriores? ()Sim ()Não ()NS ()NR ()NA	
4.3 – Quantas vezes engravidou sem contar com a atual? _____	
4.4 – Destas vezes, quantos nasceram vivos? _____ () NA	
4.5 -Teve algum parto prematuro? ()Sim ()Não ()NS()NR ()NA	
4.6 – Algum filho nasceu com baixo peso? ()Sim ()Não ()NS()NR ()NA	
4.7 – Algum filho nasceu com doença congênita? ()Sim ()Não ()NS()NR ()NA	
4.7 a – Qual doença? _____() NA	
4.8–Alguma gravidez anterior resultou em aborto? ()Sim ()Não ()NS()NR ()NA	
4.8 a – Se sim, quantos abortos? _____ () NA	
4.8b - Se sim, quantos foram abortos espontâneos? _____ ()Não foi espontâneo ()NS()NR()NA	
4.9 – Teve alguma gravidez que resultou em Mola hidatiforme? ()Sim ()Não ()NS()NR ()NA	

Bloco 5 - Pré natal da gestação atual	
5.1 - Planejou ter este filho? ()Sim ()Não ()NS ()NR	
5.2 - Quanto tempo demorou para engravidar nesta gestação? _____()Meses ()Anos ()NS ()NR	
5.2 - Fez fertilização artificial para engravidar nesta gestação? ()Sim ()Não ()NS ()NR	
5.3 - Está esperando gêmeos? ()Sim ()Não ()NS ()NR	
5.4 - Qual era o seu peso antes de engravidar? _____()NS ()NR	
5.5 - Qual é o seu peso atual? _____()NS ()NR	
5.6 - Qual a sua altura? _____()NS ()NR	
5.7 - Teve ciclos menstruais regulares (24 a 32 dias) nos três meses antes da gestação? ()Sim ()Não ()NS ()NR	
5.8 - Utilizou anticoncepcionais hormonais (pílula, injeção) nos dois meses anteriores a esta gestação? ()Sim ()Não ()NS ()NR	
5.9 - Estava amamentando nos dois meses anteriores a esta gestação?()Sim ()Não ()NS ()NR	

Bloco 6 – Morbidades Pré gestacionais e gestacionais	
Quais doenças tinha antes da gestação?	
6.1 -Anemia	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.2 – Depressão	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.3 – Diabetes	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.4 – Hipertensão	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.5 – Doenças na tireóide	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.6 – Outros problemas endócrinos ou glandulares	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.7 – Doença cardíaca	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.8 – Asma ou Bronquite	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.9 – Proteinúria ou doença nos rins ou doença renal crônica	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.10 – Qualquer tipo de câncer	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.11 – Lupus	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.12 – Qualquer doença de coagulação sanguínea	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.13 – Epilepsia	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.14 – Tuberculose	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.15 – Infecção no Trato urinário (ITU)	()Sim ()Não ()NS ()NR

6.16 –Qualquer anormalidade congênita ou doença genética	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.17 – Doença de crohn, doença celíaca, colite ulcerativa ou qualquer problema severo de má absorção	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.18 – Qualquer outro problema clínico?	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.18 a – Qual? _____	
E agora, durante a gestação, apresentou até o momento algum destes problemas de saúde?	
6.18 - Dengue	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.20 –Zika	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.21 - Chikungunya	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.22 – Hipertensão	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.23 – diabetes	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.24 – sangramento uterino mais de uma vez	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.25 – Alguma doença cardíaca	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.26 – Alguma incapacidade física que a impeça de fazer exercícios	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.27 – Descolamento de placenta	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.28 – Outros	()Sim ()Não ()NS ()NR
6.28 a – Outros Qual? _____	

Bloco 7 – Medicações, suplementos e Vitaminas

Medicações, suplementos e vitaminas utilizadas desde o início da gestação, mesmo que tenha sido uma única vez, e até mesmo aqueles usados antes de engravidar, mas que continuou usando agora. Incluindo pílula, remédios usados para enjôo, azia, dor, tratamento de infecção urinária, infecção por baixo, pressão alta ou diabetes.

7.27 -. Quais os nomes dos remédios, suplementos e vitaminas que você usou ou está usando desde o início dessa gravidez?

Nome da medicação	Motivo	Tempo de uso
7.27.r1: _____	7.27.m1 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r2: _____	7.27.m2 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r3: _____	7.27.m3 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r4: _____	7.27.m4 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r5: _____	7.27.m5 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r6: _____	7.27.m6 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r7: _____	7.27.m7 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r8: _____	7.27.m8 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r9: _____	7.27.m9 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r10: _____	7.27.m10 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r11: _____	7.27.m11 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r12: _____	7.27.m12 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r13: _____	7.27.m13 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r14: _____	7.27.m14 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR
7.27.r15: _____	7.27.m15 _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda a gestação () NA () NS () NR

Bloco 8 - Atividade física

8.1 – Praticava atividades físicas antes de saber que estava grávida?

() Sim () Não () NS () NR

8.2 – Mudou de hábitos de atividades físicas após saber que estava grávida?

() Não () Sim, passou a fazer () Sim, deixou de fazer () NS () NR

8.3 – Está com indicação de repouso?

() Sim () Não () NS () NR

Para responder as questões lembre que:

- Atividades físicas VIGOROSAS são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal
- Atividades físicas MODERADAS são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza por pelo menos 10 minutos contínuos de cada vez.

8.4 a- Em quantos dias da última semana você CAMINHOU por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

() Nenhum () _____ dias por semana () Não sei informar

8.4 b - Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando por dia?

horas: _____ Minutos: _____

8.5a- Em quantos dias da última semana, você realizou atividades MODERADAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA) ?

() Nenhum () _____ dias por semana () Não sei informar

8.5b - Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

horas: _____ Minutos: _____

8.6 a - Em quantos dias da última semana, você realizou atividades VIGOROSAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar MUITO sua respiração ou batimentos do coração?

() Nenhum () _____ dias por semana () Não sei informar

8.6 b. Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

8.7 a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um dia de semana?

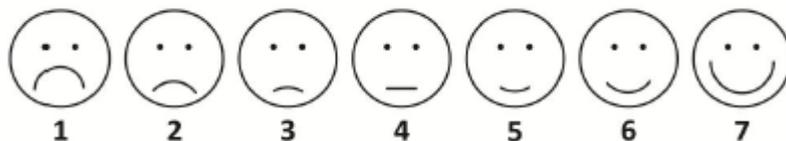
horas: _____ Minutos: _____

8.8 b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um dia de final de semana?

horas: _____ Minutos: _____

Bloco 9 - Felicidade e depressão

Eu vou ler as próximas cinco perguntas e você vai me responder olhando para uma escala, que vai de 1 a 7 (*mostrar escala impressa a cada pergunta*). Me diga qual o número desta escala que a descreve da melhor forma.



O 1 quer dizer não muito feliz e o 7 muito feliz.

9.1 - Qual desses rostos mostra melhor como você se sentiu na maior parte do tempo, no último ano? ____

9.2 - De forma geral, Você se considera uma pessoa: _____

9.3 - Se comparando com a maioria dos seus colegas ou amigos, você se considera: _____

Questionário de Edimburgo

Diga a opção (no) que melhor reflete como a Sra. tem se sentido nos últimos 7 dias:

- | | |
|--|---|
| 9.4 - 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. |
| 9.5 - Eu tenho pensado no futuro com alegria. | 1 - Sim, como de costume.
2 - Um pouco menos que de costume.
3 - Muito menos que de costume.
4 - Praticamente não |
| 9.6 - Eu tenho me culpado sem razão quando as coisas dão errado. | 1 - Não, de jeito nenhum.
2 - Raramente.
3 - Sim, às vezes.
4 - Sim, muito frequentemente. |
| 9.7 - Eu tenho ficado ansiosa ou preocupada sem uma boa razão | 1 - Sim, muitas vezes seguidas.
2 - Sim, às vezes.
3 - Raramente.
4 - Não, de jeito nenhum. |
| 9.8 - Eu tenho me sentido assustada ou em pânico sem um bom motivo. | 1 - Sim, muitas vezes seguidas.
2 - Sim, às vezes.
3 - Raramente.
4 - Não, de jeito nenhum |
| 9.9 - .Eu tenho me sentido sobrecarregada pelas tarefas e acontecimentos do meu dia-a-dia. | 1 - Sim. Na maioria das vezes eu não consigo lidar bem com eles.
2 - Sim. Algumas vezes não consigo lidar bem como antes.
3 - Não. Na maioria das vezes consigo lidar bem com eles.
4 - Não. Eu consigo lidar com eles tão bem quanto antes. |
| 9.10 - . Eu tenho me sentido tão infeliz que eu tenho tido dificuldade de dormir. | 1 - Sim, na maioria das vezes.
2 - Sim, algumas vezes.
3 - Raramente.
4 - Não, nenhuma vez. |
| 9.11 - .Eu tenho me sentido triste ou muito mal. | 1 - Sim, na maioria das vezes.
2 - Sim, muitas vezes.
3 - Raramente.
4 - Não, de jeito nenhum |
| 9.12 - .Eu tenho me sentido tão triste que tenho chorado. | 1 - Sim, a maior parte do tempo.
2 - Sim, muitas vezes.
3 - Só de vez em quando.
4 - Não, nunca. |
| 9.13 - .Eu tenho pensado em fazer alguma coisa contra mim mesma | 1 - Sim, muitas vezes.
2 - Às vezes.
3 - Raramente.
4 - Não, nunca. |

Bloco 10 - Uso de álcool											
10.1 – Você consumiu alguma bebida com álcool desde que engravidou, mesmo sem saber que estava grávida?						() Sim () Não () NS () NR					
Se sim aponte o tipo e a frequência											
Tipo de bebida	Nunca	Por mês			Por semana				Por dia		
	0	<1 ou 1	2	3	1-2	3-4	5-6	7	1	2	>3
11.1 a - cerveja											
11.1 b - Vinho											
11.1 c - Destilados (caipirinha, Ice, batidas, whisky)											
11.1 d - Outros											

Bloco 11–Tabagismo	
11.1 – Você fumava antes de engravidar?	() Sim () Não () NS () NR
11.2 - Se sim, continuou fumando quando soube que estava grávida?	() Sim () Não () NA () NS () NR
11.3 - Quantos cigarros, em média, fuma por dia?	_____ () NA () NS () NR
11.4 - Seu marido/companheiro fuma?	() Sim () Não () NS () NR
11.5 - Quantos cigarros por dia, em média, seu marido/companheiro fuma?	_____ () NA () NS () NR
11.6 –Alguém de seu convívio fuma diariamente?	() Sim () Não () NS () NR

Bloco 12 - Uso de drogas	
12.1 – Você usou drogas desde que engravidou, mesmo sem saber que estava grávida? () Sim () Não () NS () NR	
12.2 – Que droga utilizou?	
12.2 a – Maconha	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda gestação () NA () NS () NR
12.2 b - LSD ou acido	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda gestação () NA () NS () NR
12.2 c - lança perfume ou Loló	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda gestação () NA () NS () NR
12.2 d – Heroína	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda gestação () NA () NS () NR
12.2 e – Crack	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda gestação () NA () NS () NR
12.2 f – Cocaina	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda gestação () NA () NS () NR
12.2 g - Cola de sapateiro	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda gestação () NA () NS () NR
12.2 h - Comprimidos para dormir ou para ficar calma	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda gestação () NA () NS () NR

12.2 i - Outra droga:	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda gestação () NA () NS () NR
12.2 i1 - Qual? _____	() 1º trim () 2º trim () 3º trim () toda gestação () NA () NS () NR

Bloco 13 – Saúde Bucal	
13.1 – Em geral, quantas vezes escova seus dentes por dia?	() Não escovo diariamente () 1 () 2 () ≥ 3 () NS () NR
13.2 – Utiliza fio dental diariamente?	() Nunca Uso () Não diariamente () Diariamente () NS () NR
13.3 – Costuma sentir dor de dente diariamente?	() Nunca () Não diariamente () Diariamente () NS () NR
13.4 – Sua gengiva sangra quando escova os dentes?	() Nunca () Não diariamente () Diariamente () NS () NR
13.4 – Última vez que foi ao dentista?	() < 6 meses () entre 6 meses e 1 ano () > 1 ano () NS () NR

Bloco 14 – exposição											
14.1 – Moradia											
14.1 – Qual o tipo de residência você mora? () casa () apartamento () morador de rua () NS () NR											
14.1 a – Se casa, qual o tipo de construção? () Tijolo revestido () Tijolo () Taipa revestida com reboco () madeira () Material aproveitado () NA () NS () NR											
14.1 b - Quantos cômodos tem na residência? _____											
14.1 c – Quantos cômodos tem janelas e/ou basculantes? _____											
14.1d – Existe manchas de mofo na sua residência?() Não () Na sala () Nos quartos () Outro cômodo () NA () NS () NR											
14.1e – Tem quintal na residência? () Sim () Não () NA () NS () NR											
14.1f – Algum familiar utiliza a residência como local de trabalho? () Sim () Não () NA () NS () NR											
14.1f1 – Que atividade desenvolve?											
() Pinturas e serviços automotivos					() Serralheria						
() Grafica					() serviços de eletrônica						
() Cabeleireiro					() NA						
() artesanato					() NS						
() sapateiro					() NR						
() marcenaria/carpintaria					() OUTROS						
					Outros qual? _____						
14.1g– Sua casa foi reformada durante a gestação? () Não () Sim, 1º trim () Sim, 2º tri () Sim, 3º trim () NS () NR											
14.1h – Tipo de reforma? () Construção () pintura () aplicação piso laminado () sinteco () outro () NA () NS () NR											
14.1i – Qual a fonte de água de sua residência? () rede de abastecimento () Poço () reservatório comunitário () acumulo da chuva () outro () NA () NS () NR											
14.1j – O que utiliza para abastecer o fogão de sua casa? () gás () querosene () lenha () outro () NA () NS () NR											
14.1k – Costuma fazer churrasco na sua residência? () Sim () Não () NA () NS () NR											
14.1k1 – Utiliza carvão? () Sim () Não () NA () NS () NR											
14.1k2 – Com que frequência faz churrasco?	Por Mês				Por semana				Por dia		
	0	1	2	3	1-2	3-4	5-6	7	1	2-3	>3
14.1l – Existe algum destes locais na mesma quadra/quarteirão de sua residência? () oficina de pintura () posto de gasolina () fabrica de plásticos () fábrica de isopor () outro () NA () NS () NR											

14.2 Produtos utilizados no domicílio									
Faz uso dos produtos abaixo na sua residência? Se sim assinale a frequência?									
Produtos que utiliza	N	Por Mês			Por semana				Durante a gestação a frequência modificou?
	0	1	2	3	1-2	3-4	5-6	7	
14.2a – Inseticida spray									() Não () Diminuiu () aumentou () NS () NR
14.2b– Inseticida elétrico									() Não () Diminuiu () aumentou () NS () NR
14.2c – Outros inseticidas químicos									() Não () Diminuiu () aumentou () NS () NR
14.2d–inseticidas naturais (citronela)									() Não () Diminuiu () aumentou () NS () NR
14.2e- Desinfetante (pinho bril, veja)									() Não () Diminuiu () aumentou () NS () NR
14.2f - Desengordurante (veja para cozinha)									() Não () Diminuiu () aumentou () NS () NR
14.2g - Cloro									() Não () Diminuiu () aumentou () NS () NR
14.2h - Água sanitária									() Não () Diminuiu () aumentou () NS () NR
14.2i - Cloroforme									() Não () Diminuiu () aumentou () NS () NR
14.2j - Lisoforme									() Não () Diminuiu () aumentou () NS () NR
14.2k - Outros produtos									() Não () Diminuiu () aumentou () NS () NR
14.2k– Faz uso de repelentes para o corpo durante a gestação? () Sim () Não () NA () NS () NR									
14.2l – Qual a marca/nome? _____									
14.2m - Cultiva algum tipo de planta, alimentos, jardim?() Sim () Não () NA () NS () NR									
14.2n – Utiliza algum produto para evitar pragas nas plantas, alimentos ou jardim? () Sim () Não () NA () NS () NR									
14.2n1 – Que tipo de produto?() Natural () químico () Na () NS () NR									
14.2o – Quantos dias faz que você utilizou inseticida em casa? _____ () NS () NR () NA									
14.2p - Você utilizou algum remédio para piolho recentemente? () sim () não () NR () NS									
14.2p1 – Quantos dias faz que você utilizou remédio para piolho? _____ () NS () NR () NA									
14.2q - Utiliza algum produto para animais de estimação? () sim () não () NR () NS									
14.2q1 - Se sim, qual? _____ () NS () NR () NA									
14.2q2 - Quantos dias faz que você utilizou a última vez? _____ () NS () NR () NA									

14.3 - Utensílios de cozinha
14.3a – Utiliza potes de plástico para esquentar comida no micro-ondas ou banho maria? () Sim () Não () NS () NR
14.3a1 – Se sim quantos dias por semana? () Todos os dias () 3 a 4 dias/semana () 1 a 2 dias/semana () NA () NS () NR
14.3b – Que tipo de panelas utiliza?() teflon () alumínio () ferro () barro () Cerâmica () Inox () NA () NS () NR
14.3b1 – Se outro tipo, qual? _____

14.9 e - Milho																	
14.9 f - lentilha																	
14.9 g - canjica																	
14.9 h - outros																	

14.10 – Fonte de abastecimento de água para consumo

14.10 a – Qual a fonte de abastecimento de sua água na sua residência? rede publica carro pipa poço ou nascentes água da chuva reservatório comunitário

14. 10 b – Utiliza filtro para a água de consumo?

Filtro de barro filtro de carvão ativado filtro não sei informar o tipo Não, direto da bica Não, água mineral Não, apenas fervida Não, apenas clorada NS NR

Bloco 15 - Características do pai biológico (respondido pela gestante)			
Entrevistador responde – O pai está presente no momento? () Sim () Não			
15.1 - Pode informar o nome do pai do bebe? () Sim () Não			
15.2 - Se sim seguir para 15.3, se não por que não? () Não sei o nome () Não gostaria de falar			
15.3 – Nome do pai: _____			
15.4 - Qual a idade dele? _____			
15.5 – Qual a cor dele? () Preto () Pardo () Branco () Amarelo () indígena () NS () NR			
15.6 – Até que ano/série ele frequentou a escola?			
() Nunca estudou			
() Ensino Fundamental	() Ensino Médio	() Ensino Superior	() Pós graduação
() 1º ano (antigo CA)	() 1º ano	() Completo	() Especialização
() 2º ano (antiga 1ª série)	() 2º ano	() Incompleto	() Mestrado
() 3º ano (antiga 2ª série)	() 3º ano	() NS	() Doutorado
() 4º ano (antiga 3ª série)	() NS	() NR	() NS
() 5º ano (antiga 4ª série)	() NR	() NA	() NR
() 6º ano (antiga 5ª série)	() NA		() NA
() 7º ano (antiga 6ª série)			
() 8º ano (antiga 7ª série)			
() 9º ano (antiga 8ª série)			
() NS			
() NR			
() NA			
15.7 – El trabalha?		() Sim () Não () NS () NR	
15.7 a – Em que tipo de atividade ele desenvolve?		_____	
15.7 b – Trabalha nesta atividade há quantos anos?		_____	
15.8 – Se mudou de atividade, qual a atividade anterior		_____	
15.8 a – Trabalhou nesta atividade por quanto tempo em anos?		_____	
15.9 - Teve asma ou bronquite?		() Sim () Não () NS () NR	
15.10 – Ele Fuma?		() Nunca () No passado () Fuma () NS () NR	
15.10 a – Se fumou no passado, parou a quanto tempo?		_____ () meses _____ () anos () NA () NS () NR	
15.11 b – Se fuma atualmente, fuma quantos cigarros por dia?		_____ () NA () NS () NR	
15.12 – Consome bebidas alcoólicas?		() Sim () Não () NS () NR	

Tipo de bebida	Nunca	Por mês			Por semana				Por dia		
	0	<1 ou 1	2	3	1-2	3-4	5-6	7	1	2	>3
15.12 a - cerveja											
15.12 b - Vinho											
15.12 c - Destilados (caipirinha, Ice, batidas, whisky)											
15.12 d - Outros											
15.13 – Consome outro tipo de droga?		() Nunca () No passado () atualmente () NS () NR									
15.14 – Que tipo ?											
15.14 a - Maconha				() Nunca () No passado () atualmente () NS () NR							
15.14 b - LSD ou acido				() Nunca () No passado () atualmente () NS () NR							
15.14 c - lança perfume ou Loló				() Nunca () No passado () atualmente () NS () NR							
15.14 d - Heroína				() Nunca () No passado () atualmente () NS () NR							
15.14 e - Crack				() Nunca () No passado () atualmente () NS () NR							
15.14 f - Cocaina				() Nunca () No passado () atualmente () NS () NR							
15.14 g - Cola de sapateiro				() Nunca () No passado () atualmente () NS () NR							
15.14 h - Comprimidos para dormir ou para ficar calmo				() Nunca () No passado () atualmente () NS () NR							
15.14 i - Outra droga				() Nunca () No passado () atualmente () NS () NR							
15.14 i1 – Qual?				_____							

Bloco 16 - Informações da carteira da gestante					
16.1 – Data da última menstruação: ____/____/____			16.2 – Primeiro peso da mãe: _____ kg		
16.3 – Altura da mãe: _____ cm					
Vacinas	1ª dose (a)	2ª dose (b)	3ª dose (c)	Reforço (d)	Já vacinada (e)
16.4 - Antitetânica	() Sim () Não () Ign	() Sim () Não () Ign	() Sim () Não () Ign	() Sim () Não () Ign	() Sim () Não () Ign
16.5 - Hepatite B	() Sim () Não () Ign	() Sim () Não () Ign	() Sim () Não () Ign	() Sim () Não () Ign	() Sim () Não () Ign
16.6 - Influenza	() Sim () Não () Ign	-	-	-	-
16.7 - Tríplice	() Sim () Não () Ign	() Sim () Não () Ign	() Sim () Não () Ign	() Sim () Não () Ign	-
<i>Exames realizados durante a gravidez. Anotar preferencialmente do cartão ou, se tiver, de exames que estejam com a mãe no momento da entrevista.</i>					
Exame (a)			Data (b)	Resultado (c)	
16.8 - ABO-RH	() Sim () Não () Ign				

16.9 - Hb (Hemoglobina)	()Sim ()Não ()Ign		
16.10 - Ht (Hematócrito)	()Sim ()Não ()Ign		
16.11 - Glicemia de jejum	()Sim ()Não ()Ign		
16.12 - VDRL	()Sim ()Não ()Ign		
16.13 - Urina 1 (EQU)	()Sim ()Não ()Ign		
16.14 - Urina 2 (urocultura)	()Sim ()Não ()Ign		
16.15- Anti HIV	()Sim ()Não ()Ign		
16.16 - HBsAg	()Sim ()Não ()Ign		
16.17 - Toxoplasmose A (IgG)	()Sim ()Não ()Ign		
16.18 - Toxoplasmose B (IgM)	()Sim ()Não ()Ign		
16.19 - Combs. Indireto	()Sim ()Não ()Ign		

Ultrasonografia (anotar no máximo três, começando pelo ultrassom mais precoce)

	16.21 – Ultrasson 1	16.22 – Ultrasson 2	16.23 – Ultrasson 3
a-Foi realizado?	()Sim ()Não ()Ign	()Sim ()Não ()Ign	()Sim ()Não ()Ign
b. Data			
c. IG DUM			
d. IG USG			
e. Peso fetal			
f. Placenta			
g. Líquido			
h. CCN			
i. DiaBi			
j. outro			

Consulta nº	16.24 -Consulta 1	16.25 –Consulta 2	16.26 –Consulta 3	16.27 –Consulta 4	16.28 –Consulta 5
a – foi realizada	()Sim ()Não ()Ign				
b. Data					
c. IG semanas					
d. Peso					
e. IMC					
f. Pressão arterial					
g. Edema					
h. Altura uterina (cm)					
Apresentação					

i. BCF					
j. Movimento fetal					

Anexo II - Formulário de Relato de Caso do Recém-nascido

MATERNIDADE ESCOLA DA UFRJ

Formulário do RN

Dados do recém-nascido

Informações gerais

Nome: _____ Prontuário da criança: _____

Nome da Mãe: _____ Prontuário da mãe: _____

Endereço de residência durante gestação: _____ Bairro: _____

Passou algum período da gestação em outro endereço? Sim Não - Se sim, especificar o endereço e bairro: _____ Bairro: _____Data do parto: ____/____/____ Sexo: Masculino Feminino Indeterminado

Idade gestacional (DUM): ____ semanas ____ dias

Idade gestacional (US) : ____ semanas ____ dias USG()1o.trim USG()2o.trim USG()3o.trim

Idade gestacional (CAPURRO): ____ semanas ____ dias IG (NEW BALLARD): ____ semanas ____ dias

Classificação quanto à idade gestacional: Pré-termo Termo Pós-termoCrescimento intrauterino foi considerado: Normal Anormal

Trabalho de parto e líquido amniótico:

 gestação interrompida deliberadamente, por parto induzido ou cesárea, antes do início do trabalho de parto trabalho de parto anterior à rotura da bolsa amniótica trabalho de parto sucedeu a rotura da bolsa amniótica. Tempo de Bolsa rota (horas) : _____Líquido amniótico : Límpido Meconial Purulento Oligodramnia Adramnia Polidramnia Normodramnia Tipo de parto: Normal (Vaginal) Fórceps Cesáreo, indicação: _____**Circular de cordão** : Sim Não **Placenta: peso** _____**Intercorrência perinatal?** Sim Não – Se sim, qual: Hipóxico-isquêmico Hemorragia intracraniana Tocotraumatismo (especificar): hemorragia conjuntival ; lesões de pele; ferimentos cortocotusos de partes moles; bossa serossanguínea; céfalo-hematoma; fratura de clavícula; parestesia braquial e facial Outros, especificar _____

Índice de Apgar:	1º min:	5º min:	10º min:
Reanimação na Sala de Parto: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim - bolsa e máscara () intubação <input type="checkbox"/> MCE <input type="checkbox"/> Drogas <input type="checkbox"/>			

Drogas usadas na sala de Parto: _____**UTI-Neonatal:** Sim Não **Evolução:** alta hospitalar óbito. Data ____/____/____**Ocorreu óbito ?** Sim Não - Se sim, classificar de acordo com um dos grupos de Wigglesworth: Grupo 1 – Malformação congênita (grave ou letal / potencialmente letal)

- Grupo 2 – Morte fetal anteparto
- Grupo 3 – Morte intraparto ('asfixia', 'anóxia', sofrimento fetal agudo ou 'trauma')
- Grupo 4 – Imaturidade/ prematuridade
- Grupo 5 – Infecção
- Grupo 6 – Outras causas específicas de morte. Qual? _____
- Grupo 7 – Causa externa. Qual? _____
- Grupo 8 – Morte súbita
- Grupo 9 – Não classificada

Exame físico ao nascer

Peso (g):	Estatura (cm):	Perímetro cefálico: _____, ____ cm	Classificação: AIG [] PIG [] GIG []
------------------	-----------------------	--	--

D1 (12 a 24h de vida) : PC _____(xx,x cm)

Presença de malformações: Sim Não - Se sim, especificar:

- Aparelho cardiocirculatório Aparelho respiratório Aparelho digestivo Aparelho osteomuscular
- Órgãos genitais Sistema nervoso central

Descreva a malformação encontrada: _____

Houve outros achados clínicos? Sim Não

Se sim, especificar: _____

Distúrbios infecciosos : Sim Não **Registrar sorologias maternas em observações**

Sepsis neonatal Meningite Outros : _____

TORCH . Especificar : _____ Hepatite B (Hbs Ag____)

Rubéola (IgM:___IgG:___) CMV (IgM:___IgG:___) Herpes (IgM:___IgG:___)

HIV (anti HIV:___) Toxoplasmose (IgM:___IgG:___) Parvovírus B19 (IgM:___IgG:___)

Sífilis: VDRL (Sangue):___ VDRL (LCR)_____ FTAAbs_____

RX ossos longos:_____

Zika (_____) Dengue (_____) Chikungunya (_____)

Distúrbios hematológicos : Sim Não

Anemia - valor mínimo da hemoglobina_____ Icterícia - valor máximo da BT _____

Incompatibilidade ABO Incompatibilidade Rh Exsanguineotransusão

Policitemia Plaquetopenia Leucopenia

[] Outros : _____

Distúrbios endócrinometabólicos : [] Sim [] Não

[] Hipoglicemia neonatal [] Erro inato do metabolismo [] Hipotireoidismo congênito

[] Hiperglicemia neonatal [] Distúrbio eletrolítico. Especificar: _____

[] Outros : _____

Distúrbios respiratórios: [] Sim [] Não

[] Taquipneia transitória [] Doença de membrana hialina [] Displasia broncopulmonar

[] Síndrome de aspiração meconial [] Pneumonia

[] Hipertensão pulmonar (HPPRN) [] Pneumotórax [] Hemorragia pulmonar

[] Ventilação mecânica invasiva [] Ventilação mecânica não-invasiva

Distúrbios neurológicos : [] Sim [] Não

[] Encefalopatia hipóxico-isquêmica [] Hemorragia intracraniana [] Convulsão neonatal

[] Leucomalácia periventricular [] Outros : _____

Distúrbios gastrointestinais : [] Sim [] Não

[] Enterocolite necrosante [] Hemorragia digestiva [] Colestase

[] Outros : _____

Distúrbios cardiocirculatório : [] Sim [] Não

[] Parada cardiorrespiratória [] Choque com uso de aminas [] PCA

[] Cardiopatia Congênita. Especificar : _____

[] Outros : _____

Exames de imagem significativos : [] Sim [] Não

Tipo de exame: _____ data da realização: ___/___/___

Resultado: _____

Tipo de exame: _____ data da realização: ___/___/___

Resultado: _____

Triagem neonatal :

Teste do Reflexo Vermelho: normal duvidoso alterado Conduta: _____

Triagem para Cardiopatia Congênita Crítica (SpO2): normal alterado Conduta: _____

Triagem Auditiva (EOA): normal alterado Conduta: _____

Triagem Metabólica: ambulatorial colhido Data: _____

EXAME FÍSICO COMPLETO	
ANTROPOMETRIA	Peso: _____ g Estatura: _____ cm Perímetro Cefálico: _____ cm Classificação: <input type="checkbox"/> AIG <input type="checkbox"/> PIG <input type="checkbox"/> GIG
PELE E MUCOSAS	COR: <input type="checkbox"/> Corado <input type="checkbox"/> Pálido <input type="checkbox"/> Pletórico CIANOSE: <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Periférica <input type="checkbox"/> Central ICTERÍCIA: <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente LESÕES/SINAIS CUTÂNEOS:
CABEÇA E PESCOÇO	<input type="checkbox"/> Bossa serossanguínea <input type="checkbox"/> Cefalohematoma Local: SUTURAS: <input type="checkbox"/> Normais <input type="checkbox"/> Cavalgamento <input type="checkbox"/> Diatase FONT. ANTERIOR: <input type="checkbox"/> Plana <input type="checkbox"/> Abaulada <input type="checkbox"/> Deprimida Medida: FONT. POSTERIOR: <input type="checkbox"/> Palpável <input type="checkbox"/> Não palpável Medida: PALATO ÍNTEGRO: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não ORELHAS NORMOIMPLANTADAS: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não CLAVÍCULAS ÍNTEGRAS: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não OUTROS:
APARELHO RESPIRATÓRIO	RITMO: <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Irregular Frequência: _____ irpm DESCONFORTO: <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Intenso AUSCULTA: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Anormal: _____
APARELHO CARDIOVASCULAR	RITMO: <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Irregular Frequência: _____ bpm AUSCULTA: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Anormal: _____ PULSOS FEMURAIIS: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Anormal:
ABDOMEN	ASPECTO: <input type="checkbox"/> Plano <input type="checkbox"/> Globoso <input type="checkbox"/> Distendido <input type="checkbox"/> Escavado COTO UMBILICAL: <input type="checkbox"/> 2A+1V <input type="checkbox"/> 1A+1V <input type="checkbox"/> Outros: OUTROS:
GENITOURINÁRIO	GENITÁLIA: <input type="checkbox"/> Masculina <input type="checkbox"/> Feminina <input type="checkbox"/> Indiferenciada TESTÍCULOS TÓPICOS: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não: ÂNUS PERFURADO: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não MECÔNIO: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não DIURESE: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não OUTROS:
OSTEOARTICULAR	COLUNA ÍNTEGRA: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não: BARLOW: <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Positivo ORTOLANI: <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Positivo

	MEMBROS: normais <input type="checkbox"/> alterados <input type="checkbox"/>			
NEUROLÓGICO	ATITUDE: <input type="checkbox"/> Flexão dos 4 membros <input type="checkbox"/> Extensão dos 4 membros <input type="checkbox"/> Outros: MOTILIDADE: <input type="checkbox"/> Hipoativo <input type="checkbox"/> Tremores/Abalos <input type="checkbox"/> Convulsões <input type="checkbox"/> Paralisias TÔNUS: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Hipotonia <input type="checkbox"/> Hipertonia			
	REFLEXOS:	PRESENTE	ESBOÇADO	AUSENTE
	Moro			
	Preensão palmo-plantar			
	Busca			
	Sucção			
MALFORMAÇÕES	[] Sim [] Não			
Data: ____ / ____ / ____	Responsável (assinatura e carimbo):			

OBSERVAÇÕES:

2- Exposição ambiental da Criança												
2.1 Moradia												
2.1.1 – Qual o tipo de residência? () casa () apartamento () morador de rua () NS () NR												
2.1.1 a – Se casa, qual o tipo de construção? () Tijolo revestido () Tijolo () Taipa revestida com reboco () madeira () Material aproveitado () Material aproveitado () NA () NS () NR												
2.1.1b - Quantos cômodos tem na residência? _____												
2.1.1 c – Quantos cômodos tem janelas e/ou basculantes? _____												
2.1.1 d– Existe manchas de mofo na sua residência? () Não () Na sala () Nos quartos () Outro cômodo () NA () NS () NR												
2.1.1 e – Tem quintal na residência? () Sim () Não () NA () NS () NR												
2.1.1 .f– Algum familiar utiliza a residência como local de trabalho? () Sim () Não () NA () NS () NR												
2.1.1 f1 – Que atividade desenvolve?						() Serralheria						
() Pinturas e serviços automotivos						() serviços de eletrônica						
() Grafica						() NA						
() Cabeleleiro						() NS						
() artesanato						() NR						
() sapateiro						() OUTROS						
() marcenaria/carpintaria						Outros qual? _____						
2.1.1 g – O que utiliza para abastecer o fogão de sua casa? () gás () querosene () lenha () outro () NA () NS () NR												
2.1.1 .h– Costuma fazer churrasco na sua residência? () Sim () Não () NA () NS () NR												
2.1.1 .i– Utiliza carvão? () Sim () Não () NA () NS () NR												
2.1.1 .j– Com que frequência faz churrasco?	Por Mês				Por semana				Por dia			
	0	1	2	3	1-2	3-4	5-6	7	1	2-3	>3	
2.1.1 .k– Existe algum destes locais na mesma quadra/quarteirão de sua residência?												
() oficina de pintura () posto de gasolina () fábrica de plásticos () fábrica de isopor () outro () NA () NS () NR												

2.2 – Fonte de abastecimento de água para consumo											
2.2 a – Qual a fonte de abastecimento de sua água na sua residência?						() rede publica () carro pipa () poço ou nascentes () água da chuva () reservatório comunitário					
2.2 b – Utiliza filtro para a água de consumo?											
() Filtro de barro () filtro de carvão ativado () filtro não sei informar o tipo () Não, direto da bica () Não, água mineral () Não, apenas fervida () Não, apenas clorada () NS () NR											

2.3 Uso de álcool durante a lactação												
2.3.1 – Você consome alguma bebida com álcool desde que engravidou, mesmo sem saber que estava grávida?						() Sim () Não () NS () NR						
Se sim aponte o tipo e a frequência												
Tipo de bebida		Nunca	Por mês			Por semana				Por dia		
		0	<1 ou 1	2	3	1-2	3-4	5-6	7	1	2	>3
2.3.1 a - cerveja												
2.3.1 b - vinho												
2.3.1 c - Destilados (caipirinha, Ice, batidas, whisky)												
2.3.1 d - Outros												
2.4 Exposição ao tabaco – passivo												
2.4.1 – Você fumava antes de engravidar?						() Sim () Não () NS () NR						
2.4.1 a- Se sim, continuou fumando quando soube que estava grávida?						() Sim () Não () NA () NS () NR						
2.4.1 b- Quantos cigarros, em média, fuma por dia?						_____ () NA () NS () NR						
2.4.1 c- Seu marido/companheiro fuma?						() Sim () Não () NS () NR						
2.4.1 d- Quantos cigarros por dia, em média, seu marido/companheiro fuma?						_____ () NA () NS () NR						
2.4.1 e–Alguém de seu convívio fuma diariamente?						() Sim () Não () NS () NR						

2.5 Uso de drogas durante a lactação	
2.5.1 – Você usou drogas desde que engravidou, mesmo sem saber que estava grávida? () Sim () Não () NS () NR	
2.5.2.2 – Que droga utiliza?	
2.5.2 a – Maconha	() 1 vez sem () 2-3 vezes sem () diariamente () NA () NS () NR
2.5.2 b - LSD ou ácido	() 1 vez sem () 2-3 vezes sem () diariamente () NA () NS () NR
2.5.2 c - lança perfume ou Loló	() 1 vez sem () 2-3 vezes sem () diariamente () NA () NS () NR
2.5.2 d – Heroína	() 1 vez sem () 2-3 vezes sem () diariamente () NA () NS () NR
2.5.2 e – Crack	() 1 vez sem () 2-3 vezes sem () diariamente () NA () NS () NR
2.5.2 f – Cocaína	() 1 vez sem () 2-3 vezes sem () diariamente () NA () NS () NR
2.5.2 g - Cola de sapateiro	() 1 vez sem () 2-3 vezes sem () diariamente () NA () NS () NR
2.5.2 h - Comprimidos para dormir ou para ficar calma	() 1 vez sem () 2-3 vezes sem () diariamente () NA () NS () NR
2.5.2 i - Outra droga:	() 1 vez sem () 2-3 vezes sem () diariamente () NA () NS () NR
2.5.2 i 1 - Qual? _____	() 1 vez sem () 2-3 vezes sem () diariamente () NA () NS () NR

2.6 - Utensílios de cozinha	
2.6.1 – Utiliza potes de plástico para esquentar alimentos para a criança no micro-ondas ou banho maria? () Sim () Não () NS () NR	
2.6.1 .a– Se sim quantos dias por semana? () Todos os dias () 3 a 4 dias/semana () 1 a 2 dias/semana () NA () NS () NR	
2.6.1 b – Que tipo de panelas utiliza?() teflon () alumínio () ferro () barro () Cerâmica () Inox () NA () NS () NR	
2.6.1 b1 – Se outro tipo, qual? _____	
2.6.1 c Utiliza chupetas? () Sim () Não () NA () NS () NR	
2.6.1 c.1 Se sim, como esteriliza as chupetas ? micro-ondas () Panelas com água fervendo () tipo de panela _____ outra forma _____	
2.6.1 d Utiliza mamadeiras? () Sim () Não () NA () NS () NR	
2.6.1 d1 Se sim, como esteriliza as mamadeiras ? micro-ondas () Panelas com água fervendo () tipo de panela _____ outra forma _____	

2.7 Produtos utilizados no domicílio								
2.7.1 Faz uso dos produtos abaixo na sua residência? Se sim assinale a frequência?								
Produtos que utiliza	N	Por Mês			Por semana			
	0	1	2	3	1-2	3-4	5-6	7
2.7.1 a – Inseticida spray								
2.7.1 b– Inseticida elétrico								
2.7.1 c – Outros inseticidas químicos								
2.7.1 d–inseticidas naturais (citronela)								
2.7.1 e- Desinfetante (pinho bril, veja)								
2.7.1 f - Desengordurante (veja para cozinha)								
2.7.1 g – Cloro								
2.7.1 h - Água sanitária								
2.7.1 i – Cloroforme								
2.7.1 j – Lisoforme								
2.7.1 k - Outros produtos								
2.7.1 l– Faz uso de repelentes para o corpo na criança? () Sim () Não () NA () NS () NR								
2.7.1 l1 – Qual a marca/nome? _____								
2.7.1 m - Cultiva algum tipo de planta, alimentos, jardim? () Sim () Não () NA () NS () NR								
2.7.1 m1 – Utiliza algum produto para evitar pragas nas plantas, alimentos ou jardim? () Sim () Não () NA () NS () NR								
2.7.1 m2 – Que tipo de produto? () Natural () químico () NA () NS () NR								

3.1 Internações :**3.1.2 Internação:** 1. [] sim 2. [] não (somente ocorrências referentes ao período interconsulta)

a.1) Causa principal: _____ CID-10: _____

a.2) Idade: _____ meses a.3) Tipo: 1. [] pronto atendimento/emergência 2. [] eletiva/ambatório

3.1.3 Internação: 1. [] sim 2. [] não (somente ocorrências referentes ao período interconsulta)

a.1) Causa principal: _____ CID-10: _____

a.2) Idade: _____ meses a.3) Tipo: 1. [] pronto atendimento/emergência 2. [] eletiva/ambatório

4.0 Lista de desfechos no seguimento:**PRESENTES NA DATA DA CONSULTA E NO PERÍODO INTERCONSULTA****4.1 DESFECHOS RESPIRATÓRIOS**

	Data da consulta	Observação	Data da consulta	Observação	Data da consulta	Observação
	/ /		/ /		/ /	
Congestão nasal	[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :	
Coriza	[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :	
Espirro	[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :	
Tosse	[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :	
Estridor	[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :	
Sibilos	[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :	
Estertores	[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :	
Otalgia	[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :		[] Não [] Sim Idade :	

4.2 DESFECHOS CARDIOMETABÓLICOS**4.2.1 NASCIDO A TERMO**

Idade	Data da consulta	Peso	Escore Z	Comprimento	Escore Z	Peso/Comp	Escore Z
Nascimento	/ /						
1 mês	/ /						
3 meses	/ /						
6 meses	/ /						

Idade	Data	PC	Escore Z	IMC	Escore Z	Circunf. do braço	Escore Z
Nascimento	/ /						
1 mês	/ /						
3 meses	/ /						
6 meses	/ /						

* **Denver, assinalar:** P = Passou; F = Falha; NO = Não teve oportunidade ; R = Recusou fazer o teste ; C = Cautela (resultados F ou R situados entre o Percentil 75-90% das crianças); A= Atraso (resultados F ou R situados totalmente à esquerda da linha da idade- **nesse caso, pintar a o final do retângulo**)

Interpretação: NORMAL (Nenhum ATRASO e no máximo um CAUTELA. Retestar na próxima consulta);
SUSPEITO(Duas ou mais CAUTELAS e/ou um ou mais ATRASOS.Encaminhar para avaliação especializada);**NÃO TESTÁVEL**(Um ou mais itens classificados como "R" (recusa) localizados totalmente à esquerda da linha da idade ou mais de um localizado entre o Percentil 75%-90%..

OBS : Itens NO não são considerados na interpretação do teste

Observações

ANEXAR AS SEGUINTE ESCALAS PREENCHIDAS A ESTE FRC:

- CURVAS DE CRESCIMENTO
- GRÁFICO DE DENVER II
- CALENDÁRIO DE VACINAÇÃO

ENCAMINHAMENTOS E/OU CONDUTAS (SE NECESSÁRIOS)

DATA	ENCAMINHAMENTO	CONDUTA	PEDIATRA/CARIMBO
/ /			
/ /			
/ /			

RESPONSÁVEIS PELOS ATENDIMENTOS

DATA	ALUNO 1	ALUNO 2	OUTRO	PEDIATRA/CARIMBO
/ /				
/ /				
/ /				
/ /				