



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA E SAÚDE**



**MARIANA VIDAL PONTES**

**IMPORTÂNCIA DOS PREBIÓTICOS, ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO  
E  $\beta$ -GLUCANO NA IMUNOMODULAÇÃO E INCIDÊNCIA DE  
INFECÇÕES E MANIFESTAÇÕES ALÉRGICAS EM PRÉ-  
ESCOLARES**

**TESE DE DOUTORADO**

**Salvador  
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA E SAÚDE**



**MARIANA VIDAL PONTES**

**IMPORTÂNCIA DOS PREBIÓTICOS, ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO  
E  $\beta$ -GLUCANO NA IMUNOMODULAÇÃO E INCIDÊNCIA DE  
INFECÇÕES E MANIFESTAÇÕES ALÉRGICAS EM PRÉ-  
ESCOLARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do título de Doutor em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Hugo da C. Ribeiro

Salvador

2017

Pontes, Mariana Vidal  
Importância dos prebióticos, ácido docosahexaenóico e beta-glucano na imunomodulação e incidência de infecções e manifestações alérgicas em pré-escolares / Mariana Vidal  
Pontes. -- Salvador, 2017.  
105 f.

Orientador: Hugo da Costa Ribeiro Júnior.  
Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde) -- Universidade Federal da Bahia, UFBA, 2017.

1. DHA. 2. Prebióticos. 3. Beta-glucano. 4. Manifestações alérgicas. 5. Crianças. I. Júnior, Hugo da Costa Ribeiro. II. Título.

**MARIANA VIDAL PONTES**

**IMPORTÂNCIA DOS PREBIÓTICOS, ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO  
E  $\beta$ -GLUCANO NA IMUNOMODULAÇÃO E INCIDÊNCIA DE  
INFECÇÕES E MANIFESTAÇÕES ALÉRGICAS EM PRÉ-  
ESCOLARES**

Tese de autoria de Mariana Vidal Pontes intitulada Importância dos prebióticos, ácido docosaheptaenóico e  $\beta$ -glucano na imunomodulação e incidência de infecções e manifestações alérgicas em pré-escolares, apresentada a Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Medicina e Saúde.

Salvador, 26 de maio de 2017

**BANCA EXAMINADORA**

Dra. Ângela Peixoto de Mattos (UFBA)

Doutora em Pediatria e Ciências Aplicadas à Pediatria pela UNIFESP

Dra. Graciete Oliveira Vieira (UEFS)

Doutora em Medicina e Saúde pela UFBA

Dra. Maria Efigênia de Queiroz Leite (UFBA)

Doutora em Medicina e Saúde pela UFBA

Dr. Ney Cristian Amaral Boa Sorte (UNEB)

Doutor em Saúde Coletiva pela UFBA

Dra. Tereza Cristina Medrado Ribeiro (UFBA)

Doutora em Medicina e Saúde pela UFBA

*Ao meu amado filho Guilherme, fonte de inspiração, força e perseverança para as grandes batalhas da vida, e à minha querida mãe Maria, por todo o seu amor incondicional e dedicação.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me amparar em todos os momentos difíceis, dando-me força e coragem para nunca desistir.

À minha mãe Maria Souza, mulher sábia, grande incentivadora e que sempre primou pela minha educação.

À minha irmã Eliana Ecotti, por todo o apoio dispensado e paciência, principalmente nos momentos mais difíceis enfrentados ao longo desse processo.

À minha irmã Márcia Pontes, pelo grande exemplo de profissional dedicado e competente, além de ser humano sempre disposto a ajudar o próximo.

À meu querido orientador Prof. Dr. Hugo Ribeiro, por todas as oportunidades de crescimento profissional e pessoal, pelo grande apoio e confiança em meu trabalho, sempre me incentivando a superar desafios.

À *Mead Jonshon Company*, por me possibilitar participar de cada etapa de uma pesquisa tão grandiosa, que resultou neste trabalho final.

À toda a equipe das creches Mansão do Caminho e Pupileira, em especial às coordenadoras Clese Cerqueira e Lícia Valente, que com muita generosidade e parceria permitiram a realização do estudo nas instituições referidas.

À todas as crianças e pais que aceitaram participar do estudo, estabelecendo uma relação de confiança necessária para o sucesso da coleta de dados.

À grande equipe executora deste estudo: Dra. Tereza Ribeiro, Dra. Ângela Mattos, Dra. Indhira Ribeiro, Dra. Iraci Medrado, as nutricionistas Vívian Leal e Gabriela Cabral, além de todos os estagiários de nutrição, pela seriedade, empenho, comprometimento e dedicação na coleta dos dados, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora Dra. Ângela de Mattos, Dra. Graciete Vieira, Dra. Maria Efigênia Leite, Dr. Ney Cristian Amaral e Dra. Tereza Ribeiro, pelas valiosas contribuições para construção deste trabalho final.

À minhas queridas colegas nutricionistas da Unidade Metabólica Andréa Magarão, Carolina Coelho, Carla Danusa Luz, Maria Efigênia Leite e Núbia Cruz, por todo o apoio e incentivo dispensados nos momentos em que mais precisei.

À todos os demais colegas de trabalho da Unidade Metabólica, pela amizade, carinho e incentivo diários.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

## **FONTE DE FINANCIAMENTO**

1. Mead Johnson & Company



## RESUMO

Objetivo: Avaliar se o consumo de um composto lácteo contendo ácido docosahexaenóico (DHA), prebióticos e beta-glucano, e suplementado com outros micronutrientes, reduz a incidência de infecções respiratórias, diarreia e manifestações alérgicas (MA) em crianças saudáveis. Secundariamente, comparou-se entre os grupos: crescimento, aceitação da fórmula, marcadores imunológicos no soro e nas fezes, zinco e ferritina séricos, e incidência de eventos adversos (EA). Métodos: Estudo randomizado, controlado e duplo-cego, envolvendo crianças saudáveis de 1 a 4 anos de idade, de duas creches filantrópicas em Salvador-BA, alimentadas com três doses/dia de um composto lácteo (teste; n = 125) contendo DHA, prebióticos (polidextrose/PDX e galactooligossacarídeos/GOS), beta-glucano e outros nutrientes essenciais, ou uma bebida à base de leite de vaca controle (controle; n = 131) por 28 semanas. A ocorrência de infecções respiratórias, doença diarreica e MA foi avaliada pelos pediatras do estudo e o número de episódios foi analisado através do teste de Cochran-Mantel-Haenszel e do modelo de Andersen-Gill. Resultados: O grupo teste apresentou menos episódios de MA, que incluíam rinite alérgica ou conjuntivite, broncoespasmo, tosse alérgica, eczema e urticária, em comparação com o grupo controle (p = 0,021). A razão de risco (HR) do aumento do número de episódios de MA foi menor no grupo teste em relação ao grupo controle (HR, 0,64; IC 95% de 0,47-0,89; p = 0,007). Não houve diferença na incidência de infecções respiratórias e doença diarreica entre os grupos. Os grupos foram semelhantes estatisticamente quanto ao crescimento, ingestão da fórmula (12-24 meses: p=0,32; 25-48 meses: p=0,06) e ocorrência da quase totalidade de eventos adversos, o que apoia a segurança da fórmula testada e sua boa aceitação. Quanto às análises laboratoriais, não houve diferenças entre os grupos em relação aos marcadores imunológicos no soro (IL-10, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, IL-4 e INF- $\gamma$ ) e nas fezes (IgA secretória), zinco (p=0,82) e ferritina (p=0,148) séricos, e células periféricas da série vermelha e branca. Conclusão: Um composto lácteo contendo DHA, PDX/GOS e  $\beta$ -glucano de levedura e suplementado com micronutrientes, incluindo zinco, vitamina A e ferro, quando consumido três vezes/dia durante 28 semanas por crianças saudáveis de um a quatro anos de idade foi associado a menos episódios de manifestações alérgicas. Entretanto, não foi identificado efeito sobre os marcadores imunológicos e contagem de células imunes efetoras.

**Palavras-chave:** DHA. Prebióticos.  $\beta$ -glucano de levedura. Manifestações alérgicas. Crianças.

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate whether the intake of a dairy compound containing docosahexaenoic acid (DHA), prebiotics and beta-glucan, and supplemented with other micronutrients, reduces the incidence of respiratory infections, diarrhea and allergic manifestations (AM) in healthy children. Secondly, the following variables were compared between groups: growth, acceptance of the formula, immunological markers in serum and faeces, zinc and ferritin, and incidence of adverse events (AE). **Methods:** A randomized, controlled, double-blind study involving healthy infants aged 1 to 4 years, from two philanthropic day care centers in Salvador-Bahia, fed three doses/day of a dairy compound (test: n = 125) containing DHA, prebiotics (polydextrose/PDX and galactooligosaccharides/GOS), beta-glucan and other essential nutrients, or a control cow's milk beverage (control; n = 131) for 28 weeks. The occurrence of respiratory infections, diarrheal disease and AM was evaluated by the study pediatricians and the number of episodes was analyzed through the Cochran-Mantel-Haenszel test and the Andersen-Gill model. **Results:** The test group had fewer episodes of AM, which included allergic rhinitis or conjunctivitis, bronchospasm, allergic cough, eczema and urticaria, compared to the control group (p = 0.021). The risk ratio (HR) for the increase in the number of episodes of AM was lower in the test group than in the control group (HR, 0.64, 95% CI 0.47-0.89, p = 0.007). There was no difference in the incidence of respiratory infections and diarrheal disease between groups. The groups were statistically similar in growth, ingestion of the formula (12-24 months: p = 0.32, 25-48 months: p = 0.06) and occurrence of almost all adverse events, which supports the safety of the tested formula and its good acceptance. There were no differences between the groups regarding serum immunological markers (IL-10, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, IL-4 and INF- $\gamma$ ) and feces (secretory IgA), zinc (p = 0.82) and serum ferritin (p = 0.148), and red and white peripheral cells. **Conclusion:** A dairy compound containing DHA, PDX / GOS and yeast  $\beta$ -glucan and supplemented with micronutrients, including zinc, vitamin A and iron, when consumed three times a day for 28 weeks by healthy children aged one to four years was associated with fewer episodes of allergic manifestations. However, no effect on immunological markers and immune effector cell counts was identified.

**Keywords:** DHA. Prebiotics. Yeast  $\beta$ -glucan. Allergic manifestations. Children.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Pediatria
AG	Ácido graxo
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AGPICL	Ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa
ARA	Ácido araquidônico
BG	Beta-glucano
CL	Composto lácteo
COX	Enzima ciclooxigenase
DHA	Ácido docosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOS	Frutooligossacarídeo
GOS	Galactooligossacarídeo
IgA	Imunoglobulina A
IgAs	Imunoglobulina A secretora
IL	Interleucina
IRA	Infecção respiratória aguda
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
LH	Leite humano
LOX	Enzima lipoxigenase
LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
MS	Ministério da Saúde
NF- $\kappa$ B	<i>Factor de transcrição nuclear kappa B</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OND	Oligossacarídeo não digerível
PDX	Polidextrose
PG	Prostaglandina
PGI	Prostaciclina
PNDS	Pesquisa Nacional de Desenvolvimento e Saúde
SBP	Sociedade Brasileira de Pediatria
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	Linfócito T helper
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TX	Tromboxano
UFC	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS	
	2.1 Geral.....	13
	2.2 Específicos.....	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	
	3.1 Epidemiologia da doença diarréica, da IRA e doenças alérgicas.....	14
	3.2 A importância da nutrição para o crescimento, desenvolvimento e maturação do sistema imunológico infantil .....	18
	3.3 O papel da microbiota na homeostase imunológica.....	23
	3.4 Prebióticos.....	29
	3.5 Ácido Docosahexaenóico (DHA).....	39
	3.6 Beta-Glucano.....	47
4	METODOLOGIA.....	52
5	RESULTADOS	
	5.1 Artigo original.....	57
6	DISCUSSÃO .....	67
7	CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	APÊNDICE.....	91
	ANEXOS.....	92

## 1 INTRODUÇÃO

Os primeiros 5 anos de vida são marcados por crescimento acelerado e imaturidade fisiológica e imunológica, sendo altas as exigências de macro e micronutrientes, o que torna esse período de grande vulnerabilidade aos agravos nutricionais. A nutrição adequada assume papel relevante não somente para garantia do crescimento e desenvolvimento saudáveis, mas também para uma defesa imunológica eficaz. Inadequações no consumo de nutrientes podem comprometer o estado nutricional e levar ao desenvolvimento de carências nutricionais, com consequente prejuízo à resposta imunológica.

As doenças carenciais aumentam a suscetibilidade infantil à diarreias e infecções, além de poder comprometer a maturação do sistema nervoso, visual, mental e intelectual. Vale enfatizar que, em menores de 5 anos, fatores relacionados à nutrição são responsáveis por 11% do total de doenças no mundo, e mesmo a dieta de crianças aparentemente bem nutridas em países desenvolvidos pode não atender completamente às recomendações nutricionais.

As infecções respiratórias agudas (IRAs) e gastrointestinais continuam sendo as principais causas de morbidade e mortalidade em crianças menores de cinco anos e, nas últimas décadas, observa-se uma mudança no perfil da carga de doença, com aumento progressivo na prevalência e na gravidade de doenças alérgicas em crianças de países ocidentais.

A idade de 1 a 3 anos é considerada de maior risco a inadequações nutricionais, por ser um período de transição do aleitamento materno complementado ao consumo regular de uma variedade de alimentos familiares. Visando garantir a ingestão suficiente de nutrientes chaves para o desenvolvimento infantil (vitaminas A, D e E, zinco, ferro e ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, entre outros), compostos lácteos vêm sendo desenvolvidos para uso em substituição ao leite de vaca integral em crianças de 1 a 5 anos.

Diante do exposto, tem crescido o interesse científico sobre os alimentos funcionais, que são aqueles capazes de proporcionar benefícios adicionais à saúde do indivíduo, além do cumprimento de seu potencial básico nutritivo. Alguns nutrientes

\*Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. Lancet. 2008; 371:243-60.

têm sido associados à modulação do sistema imunológico, ajudando na prevenção e combate à algumas doenças. Dentre eles destacam-se o ácido docosahexaenóico (DHA), os prebióticos e o  $\beta$ -glucano (BG) que, através de diferentes mecanismos, têm demonstrado propriedades imunomodulatórias.

Os prebióticos estimulam seletivamente bactérias benéficas no cólon e demonstram promover alguns benefícios à saúde do sistema imune em crianças com alto risco de alergia, além de induzir à produção de níveis mais elevados de imunoglobulina A secretora (IgAs), importantes para a reação adequada à patógenos intestinais e alérgenos alimentares. Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPICL) são precursores de mediadores relacionados à inflamação, sendo capazes de modular as respostas imunológicas. Os efeitos propostos dos BG para a saúde estão relacionados ao aumento da imunidade pela ativação de células do sistema imune, com consequente produção de citocinas capazes de modular tanto a imunidade inata quanto à adaptativa.

Diversos estudos têm avaliado o impacto dos prebióticos, DHA e BG, de forma associada ou isolada, sobre a ocorrência de doenças em crianças, sendo empregadas diferentes doses por variados períodos de intervenção.

Com base na possível função sugerida dos prebióticos, AGPICL e BG em respostas imunes saudáveis, o objetivo deste estudo é avaliar se o acréscimo de uma mistura de prebióticos, DHA e  $\beta$ -1,3;1,6-glucanos em um composto lácteo (CL) apresenta efeito sobre a ocorrência de infecção respiratória, diarreia e doenças alérgicas em crianças de 1 a 4 anos de idade. Esse produto será comparado a um leite de vaca em pó suplementado com alguns micronutrientes, de forma a atender às exigências do *Codex Alimentarius*. Todos os outros alimentos da dieta das crianças deste estudo foram adequados para a respectiva idade de cada participante e nutricionalmente balanceados com relação aos macro e micronutrientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Determinar se o consumo de um composto lácteo contendo prebióticos, DHA e  $\beta$ -glucano apresenta efeito sobre a ocorrência de IRA, doença diarréica e/ou manifestações alérgicas.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Comparar entre os grupos do estudo:

- Crescimento
- Aceitação do produto do estudo
- Incidência de eventos adversos
- Frequência das evacuações e consistência das fezes
- Marcadores imunológicos nas fezes e no soro
- Ferritina e zinco séricos
- Células sanguíneas periféricas
- Uso de antibiótico sistêmico

Avaliar na população geral do estudo:

- Incidência de parasitas nas fezes

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Epidemiologia da doença diarréica, da IRA e doenças alérgicas

As doenças diarréicas e infecções respiratórias continuam sendo as principais causas de morbidade e mortalidade em crianças menores de cinco anos. Estima-se que, em 2013, 6,3 milhões de nascidos vivos em todo o mundo morreram antes de completarem 5 anos de vida e que cerca de metade destes (51,8%) morreu de causas infecciosas. Infecções respiratórias e diarreia foram as principais causas infecciosas sendo responsáveis por 14,9% e 9,2%, respectivamente, do total de óbitos em crianças menores de 5 anos<sup>1</sup>.

IRAs constituem o grupo mais comum de doenças agudas que ocorre durante a primeira infância, com uma mediana de 5 episódios de infecção do trato respiratório superior por ano<sup>2</sup>. Estudos<sup>3,4</sup> apontam que nos países em desenvolvimento as IRAs tendem a ser mais graves e operam como componente considerável tanto na morbidade quanto na mortalidade, concentrando cerca de 20 a 40% das consultas em serviços de pediatria, 12 a 35% das internações hospitalares e 19% das mortes.

Segundo Cardoso<sup>5</sup>, as IRAs persistem como problema de saúde pública e o Brasil se destaca como um dos países com maior número de casos anuais de pneumonia clínica em menores de cinco anos (1,8 milhão). Nesse grupo, 30 a 50% das consultas ambulatoriais, mais de 50% das hospitalizações e de 10 a 15 % dos óbitos são atribuídos às IRAs, sendo 80% destes por pneumonia.

A doença diarréica é a segunda maior causa de mortes na infância, representando em torno de 1,5 milhões de óbitos anuais em crianças menores de 5 anos no mundo<sup>6</sup>. A morbidade e a mortalidade associadas à diarreia ainda são um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento<sup>6,7</sup> e, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>8</sup>, o grupo de crianças na faixa etária de 0 a 3 anos experimenta três episódios de diarreia por ano, contabilizando no seu 3º ano de vida aproximadamente dez quadros diarréicos.



O grupo etário mais vulnerável às diarreias corresponde às crianças de 0 a 5 anos de idade<sup>9</sup>, sendo os menores de 1 ano os mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença<sup>10</sup>. No Brasil, entre 2000 e 2011, foram notificados 33 milhões de casos de diarreia em menores de 5 anos<sup>11</sup> e, segundo dados do Sistema de Informação Hospitalar do Ministério da Saúde, no período de 2008 a 2010, foram registradas cerca de 582 mil internações por diarreia em menores de 4 anos<sup>12</sup>. Nos 81 municípios brasileiros com população maior que 300 mil habitantes, 50% das internações em menores de 5 anos de idade foram em decorrência da diarreia, e 16 destes 81 municípios superaram esta taxa para 70%<sup>9</sup>.

A maioria das mortes por diarreias no mundo (88%) é causada por sistemas inadequados de saneamento, sendo que mais de 99% destas mortes ocorrem em países em desenvolvimento<sup>6</sup>.

Há consistente tendência de redução da mortalidade infantil em todas as regiões brasileiras, decorrente principalmente do efeito de intervenções públicas nas áreas de saúde, saneamento e educação materna. No período de 1990-2008, a taxa de mortalidade de crianças menores de 5 anos diminuiu 28% no mundo e 61% no Brasil<sup>13</sup>. Ainda assim, os valores médios continuam elevados, sobretudo nas regiões Nordeste e Norte. No Nordeste do país, a taxa chega a ser o dobro da observada na região Sul, de acordo com o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde (MS)<sup>14</sup>.

A análise de estudos de morbidade e mortalidade por diarreia na África, América Latina e Ásia entre os anos de 1982 a 2000, indicou tendências decrescentes nos óbitos em menores de 5 anos por esta doença, porém a morbidade manteve-se alta nessas três décadas<sup>15,16</sup>. Ainda assim, é a segunda causa de morte e principal de desnutrição em crianças menores de cinco anos, segundo relatório de 2015 do Fundo das Nações Unidas para Infância (UNICEF)<sup>17</sup>.

Assim como vem ocorrendo com as infecções gastrointestinais, Rodrigues et al<sup>18</sup> relatam que as mortes por pneumonia no período de 1991-2007 diminuíram 56% entre crianças brasileiras de 1 a 4 anos.

Diversos estudos sugerem que frequentar uma creche é um importante fator de risco para infecções tanto respiratórias quanto gastrointestinais<sup>19,20</sup>. Cerca de 89% das ausências à creche relacionadas à doenças são decorrentes de infecções, das quais 60% a 70% devido à infecções respiratórias<sup>21</sup>.

Nas últimas décadas tem ocorrido uma mudança drástica no perfil da carga de doenças no mundo desenvolvido, com aumento progressivo nos problemas de saúde imunomediados e relacionadas com o intestino (tais como alergias, doenças inflamatórias e auto-imunes), deixando de predominar as infecções<sup>22</sup>. Estudos demonstram que a prevalência e a gravidade da asma e outras doenças alérgicas, tais como rinite e eczema, estão aumentando não só em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, apesar de avanços no conhecimento etiológico, nos mecanismos envolvidos e nos vários tratamentos<sup>23,24</sup>. Estima-se que até 20% da população sofre de uma condição alérgica, tais como dermatite atópica, alergias alimentares, asma, rinite alérgica e/ou conjuntivite<sup>25</sup>.

Segundo a Hipótese da Higiene, o aumento da prevalência de doenças alérgicas vem sendo associado às alterações no estilo de vida ocidental (melhorias no saneamento básico, imunização, uso de antibióticos e ingestão dietética modificada)<sup>26</sup>. Para esta hipótese, o desequilíbrio da resposta linfocítica T helper 1 / T helper 2 (Th1/Th2) justifica o aumento de doenças crônicas e alérgicas em sociedades desenvolvidas, cujas famílias com maior renda apresentam melhores condições de higiene, isolamento social, uso frequente de antibióticos e vacinação imunizante, contato excessivo com agrotóxicos e menos exposição ao ambiente rural<sup>27</sup>. Estes fatores limitam o contato das crianças com patógenos diversos e impedem a manifestação de doenças infecciosas agudas na primeira infância, inibindo a ação de linfócitos Th1 e favorecendo a ativação de linfócitos Th2, responsáveis pelas manifestações alérgicas crônicas<sup>28</sup>.

Entretanto, alguns pesquisadores têm refutado a hipótese da higiene ao associar a ocorrência de infecções respiratórias na infância precoce ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças alérgicas<sup>29,30</sup>. Estudo desenvolvido por Rantalla et al<sup>30</sup> sugere que a prevenção de infecções respiratórias na infância pode reduzir o desenvolvimento de asma na infância bem como na vida adulta.

As doenças alérgicas são mais prevalentes entre crianças do que nos adultos. Em todo o mundo, doenças alérgicas respiratórias por si só, mais especificamente asma e rinite alérgica, afetam cerca de 700 milhões de indivíduos<sup>31</sup>. Tem sido claramente relatado que a prevalência destas doenças tem aumentado nas últimas décadas, mas em taxas diferentes, em várias áreas do mundo<sup>31</sup>.

O Brasil é um dos países com maior prevalência das doenças alérgicas, quando comparado à América Latina e o restante do mundo<sup>32</sup>, sendo as taxas mais elevadas observadas nas regiões Norte e Nordeste.

Formatado: Português (Brasil)

De acordo com o Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância fase 3 (ISAAC)<sup>33</sup>, realizado no Brasil, a prevalência média de sintomas relacionados à rinite é de 25,7% entre escolares, estando o país no grupo com as maiores taxas mundiais de prevalência, tanto em asma como em rinite. Observa-se que as prevalências de rinoconjuntivite e eczema continuam aumentando, ao contrário da de asma, que demonstrou uma tendência de redução<sup>23,34</sup>.

É enorme o impacto das doenças alérgicas em indivíduos afetados, nas suas famílias e sociedades. Elas afetam negativamente a qualidade de vida e aumentam a taxa de comorbidades e risco de morte, como notado na asma<sup>31,35</sup>. Além disso, o ônus econômico dessas doenças é considerável. Isto é normalmente relacionado com o substancial custo médico direto (visitas à emergência, visitas ao consultório médico, internações, laboratório de diagnóstico e propedêutica radiológica, e outras modalidades de tratamento) e os custos médicos indiretos (numerosas ausências do trabalho ou da escola, redução da produtividade e do desempenho escolar)<sup>31,35</sup>.

Importante destacar a importância do estado nutricional infantil na função imunológica. As crianças desnutridas têm um risco aumentado de adoecer e morrer por doenças infecciosas, e estima-se que a desnutrição seja a causa subjacente de 45% das mortes globais em crianças com menos de 5 anos de idade<sup>36</sup>. A associação entre desnutrição e infecções deve-se, principalmente, a uma relação de causalidade bidirecional, na qual a desnutrição compromete as defesas imunológicas do hospedeiro facilitando a instalação de processos infecciosos,

enquanto as infecções agravam a desnutrição por diminuir o apetite, induzir ao catabolismo e aumentar a demanda de nutrientes<sup>37</sup>.

Diante da grande vulnerabilidade infantil decorrente de imaturidade imunológica, o que implica em elevadas prevalências de infecções e doenças alérgicas em menores de 5 anos, e considerando as demandas nutricionais aumentadas necessárias para garantir a expressão plena de seu potencial genético, destaca-se a nutrição infantil adequada como imprescindível para assegurar um crescimento e desenvolvimento adequados. Crianças menores de 5 anos necessitam, mais do que qualquer outro grupo da população, de boas condições de vida e bem-estar para a prevenção e promoção da saúde.

### 3.2 A importância da nutrição para o crescimento, desenvolvimento e maturação do sistema imunológico infantil

As crianças representam um grupo de grande vulnerabilidade devido ao crescimento rápido e à imaturidade fisiológica e imunológica<sup>38</sup>, com a nutrição adequada nos primeiros anos de vida assumindo papel fundamental para o crescimento e o desenvolvimento saudáveis. Inadequações no consumo de nutrientes podem comprometer o estado nutricional, com conseqüente prejuízo à função imune. Crianças desnutridas apresentam alterações na defesa imunológica, tornando-as mais susceptíveis às infecções, instalando-se, assim, um círculo vicioso<sup>37</sup>.

As deficiências de nutrientes são fatores de risco à saúde e sobrevivência de grupos vulneráveis, em especial os pré-escolares, sendo, em geral, causadas pela ingestão dietética insuficiente. Em um contexto geral, os micronutrientes são indispensáveis à promoção do crescimento físico, à maturação sexual, ao desenvolvimento neuromotor e à integridade e funcionamento do sistema imune. Assim, o completo potencial genético de uma criança para o crescimento físico e o desenvolvimento mental pode ser comprometido devido a deficiências subclínicas de micronutrientes<sup>39</sup>.

Países de renda média têm experimentado um rápido declínio da desnutrição com um concomitante aumento do excesso de peso da população, processo esse

conhecido por transição nutricional<sup>40</sup>. A partir da comparação de dois inquéritos probabilísticos de abrangência nacional (1996 e 2006/7), Monteiro et al<sup>41</sup> evidenciaram redução de cerca de 50% na prevalência da desnutrição infantil no Brasil. Esse processo de transição vem sendo atribuído ao aumento da ingestão calórica diária através do consumo aumentado de alimentos ultraprocessados, com altos teores de gorduras, sódio e açúcar e com baixo teor de micronutrientes, associado à redução considerável no consumo de carboidratos complexos, frutas, verduras e legumes. O consumo médio de frutas e hortaliças ainda é metade do valor recomendado pelo Guia Alimentar para a população brasileira. Esse fato gera um quadro de excesso calórico por conta da elevada ingestão de macronutrientes, porém com ingestão insuficiente de micronutrientes<sup>40</sup>.

Embora déficit de peso esteja se tornando menos prevalente, outras formas de desnutrição ainda coexistem em crianças de peso normal e com obesidade<sup>42</sup>. A deficiência de micronutrientes é a forma mais prevalente de subnutrição em todo o mundo<sup>43</sup>. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO)<sup>44</sup>, cerca de 800 milhões de pessoas permanecem cronicamente subnutridas e mais de 2 bilhões sofrem de deficiências de micronutrientes.

No estudo de Jardim-Botelho et al<sup>42</sup>, as frequências de deficiências de micronutrientes encontradas em crianças de baixa renda no Brasil foram maiores do que as taxas nacionais<sup>45</sup> e independentes dos escores Z de peso-para-estatura. Nesse estudo, quase todas as crianças (97%) tiveram no mínimo deficiência de um micronutriente: 67% apresentaram anemia; 58% deficiência de zinco e 91% deficiência de selênio.

Estudos sobre consumo alimentar com crianças matriculadas em creches de diferentes regiões do país têm mostrado baixa ingestão dietética de alguns nutrientes como cálcio, ferro, zinco, vitamina A, fibras e energia<sup>46</sup>. Adverte-se, assim, a probabilidade de carências nutricionais nas crianças institucionalizadas, considerando a influência da composição da dieta infantil no estado nutricional. Bueno et al<sup>47</sup>, ao avaliarem a prevalência de risco nutricional entre 3058 crianças de 2 a 6 anos, matriculadas em escolas públicas e privadas de nove cidades brasileiras, identificaram que mesmo as crianças com os níveis socioeconômicos mais elevados

apresentavam ingestão inadequada de fibras (prevalência de inadequação em torno de 22%) e micronutrientes, incluindo cálcio (aproximadamente 45%) e vitaminas D (mais de 90%) e E (15 a 29%).

Uma revisão sistemática concluiu que crianças menores de 5 anos, aparentemente bem nutridas, de países desenvolvidos, têm uma alimentação inadequada para atender às recomendações, colocando-as em risco nutricional<sup>48</sup>.

As doenças carenciais aumentam a suscetibilidade infantil a diarreias e infecções, além de poder comprometer a maturação do sistema nervoso, visual, mental e intelectual<sup>49</sup>. A ingestão inadequada de alguns nutrientes pode estar associada a diferentes prejuízos na capacidade normal de defesa celular e/ou humoral, bem como na predisposição à doenças alérgicas<sup>50</sup>.

A presença de radicais livres parece ter papel relevante no desenvolvimento de doenças relacionadas ao sistema imunológico, por induzir reações de oxidação capazes de lesar as estruturas dos sistemas biológicos. Esse estresse oxidativo pode resultar do excesso na produção oxidante ou da depleção das defesas antioxidantes. Tais defesas são constituídas por AGPCL, substâncias hidrossolúveis e enzimas, e derivam principalmente da dieta, como no caso das vitaminas E, C, carotenóides, e dos elementos-traço zinco, cobre e selênio. Outros componentes importantes da defesa antioxidante são as enzimas, cuja ação normalmente está vinculada à um micronutriente: superóxido-dismutase (dependente de cobre, zinco e manganês), glutathione peroxidase (dependente de selênio) e catalase. Além de suprimirem o componente inflamatório, os antioxidantes podem estimular a resposta imunológica celular, ocorrendo o inverso quando as defesas antioxidantes estão diminuídas<sup>51</sup>.

Apesar de não haver evidências claras sobre os benefícios de uma dieta rica em antioxidantes sobre a prevenção de alergias, existem indícios de seu potencial papel protetor. Em um momento em que as doenças alérgicas vêm ocupando um papel de crescente destaque global, a orientação de uma dieta balanceada e equilibrada em macro e micronutrientes poderá ser medida preventiva adicional a outras já bem estabelecidas<sup>50</sup>. Vale ressaltar que as deficiências de nutrientes modulam

mecanismos epigenéticos chaves que aumentam o risco de doenças crônicas no futuro<sup>52</sup>.

O Brasil situa-se entre os países de maior prevalência em deficiências nutricionais, sendo a região Nordeste a mais pobre do país e onde as crianças pequenas que vivem em favelas urbanas de baixa renda estão em maior risco de deficiências de micronutrientes e morbidade<sup>53-55</sup>. As deficiências de ferro e vitamina A são as carências mais observadas no Brasil e representam um problema de saúde pública<sup>45</sup>. Dados da Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS), feita em 2006, apresentam prevalência de anemia de 20,9% e níveis inadequados de vitamina A de 17,4% em crianças menores de cinco anos<sup>45</sup>.

Segundo revisão sistemática<sup>56</sup> realizada em 2015, o consumo alimentar de crianças brasileiras é marcado por elevadas prevalências de inadequação no consumo de micronutrientes, sobretudo ferro, vitamina A e zinco. A prevalência de inadequação variou de 0,4% a 65% para o ferro, de 20% a 59,5% para a vitamina A, de 20% a 99,4% para o zinco, de 12,6% a 48,9% para o cálcio e de 9,6% a 96,6% para a vitamina C. Esses dados revelam a baixa qualidade da dieta dessas crianças que, embora tenham aporte energético até acima das recomendações, apresentam carências nutricionais expressivas em termos de micronutrientes, sendo por isso necessária a suplementação de alimentos habitualmente consumidos com nutrientes relevantes ao crescimento e desenvolvimento do sistema imunológico.

Durante os primeiros cinco anos de vida, as crianças têm altas exigências de macro e micronutrientes para apoiar o seu rápido crescimento e desenvolvimento de órgãos, incluindo o cérebro. A OMS, a Academia Americana de Pediatria (AAP) e a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) são unânimes na indicação do aleitamento materno exclusivo até os seis meses de idade, sendo importante a sua continuação com complementação de outros alimentos nutricionalmente adequados e seguros até os dois anos ou mais<sup>57-59</sup>.

A idade de 12-36 meses é considerada de maior risco de inadequações nutricionais, por ser um período de transição do aleitamento materno complementado ao

consumo regular de uma variedade de alimentos familiares. As crianças de todo o mundo, especialmente as dos países em desenvolvimento, bem como as dos grupos desfavorecidos em todos os países, tendem a desenvolver deficiências nutricionais e comprometimento de crescimento devido a quantidades inadequadas e/ou má qualidade da alimentação complementar e familiar, frequentemente agravada pelas taxas elevadas de infecção<sup>60</sup>.

Quando as crianças não atingem uma ingestão adequada de nutrientes através de alimentos normais, os alimentos enriquecidos e os suplementos nutricionais, incluindo as fórmulas infantis, devem ser considerados como complemento dos alimentos disponíveis localmente para satisfazer os requisitos nutricionais<sup>61</sup>. O uso do leite de vaca integral a partir de 1 ano vem sendo desencorajado já que essa prática agrega riscos nutricionais associados ao consumo excessivo de proteínas e sódio, além de carência de diversos micronutrientes, como AGPICL (DHA e ARA), vitamina A, ferro e zinco<sup>62</sup>.

As fórmulas para crianças de 1-3 anos foram introduzidas no mercado e vem sendo usadas em muitos países há aproximadamente 2 décadas<sup>63</sup>. São bebidas à base de leite de vaca suplementadas com vitaminas e minerais, desenvolvidas para atender às necessidades nutricionais dessa faixa etária. Contudo, não existem definições e requisitos de composição internacionalmente acordados para as fórmulas dessa faixa etária<sup>61</sup>.

Um estudo realizado na França com crianças de 1 a 2 anos mostrou que o uso de um composto lácteo (bebida à base de leite de vaca) reduziu significativamente o risco de deficiências de ácido  $\alpha$ -linolênico, ferro, vitamina C e vitamina D, que foram associados com o consumo de leite de vaca integral<sup>64</sup>. Walton et al<sup>65</sup> reforça que a principal vantagem do consumo de compostos lácteos está em reduzir o risco de inadequações de ferro e vitamina D, dois nutrientes frequentemente deficientes nas dietas de crianças jovens em consumo de leite de vaca não fortificado.

Nos últimos 20 anos, pesquisas na área de nutrição têm focado no papel de compostos nutritivos ou não nutritivos na redução de risco e prevenção de doenças<sup>66</sup>. Alguns alimentos ou ingredientes possuem substâncias biologicamente



ativas que produzem efeitos benéficos adicionais à saúde, que vão além de suas funções nutricionais básicas, sendo estes chamados alimentos funcionais. Caracterizam-se por desempenhar um papel importante na redução do risco de diversas doenças<sup>67</sup>. Dentre os compostos bioativos que vem se destacando nos últimos anos nas pesquisas clínicas por sua ação sobre a função imune e sobre o metabolismo estão os prebióticos, o DHA e o  $\beta$ -glucano<sup>68</sup>.

Segundo a Academia de Nutrição e Dietética<sup>66</sup>, todos os alimentos são essencialmente funcionais em algum nível, por fornecerem energia e nutrientes necessários à manutenção da vida. Contudo, para um alimento ser classificado como funcional, a investigação científica deve estabelecer efetivamente a biodisponibilidade e eficácia destes compostos em níveis que são fisiologicamente alcançáveis sob padrões dietéticos típicos.

Além dos benefícios associados à ingestão de uma dieta equilibrada, com macro e micronutrientes em quantidades adequadas às altas exigências nutricionais diárias infantis, a nutrição também tem se destacado por sua influência sobre a composição da microbiota intestinal e modulação do sistema imune<sup>69</sup>.

### 3.3 O papel da microbiota na homeostase imunológica

A microbiota gastrointestinal desempenha um papel crucial na saúde e na doença do hospedeiro através do seu impacto sobre a nutrição, patogênese e imunologia<sup>70</sup>. Esta comunidade microbiana regula algumas funções metabólicas e fisiológicas importantes do hospedeiro, e dirige a maturação do sistema imune na infância, contribuindo para a manutenção de sua homeostase durante a vida<sup>71,72</sup>. Grandes progressos têm sido feitos com respeito à análise da composição e funções da microbiota humana, e um “desbalanço” na sua composição (disbiose) tem sido associado a diferentes doenças nos últimos anos<sup>73</sup>.

O trato gastrointestinal (TGI) é o maior órgão do sistema imune. Ele possui aproximadamente 65% dos tecidos imunológicos e 80% dos tecidos produtores de imunoglobulina do corpo<sup>74</sup>. O desenvolvimento normal e a funcionalidade do TGI humano dependem criticamente da presença de uma microbiota gastrointestinal

complexa, uma vez que estes microorganismos realizam numerosas funções metabólicas, de promoção do crescimento e de proteção<sup>75</sup>.

O TGI maduro contém uma enorme quantidade e variedade de bactérias aeróbias e anaeróbias que interagem entre si em um ecossistema complexo, desempenhando um papel crítico na promoção e proteção da saúde infantil<sup>70</sup>. O número de células microbianas dentro do lúmen intestinal é cerca de 10 vezes maior do que o número de células eucarióticas no corpo humano e a microbiota intestinal tem uma rica flora de mais de 500 espécies de bactérias diferentes<sup>76</sup>.

A complexa microbiota intestinal presente em seres humanos varia em número e composição ao longo do intestino e esta variabilidade é em grande parte devido a diferentes condições físico-químicas (pH, tempo de trânsito, disponibilidade de nutrientes) nas diferentes regiões intestinais<sup>77</sup>. O intestino grosso é um dos órgãos mais diversamente colonizado e metabolicamente ativo no organismo humano. Nele, as populações microbianas compreendem aproximadamente  $10^{11}$ - $10^{12}$  unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de conteúdo<sup>78</sup>. O ambiente do cólon é favorável para o crescimento de bactérias, uma vez que tem um tempo de trânsito lento, nutrientes disponíveis e um pH favorável. A maioria dos micróbios no intestino grosso é anaeróbio estrito e dentre os gêneros comumente encontrados estão bacteroides, eubactérias, fusobactérias, bifidobactérias, peptostreptococcus, clostrídios, lactobacilos e estreptococos<sup>79</sup>.

A microbiota intestinal é cada vez mais considerada como um órgão humano funcional, desenvolvendo funções próprias e vitais para a saúde do hospedeiro, como regulação e manutenção da função de barreira intestinal, angiogênese, proteção contra infecções, processamento de componentes alimentares, regulação do metabolismo humano, maturação do sistema imunológico e desenvolvimento de tolerância oral<sup>80,81</sup>.

Quanto à morfologia intestinal, a microbiota promove mudanças substanciais, incluindo a arquitetura das vilosidades, a profundidade das criptas, proliferação celular, densidade de vasos sanguíneos, propriedades da camada de muco e maturação dos tecidos linfóides associados a mucosas. Em ratos livres de germes,

as vilosidades no intestino delgado distal são mais longas e mais finas e tem uma rede vascular menos complexa do que as vilosidades dos animais convencionalmente colonizados<sup>80</sup>. Na ausência de bactérias, criptas intestinais são menos profundas e contêm menos células estaminais proliferadas. Além disso, os animais livres de germes mostram reduzida espessura de muco com propriedades alteradas<sup>80</sup>.

A microbiota exerce muitos papéis no desenvolvimento do sistema imune intestinal, como modulação das estruturas de camada e linfóides da mucosa intestinal, diferenciação de células imunológicas e produção de mediadores imunes<sup>82</sup>. Sob condições isentas de germes observa-se poucos folículos linfóides isolados e placas de Peyer e nódulos linfáticos mesentéricos imaturos, além de níveis de imunoglobulina A (IgA) e peptídeos antimicrobianos mais baixos do que nos animais colonizados por bactérias<sup>80,83</sup>. Além disso, a microbiota protege contra patógenos por competir por nutrientes e receptores, através da produção de compostos antimicrobianos e pela estimulação de um processo de sinalização de células múltiplas que pode limitar a liberação de fatores de virulência<sup>84</sup>.

Alterações desfavoráveis na composição da microbiota intestinal, referidas como disbiose, podem estar associadas a várias condições clínicas, tais como enterocolite necrotizante em recém-nascidos prematuros, doença inflamatória intestinal, obesidade, doenças autoimunes, alergias, asma e susceptibilidade à infecções<sup>73</sup>. Devido à associação entre disbiose e doenças, surge o conceito emergente "programação microbiana", que é análogo a, ou mesmo um componente de, "programação metabólica"<sup>85</sup>.

Acredita-se hoje que o aparecimento de várias doenças pode estar relacionado com a interferência de alguns fatores sobre o desenvolvimento inicial do sistema de defesa da mucosa intestinal<sup>86</sup>. Existe forte evidência de que a interrupção do processo de colonização normal pode conduzir a alterações na importante relação simbiótica que é necessária para a homeostase imune<sup>26</sup>.

A associação do microbioma às doenças autoimunes tem sido explicada pela "hipótese da higiene", que sugere que a ausência de um microbioma robusto resulta

em defeitos no desenvolvimento e regulação do sistema imunológico, resultando em uma falta de tolerância imune<sup>87</sup>. A "hipótese da higiene" teoriza que a falta de exposição a microrganismos externos e infecção na infância inibe o desenvolvimento imunológico natural e predispõe a doenças crônicas na vida adulta<sup>88</sup>. Mais recentemente, esta teoria foi ampliada para abranger a "hipótese da microflora", colocando ênfase na alteração da microbiota intestinal comensal durante a infância como uma causa potencial de desregulação imune e doença alérgica<sup>89</sup>. Evidências epidemiológicas apoiando este conceito têm mostrado que crianças com maior exposição microbiana no início da vida, através de ambientes agrícolas, animais de estimação, irmãos mais velhos e creches, têm um menor risco de desenvolver asma, rinoconjuntivite e dermatite atópica<sup>90,91</sup>. Exposição natural à microbiota materna através de parto vaginal e amamentação também foi associada a uma menor incidência de condições alérgicas<sup>92</sup>.

Alguns estudos demonstram uma relação entre a microbiota intestinal do início da vida e o desenvolvimento da alergia<sup>93,94</sup>. Crianças que desenvolvem alergia são, comparadas àquelas que permanecem não-alérgicas, não tão frequentemente colonizadas com bifidobactérias e enterococos, apresentando microbiota com predominância de clostridium, incluindo *Clostridium difficile*, no início da vida<sup>93,94</sup>. Investigadores finlandeses relataram, com base nos resultados de estudos baseados em cultura envolvendo alguns lactentes, que crianças saudáveis foram mais propensas a abrigar bifidobactérias do que crianças com alergia<sup>95,96</sup>. Segundo Sjögren et al<sup>97</sup>, as crianças que desenvolvem alergia durante os cinco primeiros anos foram já durante a primeira semana de vida menos frequentemente colonizadas com lactobacilos, em comparação com crianças que não desenvolveram alergia. Entretanto, nem todos os estudos demonstram uma relação entre a microbiota intestinal precoce e desenvolvimento de alergia<sup>98</sup>.

A composição da microbiota intestinal tem sido associada ao desenvolvimento de alergias por promover processos potencialmente anti-alérgicos: imunidade tipo Th1; geração de fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), que tem um papel essencial na supressão da inflamação alérgica induzida por Th2 e indução de tolerância oral; e produção de IgA, um componente essencial da defesa imune da mucosa<sup>99</sup>.

Até pouco tempo atrás se acreditava que o TGI do feto fosse estéril, e que a primeira inoculação do tubo digestivo fetal ocorresse no momento do nascimento, a partir da microbiota intestinal e vaginal materna. Entretanto, pesquisas têm identificado a presença de micróbios na placenta humana saudável, no cordão umbilical e no mecônio, sugerindo uma possível colonização do intestino humano ainda *in utero*<sup>100</sup>.

Após o nascimento, o processo de colonização intestinal subsequente é influenciado pela genética do hospedeiro e por vários fatores ambientais, incluindo o tipo de parto, idade gestacional, hospitalização, uso de antibiótico, condições sanitárias e tipo de alimentação<sup>101</sup>. Vale ressaltar que a infância é um período crítico para a colonização microbiana do intestino, determinando a composição da microbiota intestinal do adulto. Dentre os fatores que influenciam o estabelecimento da microbiota intestinal infantil, a dieta é um dos mais importantes<sup>102</sup>.

A dieta tem uma influência particularmente crucial sobre a composição de bactérias intestinais, especialmente nos primeiros meses de vida<sup>103</sup>. A amamentação é considerada a melhor forma de alimentação, estando presentes no leite materno agentes que influenciam a composição da microbiota fecal<sup>104</sup> e a maturação do sistema imunológico<sup>105</sup>. Dentre os compostos bioativos presentes no leite humano (LH) estão células imunológicas, agentes anti-infecciosos e anti-inflamatórios, fatores de crescimento e oligossacarídeos<sup>104</sup>.

Os oligossacarídeos não digeríveis (OND) do LH funcionam como prebióticos, por estimularem o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, desse modo alterando seletivamente a composição microbiana do intestino<sup>104</sup>. Há um corpo crescente de evidências epidemiológicas mostrando as diferenças significativas na composição da microbiota intestinal entre amamentados e alimentados com fórmula<sup>106-108</sup>. Lactentes amamentados desenvolvem uma microbiota com predominância de bifidobactérias e lactobacilos (80-90%), enquanto em lactentes em aleitamento artificial predominam os enterococos, bacteróides e clostrídios<sup>109</sup>. Bifidobactérias são consideradas bactérias comensais benéficas, porque ajudam a manter a superfície mucosa saudável no TGI e tem a capacidade de inibir bactérias patogênicas<sup>110</sup>.

Vale ressaltar que o potencial bifidogênico do LH está associado não apenas à presença de oligossacarídeos, mas também ao seu conteúdo protéico apropriado, à presença de lactoferrina, à maior quantidade de  $\alpha$ -lactoalbumina, ao baixo conteúdo de fosfatos, à presença de lactose e aos nucleotídeos<sup>111</sup>.

Estudos recentes têm demonstrado que o LH, longe de ser um líquido estéril, constitui uma excelente e contínua fonte de bactérias comensais para o intestino infantil<sup>112,113</sup>. Mais de 700 espécies de bactérias foram identificadas no colostro e leite maduro humano, incluindo várias espécies de bactérias lácticas, assim como espécies normalmente colonizadoras da cavidade oral de lactentes<sup>114</sup>. A microbiota do LH é constituída por bactérias comensais dos grupos *Staphylococci*, *Streptococci*, *Corynebacteria*, *Lactobacilli*, *Propionibacteria* e *Bifidobacteria*, que são frequentemente encontradas no mamilo, aréola e tecidos subjacentes, bem como nos ductos lactíferos que foram colonizados<sup>115</sup>. Martin *et al*<sup>116</sup>, encontraram grande similaridade entre as bifidobactérias isoladas nas amostras de LH e aquelas encontradas nas fezes dos respectivos bebês alimentados, sugerindo a capacidade de transmissão desses microorganismos para o intestino infantil através da amamentação.

Portanto, a nutrição ideal durante a infância é fundamental não só para assegurar o crescimento e desenvolvimento adequados, mas também para o estabelecimento de uma resposta imunológica saudável durante a infância e em todo o ciclo de vida. Há evidência cada vez mais crescente de que a microbiota não atinge sua composição de adulto até 2-3 anos de idade<sup>117</sup> e que esta pode rapidamente responder às alterações dietéticas. O consumo de uma dieta balanceada resulta em uma microbiota diversa e equilibrada, com consequências significativas para a saúde do indivíduo<sup>118,119</sup>. Dentre os fatores ambientais, a dieta parece ser o fator mais importante na colonização intestinal.

O papel essencial da microbiota intestinal para a saúde tem gerado grande interesse científico, médico e comercial na modulação de sua composição e função metabólica, a fim de produzir estratégias de modulação adequadas e benéficas para o hospedeiro. Atualmente os prebióticos assumem um papel de destaque nas interações hospedeiro-microbioma-dieta. Com base em avanços recentes, a

modulação da microbiota intestinal com prebióticos tem sido sugerida como um tratamento, ou para a prevenção, de desordens diferentes, tais como síndrome do intestino irritável, diarreia infecciosa, doença alérgica e enterocolite necrotizante<sup>120</sup>.

### 3.4 Prebióticos

Os prebióticos são carboidratos não digeríveis que provocam mudanças na formação e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, estimulando seletivamente a proliferação e funções de bactérias não patogênicas no cólon, oferecendo, assim, benefícios sobre a saúde do hospedeiro<sup>121</sup>.

O êxito dos prebióticos depende essencialmente de sua resistência às enzimas salivares, pancreáticas e ao ácido estomacal, possibilitando atingir o intestino grosso intacto, lugar onde ocorrerá a sua fermentação e digestão, por bactérias benéficas<sup>122</sup>.

Componentes dietéticos muito comumente investigados como potenciais prebióticos são os carboidratos não digeríveis, primariamente oligossacarídeos, consistindo de 2 a 20 unidades de monossacarídeos<sup>123</sup>. Oligossacarídeos dietéticos ocorrem naturalmente em vários alimentos, como alho-poró, aspargo, chicória, alcachofra, alho, cebola, trigo e aveia, bem como a soja. No entanto, a ingestão total destas fontes dentro de uma dieta do tipo ocidental é pequena. Uma forma eficaz para atingir uma ingestão capaz de promover a saúde é a fortificação de alimentos consumidos com mais frequência com a adição de ingredientes prebióticos<sup>124</sup>. Os prebióticos são, assim, uma sub-categoria de ingredientes funcionais alimentares e pode ser adicionada a muitos alimentos, incluindo iogurtes, cereais, pães, bolachas, sobremesas de leite e bebidas.

Entre os ingredientes alimentares não digeríveis estudados por seu potencial prebiótico, estão frutooligosacarídeos (FOS), inulina e galactooligosacarídeos (GOS), sendo estes amplamente apoiados por muitos ensaios em humanos<sup>125</sup>. Estudos sugerem que a polidextrose (PDX) também tem potencial prebiótico<sup>126,127</sup>.

Os GOS representam 90% das misturas hoje utilizadas nas fórmulas infantis de prebióticos. São encontrados na natureza no grão de soja e são sintetizados industrialmente a partir da lactose<sup>128</sup>. PDX é usado amplamente em vários setores da indústria alimentícia e tem sido objeto de muitos estudos, devido à sua versatilidade e multifuncionalidade. Além de ser um excelente ingrediente, foi aprovado para utilização em alimentos em 60 países e é reconhecido como uma fibra dietética em mais de 20 países<sup>129</sup>. Tem sido demonstrado que a ingestão diária de 4 a 12 g de PDX melhora as funções fisiológicas, sem efeitos adversos<sup>127</sup>.

Uma importante fonte natural de OND é o LH, com quantidades satisfatórias, variedade e complexidade de estruturas capazes de proporcionar inúmeros benefícios à saúde dos lactentes<sup>104</sup>. Por conta disso, sua composição tem sido utilizada como modelo para a suplementação de fórmulas infantis.

O LH contém cerca de 8% dos carboidratos totais como oligossacarídeos<sup>130</sup> e níveis elevados de mais de 200 estruturas de OND<sup>131</sup>, ao passo que estas estruturas são praticamente ausentes do leite de vaca (< 0,08 g/L)<sup>132</sup>. Oligossacarídeos são o terceiro maior componente do LH, após lactose e lipídios, variando em concentração de 5 a 10 g/L no leite<sup>133</sup>. Sem suplementação, oligossacarídeos são quase ausentes em fórmulas infantis à base de leite de vaca. Acredita-se que a diferença de OND entre LH e fórmula infantil seja uma das principais razões para as diferenças observadas na microbiota intestinal entre lactentes que recebem estes dois tipos de alimentação.

Na tentativa de mimetizar os diversos benefícios à saúde associados aos OND do LH, diferentes oligossacarídeos prebióticos têm sido adicionados à fórmula infantil: GOS, FOS, PDX, inulina, lactulose e misturas destes<sup>134</sup>. Os efeitos desses variados prebióticos sobre o crescimento infantil, microbiota gastrointestinal, característica das fezes, tolerância gastrointestinal e biomarcadores de função imune têm sido avaliados em muitos estudos, sendo testadas diferentes doses e por períodos de intervenção variados, o que dificulta o alcance de conclusões mais precisas e recomendações de uso.



Embora a complexa composição de oligossacarídeos do LH não possa ser ainda mimetizada, misturas específicas têm sido desenvolvidas na tentativa de assemelhar ao máximo o prebiótico adicionado aos alimentos à composição dos presentes no LH. Os prebióticos comercialmente disponíveis para inclusão em fórmulas infantis são limitados em variedade e são muito mais simples em estrutura<sup>135</sup>.

Os prebióticos fornecem apoio ao sistema imunológico através da estimulação das bactérias intestinais benéficas. OND atingem o cólon intactos e são utilizados por bactérias colônicas da microbiota intestinal como substrato para o seu crescimento<sup>136</sup>. Como as bactérias no cólon têm uma preferência por determinados tipos de substratos, o fornecimento de um tipo específico de oligossacarídeo resultará na fermentação seletiva por bactérias intestinais, que podem alterar a composição da microbiota intestinal. Neste caso, a fermentação de carboidratos não digeríveis do LH está associada com o crescimento seletivo das espécies de lactobacilos e bifidobactérias<sup>125,136</sup>.

Um TGI colonizado por bifidobactérias e lactobacilos tem sido associado ao aumento da imunidade do lactente de várias maneiras, devido à sua interação com as células epiteliais intestinais, as quais estimulam o sistema imunológico<sup>137</sup>, por melhorar a função da barreira intestinal, aumentando o número de bactérias benéficas e conseqüentemente competindo com as bactérias patogênicas<sup>137</sup>, e por promover a maturação do sistema imunológico precoce<sup>138</sup>.

A colonização por bifidobactérias e lactobacilos pode inibir o crescimento de microorganismos patogênicos através da produção de ácido láctico, acético e outros ácidos orgânicos, com uma conseqüente diminuição no pH intraluminal que inibe o crescimento de alguns patógenos bacterianos. Além disso, bifidobactérias e lactobacilos competem com bactérias potencialmente patogênicas por nutrientes e por sítios de adesão no epitélio intestinal<sup>139</sup>.

Há evidências do efeito bifidogênico dos prebióticos adicionados em fórmulas infantis, sendo capaz de alterar a microbiota gastrintestinal de forma a assemelhá-la a de lactentes amamentados<sup>128,140-144</sup>. Além de estimular o crescimento de bactérias benéficas como bifidobactérias e lactobacilos, estudos clínicos também têm

mostrado o impacto de uma fórmula suplementada com prebiótico na redução da presença de bactérias patogênicas no intestino, como o *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. difficile*<sup>103,128,145,146</sup>.

Entretanto as conclusões destas investigações sobre mudanças no microbioma por prebióticos são ainda conflitantes, uma vez que alguns estudos mostraram pouco ou nenhum efeito mensurável<sup>147-149</sup>. Esta discrepância nos resultados pode ser atribuída à diversos fatores, como diferenças na metodologia laboratorial, na composição da fórmula infantil, nas populações infantis estudadas e em seus microbiomas intestinais individualizados. De fato, enormes variações na microbiota intestinal foram relatadas em lactentes em uma série de estudos<sup>150-152</sup>, e tais variações muitas vezes excedem os efeitos do tratamento, tornando assim difícil determinar o real impacto da suplementação de prebióticos.

Segundo estudo desenvolvido por Knol et al<sup>103</sup>, populações microbianas intestinais de lactentes alimentados com LH ou fórmula infantil suplementada com prebiótico apresentaram níveis semelhantes de bifidobactérias, enquanto crianças que receberam fórmula tradicional tiveram cerca de 20% menos bifidobactérias em suas populações microbianas intestinais.

Uma revisão sistemática de ensaios avaliando o efeito de fórmulas lácteas suplementadas com diferentes prebióticos (GOS/FOS, FOS, PDX/GOS/lactulose ou GOS), em neonatos a termo, mostrou que doses variando de 1,5 a 8,0 g/L parecem atingir um efeito bifidogênico máximo com intolerância mínima<sup>152</sup>. Dos 11 ensaios clínicos incluídos nesta revisão sistemática, 09 avaliaram a colonização fecal com bifidobactérias e/ou lactobacilos. Seis estudos relataram níveis significativamente mais elevados de bifidobactérias após a suplementação com prebiótico e os 03 restantes não encontraram diferenças significativas. Dois dos três ensaios que avaliaram a contagem de lactobacilos relataram níveis mais elevados no grupo suplementado.

Como produtos finais da fermentação de prebióticos são produzidos lactato e ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), dentre eles acetato (60%), propionato (25%) e butirato (15%). Eles são centrais para a fisiologia e o metabolismo do cólon,

servindo como uma fonte de energia para a mucosa colônica, apresentando efeitos tróficos sobre a mucosa intestinal, estimulando o fluxo de sangue e a captação de oxigênio, além de afetar a absorção de sódio e água<sup>153</sup>.

Os AGCCs resultantes da fermentação dos oligossacarídeos também reduzem o pH do lúmen intestinal, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos<sup>154</sup>. No ensaio clínico conduzido por Holscher et al<sup>155</sup>, o pH fecal foi menor em lactentes amamentados e alimentados com fórmula com prebióticos—em comparação aos alimentados com fórmula infantil padrão. Em um ensaio clínico<sup>156</sup> comparando o efeito bifidogênico de 3 produtos prebióticos comumente usados (GOS a 7,2g/L, Inulina a 0,8g/L e oligofrutose e inulina a 4g/L), por meio de culturas *in vitro* de amostras fecais de lactentes, o produto GOS foi mais bifidogênico e potente na inibição da *E. coli*, possivelmente devido à maior produção de ácidos acético e láctico resultando em um pH de cultura reduzido.

Os AGCCs apresentam importantes ações imunorregulatórias, por afetar aspectos funcionais de neutrófilos e interferir com o processo inflamatório. O butirato, AGCC mais estudado, altera a produção e liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias, regula o processo de apoptose e diferenciação, maturação e função de leucócitos, particularmente dos monócitos/macrófagos. Esse AGCC inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12) e óxido nítrico e aumenta a liberação de IL-10 (citocina com ações anti-inflamatórias) por macrófagos. Um dos mecanismos envolvidos nessas ações parece ser a inibição da ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B<sup>157</sup>.

Um benefício potencial de alimentação com PDX, em comparação a outros prebióticos como FOS e inulina, é que ele leva mais tempo para atingir a taxa máxima de produção de gás e, portanto, é mais lentamente fermentado, com ácido láctico sendo um produto primário<sup>158</sup>.

A adição de prebióticos às fórmulas infantis tem sido associada a uma maior frequência e melhor consistência das fezes de lactentes em aleitamento artificial, assemelhando o padrão de dejeções ao de lactentes amamentados<sup>128,159,160</sup>. Vários mecanismos podem explicar esse efeito, dentre eles: a fermentação dos prebióticos

que resulta no aumento da massa microbiana com consequente aumento do teor de água fecal<sup>161,162</sup>; a subsequente produção de AGCC resultando em estímulo à motilidade gastrointestinal, quer por ser usado como fonte de energia para as células epiteliais do cólon, ou por induzir as contrações fásicas e tônicas em músculo circular<sup>163-167</sup> e, por ser um tipo específico de fibra dietética, os prebióticos podem ligar-se diretamente à água<sup>164</sup>. Entretanto, atualmente não existe evidência para o uso de prebióticos na constipação infantil<sup>168</sup>.

Scholtens et al<sup>169</sup>, em artigo de revisão, reuniu 7 estudos que avaliaram os efeitos de uma mistura específica de GOS/FOS (9:1) sobre as características das fezes. Quatro<sup>146,170-172</sup> deles consideraram lactentes a termo, com doses de prebiótico variando de 4,0 a 8,0 g/L e tempo de intervenção de 4 a 10 semanas. Diferenças estatisticamente significantes foram observadas na maioria destes estudos, com os grupos em uso de fórmula com prebióticos apresentando maior frequência e consistência mais macia de fezes, quando comparados aos grupos com fórmula padrão, exceto no estudo de Veereman et al<sup>171</sup>. Os estudos com pré-termos<sup>142,173,174</sup> mostraram efeitos similares.

Em ensaio clínico com lactentes a termo saudáveis com idade entre 9 e 48 meses, Ribeiro et al<sup>175</sup> concluíram que o uso de uma fórmula de seguimento com adição de uma mistura de PDX/GOS (1:1, 12g/L), por 108 dias, induziu a um padrão de fezes mais frequentes e mais macias. Nesse estudo, houve consumo médio de 2g de prebióticos por dia.

Oligossacarídeos prebióticos também estão associados à modulação da atividade elétrica e do esvaziamento gástrico. Num estudo realizado com lactentes prematuros em uso de fórmula com 8 g/L de GOS/FOS (9:1)<sup>176</sup> foi observado um efeito benéfico da suplementação de prebióticos no tempo de esvaziamento gástrico, sendo sugerido que a produção de AGCCs no grupo suplementado tenha sido responsável por um aumento da motilidade gastrointestinal superior e uma taxa de esvaziamento gástrico aumentada. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Mihatsch et al<sup>174</sup> com um tempo significativamente menor de trânsito (12h) em prematuros que tinham recebido uma fórmula com GOS/FOS, quando comparadas com crianças que tinham recebido uma fórmula controle (25,6 h) em 14 dias. O

tempo de trânsito gastrointestinal medido neste estudo no grupo GOS/FOS (9:1) foi mencionado como estando dentro do intervalo normal do que é observado em lactentes alimentados com LH.

Considerando a importância de assegurar o crescimento infantil adequado, diversos estudos têm mostrado que fórmulas contendo prebióticos garantem crescimento comparável ao observado em lactentes alimentados com fórmula padrão. Rao et al<sup>152</sup>, em uma revisão sistemática de ensaios clínicos avaliando a eficácia e segurança da suplementação de prebióticos em recém-nascidos a termo, encontraram que 9 dos 11 estudos incluídos avaliaram o efeito da suplementação com prebiótico sobre o crescimento físico em várias idades ao longo do primeiro ano de vida e que nenhum reportou diferenças no crescimento entre os 2 grupos. Uma metanálise agrupada dos dados de 4 destes ensaios clínicos concluiu que lactentes no grupo prebiótico tiveram ganho de peso ligeiramente melhor durante o período de intervenção comparados aos controles.

Quanto à tolerância em relação às fórmulas suplementadas com prebióticos, diversos estudos<sup>141,146,170,177-181</sup> mostraram que a suplementação foi bem tolerada e que a incidência de sintomas, tais como a irritabilidade excessiva, choro, regurgitação e vômitos não foi diferente entre os dois grupos. Entretanto, no estudo de Ziegler et al<sup>182</sup>, onde testou-se uma combinação de PDX, GOS e lactulose, a principal razão para descontinuação dos participantes foi intolerância às fórmulas testadas (90% dos descontinuados). As razões mais frequentes para a interrupção do estudo foram gases em excesso (n=21), irritabilidade (n=16), vômitos (n=12) e diarreia (n=7). Scalabrin et al<sup>183</sup> e Ashley et al<sup>184</sup>, testando uma mistura prebiótica de PDX/GOS, observaram boa tolerância (sem produção excessiva de gases ou eventos adversos), apoiando a segurança dessa mistura.

A microbiota intestinal, beneficiada pelo uso de prebióticos, pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento do sistema imune adaptativo das crianças, especialmente no desenvolvimento do sistema imune da mucosa e na produção endógena de IgAs<sup>26,185</sup>. O aumento da IgAs fecal tem sido associado com exposição a prebióticos, e pode ser resultante de aumento de secreção desta imunoglobulina<sup>186</sup>

ou de redução no número de clostrídios<sup>187</sup>, microorganismos que podem degradar IgAs no intestino<sup>188</sup>.

A principal função da IgAs fecal é aglutinar os microorganismos e prevenir a aderência de bactérias patogênicas e vírus à superfície da mucosa<sup>185,189</sup>. Outra função importante dessa imunoglobulina é a manutenção da homeostase microbiana intestinal. Estudos em animais demonstraram um aumento substancial em bactérias anaeróbias no intestino delgado de ratos na ausência de IgAs normal, ao passo que a normalização da sua produção resultou numa recuperação da composição regular da microbiota intestinal<sup>190</sup>. Dessa forma, a composição da microbiota intestinal regula a produção de IgAs, assim como a IgAs regula a composição da microbiota intestinal para prevenir uma super-estimulação do sistema imunológico. Ao mesmo tempo, a presença contínua de bactérias comensais favorece uma estimulação constante do sistema imune sem invocar respostas inflamatórias.

Entretanto, há controvérsias quanto aos efeitos dos prebióticos sobre a concentração de IgAs fecal em ensaios clínicos realizados: enquanto após 26 semanas de suplementação de prebióticos a concentração de IgAs foi 2,7 vezes maior ( $P < 0,001$ ) no grupo GOS/FOS<sup>187</sup>, outros estudos não observaram qualquer efeito dos prebióticos sobre esta imunoglobulina<sup>183,191</sup>. No estudo de Scalabrin et al<sup>183</sup>, nenhuma diferença significativa para IgAs foi detectada entre os grupos PDX/GOS e controle; porém, o grupo de lactentes amamentados apresentou níveis significativamente mais elevados de IgA em comparação aos demais, em todas as dosagens.

Além do seu efeito prebiótico relacionado à alterações da microbiota, recentemente foi mostrado que OND agem como receptores do tipo Toll 4, ligando-se tanto a células epiteliais quanto a monócitos e, assim, hiperregulando a secreção de citocina<sup>192-194</sup>. Como tal, a modulação da inflamação pode ser devido aos efeitos diretos de fibras sobre a imunidade do hospedeiro, processo esse que parece preceder as alterações na microbiota, o que sugere que os oligossacarídeos atuam sistemicamente e estão, desse modo, modulando a resposta imunitária de um modo independente da microbiota.

Vários marcadores de função imune têm sido usados para medir os efeitos dos prebióticos sobre a imunidade, incluindo concentrações de endotoxinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL 1, IL 10 e IgA; níveis de bactérias patogênicas; inflamação; e incidência de infecções intestinais. Estudos em animais e *in vitro* têm sugerido que a adição de carboidratos complexos fermentáveis à dieta pode modular o tipo e função de células de diferentes regiões do tecido linfóide associado ao intestino<sup>195,196</sup>, aumentar a produção de imunoglobulina no intestino delgado e mucosa do ceco<sup>197</sup> e alterar o perfil de citocinas inflamatórias no plasma e células intestinais<sup>198-200</sup>. Entretanto, poucos estudos em crianças têm avaliado especificamente o efeito de suplementos prebióticos sobre marcadores da função imune, e os estudos existentes são divergentes quanto aos resultados encontrados.

PDX potencialmente modula o sistema imune intestinal por aumentar as concentrações de ácido láctico, ácido propiônico e de lactobacilos no íleo e diminuir o pH com alterações associadas na expressão da citocina ileal<sup>201</sup>.

Raes et al<sup>202</sup>, com o objetivo de explorar o efeito de uma fórmula láctea infantil com 6g/L de GOS/FOS (9:1) sobre os parâmetros imunes em 215 crianças, não identificaram diferenças significantes nos níveis de imunoglobulinas séricas, subpopulações de linfócitos e citocinas após 8 e 26 semanas de intervenção, em comparação ao grupo não suplementado e ao grupo amamentado.

Diante do exposto, acredita-se que a inclusão de prebióticos nas fórmulas infantis resulte em uma composição da microbiota intestinal com mais bifidobactérias, menos agentes patogênicos e uma atividade metabólica semelhante à descrita em lactentes amamentados<sup>203</sup>, proporcionando efeitos benéficos à saúde através da regulação do sistema imune<sup>125,149</sup>. Alguns estudos têm associado os prebióticos à redução na incidência de dermatite atópica<sup>180,204</sup>, urticária e sibilância recorrente<sup>204</sup>, diarreia aguda<sup>205</sup> e infecções gerais e respiratórias<sup>204</sup>.

O ensaio clínico com suplementação diária de 2g de PDX/GOS em crianças saudáveis de 9 a 48 meses, por 108 dias não resultou em diferenças significativas na incidência de doença diarreica e infecção respiratória aguda quando comparados ao grupo controle<sup>175</sup>, o que pode ter sido decorrente de uma dose insuficiente para

promover um efeito detectável na incidência das infecções investigadas. Resultado semelhante foi encontrado no ensaio de Sierra et al<sup>191</sup>, em que a suplementação de fórmula infantil com GOS (4,4g/L) em 365 crianças a termo saudáveis, por no mínimo 10 meses, não reduziu a incidência de infecções ou manifestações alérgicas durante o primeiro ano de vida. Entretanto, a suplementação de fórmula infantil com uma maior quantidade de prebióticos (8 g/L de GOS/FOS) foi associada à proteção contra IRA em lactentes nos primeiros 6 meses de vida<sup>204</sup>.

O uso de prebióticos para a prevenção e manejo da doença alérgica é uma área ativa de pesquisa clínica, porém as evidências atuais são limitadas e conflitantes. No relatório Cochrane<sup>206</sup> incluindo 4 estudos e 1428 lactentes, prebióticos adicionados à alimentos infantis preveniram o desenvolvimento de eczema, mas nenhum efeito sobre outro desfecho alérgico foi identificado. No entanto, não está determinado se prebióticos podem ter um efeito sobre outras manifestações alérgicas incluindo a asma. Sierra et al<sup>191</sup> não encontraram diferença nas manifestações alérgicas (broncoespasmo, dermatite atópica, alergia alimentar) após a suplementação com prebiótico de lactentes saudáveis alimentados com fórmula ao longo do primeiro ano de vida. Por conta das divergências nos resultados, até o momento, a utilização de prebióticos não é recomendada para prevenção de alergias<sup>191,206</sup>.

Em experimento *in vivo*<sup>207</sup> foi observado que a suplementação de fórmula com GOS resultou em redução dos níveis da IL-33 e da expressão de seu receptor ST2. A homeostase da resposta inflamatória no epitélio intestinal pode ser regulada por ambos (IL-33 e ST2)<sup>208</sup>, uma vez que esta citocina parece ser um indicador de defesa do hospedeiro mediada por Th2 e desempenha um papel importante em tecidos de barreira da mucosa como o intestino e a superfície das vias aéreas, onde funciona como um sinal de perigo endógeno em resposta ao dano tecidual<sup>209</sup>.

Ao avaliar o efeito protetor da suplementação infantil com uma mistura de GOS/FOS (8g/L) sobre a incidência de alergia além do período de intervenção, estudo<sup>210</sup> concluiu que as incidências cumulativas, ao longo de 5 anos, para qualquer manifestação alérgica e dermatite atópica, foram significativamente menores no grupo GOS/FOS, em comparação com o grupo placebo. Além disso, a proteção durou até os 5 anos de vida, tanto para dermatite atópica quanto para



rinoconjuntivite alérgica. Estudos de acompanhamento a longo prazo, em populações maiores, são necessários para avaliar o efeito preventivo potencial desta mistura sobre asma.

No que tange à alergia alimentar, segundo *guideline* da Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica, Alergia Alimentar e Anafilaxia de 2014<sup>211</sup>, não há nenhuma evidência para apoiar o uso de prebióticos para a prevenção da alergia alimentar em mulheres grávidas, lactantes ou crianças.

Por conta das incertezas quanto à eficácia dos prebióticos, as sociedades científicas não recomendam sua adição à fórmula infantil padrão para prevenção de infecções<sup>212</sup> e alergias<sup>206</sup>. Após revisão sistemática das evidências publicadas, realizada pelo Comitê de Nutrição da Sociedade Européia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (ESPGHAN), concluiu-se que a administração de fórmulas suplementadas com prebiótico para lactentes saudáveis não suscita preocupações de segurança em relação ao crescimento e efeitos adversos, porém, até o momento, não há dados suficientes para recomendar o uso rotineiro delas<sup>212</sup>. O Comitê considera que a suplementação de fórmula com prebióticos é um importante campo de pesquisa e que o grande desafio é identificar a dose adequada de uma mistura de prebióticos com complexidade estrutural e diversidade que se assemelhe aos OND do LH.

Além dos prebióticos, outros componentes alimentares têm despertado grande interesse na comunidade científica de nutrição, como o DHA, por ser uma ferramenta nutricional promissora na modulação do sistema imune em diferentes populações.

### 3.5 Ácido Docosahexaenóico (DHA)

A importância dos lipídios na nutrição e desenvolvimento humano é reconhecida há muitas décadas. Os lipídios desempenham uma variedade de funções celulares e são a principal forma de armazenamento de energia na maioria dos organismos. Atuam no transporte de vitaminas lipossolúveis, como precursores de hormônios e determinados grupos são considerados funcionais<sup>213</sup>. Os principais componentes de

todos os lipídios são os ácidos graxos (AG), que são constituintes estruturais das membranas celulares, desempenham importante função nos processos metabólicos e na produção de eicosanóides<sup>214</sup>.

Os AG são classificados, de acordo com o número de duplas ligações, em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados<sup>215</sup>. Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) essenciais compõem uma classe de moléculas que não podem ser geradas pelo organismo, mas que são necessárias ao seu funcionamento. Neste grupo encontram-se os AGPI com a primeira dupla ligação ocorrendo no terceiro ou no sexto átomo de carbono a partir do carbono metílico terminal, conhecidos por ômega 3 ( $\omega$ -3) e ômega 6 ( $\omega$ -6), respectivamente. A essencialidade destas famílias de AG para os mamíferos, em geral, se dá uma vez que o organismo animal carece de dessaturases, enzimas necessárias para a síntese dos AGPI<sup>216</sup>. Por conta dessa limitação na biossíntese, eles devem estar presentes em quantidades suficientes na alimentação visando suprir a demanda orgânica.

O principal representante dos AG da família  $\omega$ -3 é o ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3;n-3) e da família  $\omega$ -6 é o ácido linoléico (18:2;n-6). O ácido linoléico pode ser encontrado em abundância nas sementes de plantas oleaginosas, principalmente nos óleos de soja, milho e girassol, enquanto o ácido  $\alpha$ -linolênico está presente em quantidades apreciáveis em plantas e animais marinhos, principalmente algas e peixes de águas frias (cavala, sardinha, salmão, atum, truta), em óleos de peixes e nos óleos vegetais de canola e linhaça<sup>217</sup>.

Os AGPI são elementos estruturais necessários à síntese de lipídios de tecidos, e têm um papel importante na regulação de vários processos metabólicos, de transporte e excreção. A carência de AG essenciais na alimentação dos mamíferos (especialmente do homem) conduz a alterações no crescimento, na pele, imunológicas, neurológicas e sérios transtornos comportamentais<sup>218</sup>. Vários estudos apontam que sua utilização traz benefícios para a saúde humana, prevenindo enfermidades cardiovasculares, câncer de cólon, doenças imunológicas e favorecendo o desenvolvimento cerebral e da retina<sup>219</sup>.

Os AG linoléico e  $\alpha$ -linolênico são precursores de AGPI de cadeia maior, os chamados ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPICL), que possuem 20 ou mais átomos de carbono em sua estrutura. Após ingestão, o ácido linoléico pode ser metabolizado em outros ácidos da série  $\omega$ -6, tendo destaque o ácido araquidônico (ARA), e o ácido  $\alpha$ -linolênico é metabolizado em outros da série  $\omega$ -3, entre eles o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA). Este processo metabólico é mediado pelas enzimas chamadas elongases e dessaturases<sup>220</sup>.

Os AGPICL, assim como os prebióticos, têm sido alvo crescente de pesquisas por sua função imunomoduladora<sup>221</sup>. São funcionalmente os mais importantes AG para as células imunes. Dentre eles, destacam-se o DHA e o ARA, os quais são incorporados em fosfolipídios de todas as membranas celulares onde desempenham papéis assegurando o ambiente adequado para a função da proteína de membrana, mantendo a fluidez da membrana, regulando a sinalização celular, expressão de genes e função celular, e servindo como substratos para a síntese de mediadores lipídicos<sup>222</sup>.

Além de sua importância para o desenvolvimento visual e cognitivo do recém-nascido<sup>223</sup>, os AGPICL têm efeitos biológicos importantes na imunomodulação e na resposta inflamatória<sup>224,225</sup>. O EPA e o ARA são substratos na biossíntese de um conjunto de mediadores lipídicos bioativos, denominados eicosanóides, que, por sua vez, exercem funções de regulação e mediação das respostas inflamatórias, constituindo a ligação chave entre os AGPICLs e o sistema imune<sup>226</sup>.

A família dos eicosanóides é composta por prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e prostaciclina (PGI), os quais são denominados de prostanóides, bem como por leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX)<sup>227</sup>. Os eicosanóides estão envolvidos na modulação da intensidade e duração da resposta inflamatória, são regulados por estímulos específicos e diferentes eicosanóides têm frequentemente efeitos opostos<sup>227</sup>. É importante frisar que a regulação do sistema imunológico humano requer controladas respostas pró e anti-inflamatórias para a defesa do hospedeiro contra infecções e estados de doenças.

Os eicosanóides derivados do ARA pertencem à série par e são, na sua generalidade, potentes agentes pró-inflamatórios (exemplos: PGE2, TXA2, LTB4, que produzem citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas), enquanto os eicosanóides derivados do EPA são considerados como menos inflamatórios ou mesmo anti-inflamatórios, quando comparados aos derivados do ARA<sup>228</sup>.

Os AG da série  $\omega$ -3 são considerados anti-inflamatórios por um leque variado de ações tais como: competição com o ARA, levando à diminuição da produção de PGE2, de TXA2 e de LTB4; aumento de TXA3, um fraco agregador de plaquetas e vasoconstritor; aumento de PGI3 sem diminuição de PGI2, pois ambas são vasodilatadoras ativas e inibidoras da agregação plaquetária; aumento de LTB5, um indutor fraco da inflamação e um débil agente quimiotático; e aumento de PGE3, que diminui a ativação de leucócitos polimorfonucleares e é vasodilatador<sup>229</sup>.

O equilíbrio entre os lipídeos da dieta tem como propósito controlar a resposta inflamatória exacerbada, por meio da relação entre os tipos de AGPI ingeridos. Muitas doenças são resultantes de processos inflamatórios inapropriados ou excessivos que as iniciam e as acompanham de forma crônica<sup>230</sup>. O alto consumo de ácido linoléico ( $\omega$ -6) favorece o aumento do conteúdo de ARA nos fosfolipídios das membranas celulares, aumentando, conseqüentemente, a produção de PGE2 e LTB4, por meio das vias enzimáticas da ciclooxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LOX), respectivamente. Por outro lado, ingestão de ácido  $\alpha$ -linolênico introduz EPA e DHA nos fosfolipídios das membranas, inibindo o metabolismo do ARA por competição pelas mesmas vias enzimáticas, promovendo a formação de PGE3, em vez de PGE2, e LTB5, em vez de LTB4, que são mediadores inflamatórios menos ativos<sup>231</sup>. Portanto, há de se supor que a suplementação com EPA e DHA, pode atenuar os efeitos do processo inflamatório, a partir da diminuição da síntese dos eicosanóides pró-inflamatórios.

Além disso, estudos bioquímicos mostraram que ácidos graxos  $\omega$ -3 DHA e EPA funcionam como precursores de moléculas bioativas chamadas resolvinas, protetinas e maresinas, que possuem características anti-inflamatórias e imunomoduladoras<sup>231,232</sup>. As resolvinas regulam a migração de neutrófilos, inibem a geração de superóxido, bloqueiam a quimiotaxia via IL-8, promovem fagocitose de

neutrófilos por macrófagos (*clearance* de neutrófilos apoptóticos), promovem a migração de macrófagos contendo zimosan de locais inflamados para os órgãos linfáticos, além de inibirem a indução de TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B e a liberação de IL-6 e IL-2 em células dendríticas.

Embora o DHA não seja um substrato para as enzimas COX e LOX, ele inibe a síntese de eicosanóides  $\omega$ -6 por atuar impedindo a liberação de ARA da membrana. Assim, a redução da produção de eicosanóides inflamatórios a partir do DHA e EPA é a justificativa do seu uso em determinadas patologias inflamatórias onde seus mecanismos de ação seriam similares aos de determinadas drogas anti-inflamatórias<sup>225</sup>.

Adicionalmente aos efeitos sobre a inflamação, os AGPI da série  $\omega$ -3 também alteram a produção de proteínas inflamatórias, como as quimiocinas, as citocinas, os fatores de crescimento e as proteases da matriz. Estes efeitos podem ser mediados pela alteração da ativação de fatores-chave envolvidos na regulação da expressão gênica inflamatória, como o NF- $\kappa$ B e os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma<sup>233,234</sup>.

Os AGPICL ajudam no desenvolvimento do sistema imune infantil, atuando também na produção de células T<sup>235</sup>. Os AGPI  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 modulam a geração de células Th1 e Th2, a produção de suas citocinas e a proliferação de células, podendo atuar, conseqüentemente, como moléculas endógenas anti-inflamatórias<sup>236</sup>. Estudos laboratoriais sugerem que AGPICL  $\omega$ -3 podem ter a capacidade de suprimir a resposta das células Th2 à alérgenos<sup>233</sup>.

O LH é uma importante fonte de AG essenciais para o lactente e contém mais de 150 diferentes tipos, dentre os quais  $\omega$ -6,  $\omega$ -3, ARA, DHA e vários outros, que correspondem 15 a 20% do total de AG presentes<sup>104</sup>. A quantidade de DHA presente no LH varia entre 0,1 a 1,4% do total de AG, com base no estilo de vida, estado nutricional e ingestão alimentar materna<sup>237</sup>. Estudos mostram que populações que se alimentam de peixe têm concentrações mais elevadas de DHA no LH do que as populações que não consomem alimentos marinhos<sup>238</sup>, reforçando a influência direta da qualidade dos lipídios da dieta materna no perfil de AG do LH<sup>239</sup>.

Nas últimas décadas, evidências de estudos observacionais e ensaios clínicos randomizados têm sugerido que a suplementação materna com AGPICL da série  $\omega$ -3 durante a gravidez e lactação pode elevar os níveis deste AG no LH<sup>240</sup>, nos descendentes<sup>241</sup>, além de levar a mudanças anti-inflamatórias em parâmetros imunológicos (produção de citocinas, liberação do mediador lipídico e populações celulares)<sup>242</sup>, com redução do risco de alergia em crianças. Entretanto, em revisão sistemática realizada pela Colaboração Cochrane<sup>243</sup>, com ensaios clínicos avaliando o impacto da suplementação materna com AGPICL da série  $\omega$ -3 durante a gravidez e/ou amamentação na redução de doença alérgica em crianças, concluiu-se que há poucas evidências para apoiar esta prática uma vez que poucas diferenças nas doenças alérgicas infantis foram vistas entre mulheres que foram suplementadas ou não com AGPICL  $\omega$ -3.

Com relação aos efeitos da suplementação direta de lactentes com AG  $\omega$ -3 dietéticos, estudos epidemiológicos e observacionais apoiam fortemente a sua eficácia na prevenção e melhoria de asma e doenças alérgicas<sup>244,245</sup> e na redução da incidência de doenças respiratórias<sup>246,247</sup> durante a infância. A introdução precoce de peixe tem sido associada com uma prevalência reduzida de eczema<sup>248</sup>, rinite alérgica<sup>249</sup> e broncoespasmo recorrente<sup>250</sup>. Intervenção clínica com suplementos de óleo de peixe em bebês/crianças de 6 meses a 5 anos de idade mostrou que houve uma diminuição da prevalência de sibilos e menor uso de broncodilatador aos 18 meses de idade<sup>251</sup>, e reduziu a sensibilização alérgica e prevalência da tosse aos 3 anos de idade, mas sem efeitos sobre a prevalência de asma<sup>252</sup>.

Segundo o I Consenso da Associação Brasileira de Nutrologia sobre recomendações de DHA durante gestação, lactação e infância<sup>253</sup>, o consumo de fontes adequadas de DHA no Brasil é extremamente baixo e, apesar da ingestão de ácido alfa-linolênico ser adequada entre os brasileiros, a taxa de conversão em DHA é baixa (em torno de 0,5%) e níveis adequados desse nutriente não são atingidos pela população. Ademais, crianças muito jovens apresentam uma imaturidade das enzimas hepáticas que compromete a conversão de todo o DHA necessário ao seu desenvolvimento a partir do ácido alfa-linolênico.

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda o consumo de peixe, no mínimo, duas vezes por semana, porém não há diretrizes para o consumo dos AGPICL EPA e DHA, nem mesmo para gestantes e lactentes<sup>254</sup>. Entretanto, questiona-se a real efetividade dos peixes como fontes importantes de DHA, uma vez que o aumento do consumo de pescado pode estar associado à ingestão aumentada de metais pesados quando de procedência indevida, e uma parte não mensurável dos peixes consumidos no Brasil é criada em cativeiro e não existe regulamentação em relação à composição em DHA das rações utilizadas<sup>253</sup>.

Considerando a importância da ingestão adequada de AGPICL para o desenvolvimento infantil e as inadequações alimentares identificadas nessa população, há um crescente movimento no mercado no sentido de enriquecer alimentos industrializados (como fórmula infantil, compostos lácteos e outros alimentos) diretamente com DHA, tendo como objetivo garantir ingestão suficiente essencial à manutenção de uma vida saudável. Vale ressaltar que no leite de vaca há predominância de AG saturados (cerca de 70% dos ácidos totais), 25% de AG monoinsaturados e apenas 5% de AG poliinsaturados<sup>255</sup>, e que o leite materno apresentando três a quatro vezes mais AA e DHA que o leite de vaca, sendo este considerado insuficiente para atender as necessidades do lactente.

Os AGPICL são ainda considerados ingredientes opcionais para adição nas fórmulas infantis, porém, perante as evidências dos seus efeitos positivos no desenvolvimento infantil, há uma tendência mundial em adicioná-los.

Estudos avaliando a suplementação de fórmulas infantis com AGPICL em prematuros<sup>256</sup> e nascidos a termo<sup>257</sup> sugerem a normalização e melhora da função imunológica após suplementação dietética. Crianças que foram alimentadas com fórmula infantil suplementada com AGPICL exibiram populações de linfócitos, produção de citocinas e maturação de células imunes semelhantes àsquelas de crianças amamentadas, sugerindo que a ingestão dietética de DHA e ARA, quer através do LH ou fórmula infantil, contribui para o desenvolvimento imunológico.

Diversos ensaios clínicos têm investigado especificamente os efeitos da fórmula infantil suplementada com DHA e/ou ARA sobre a ocorrência de doenças respiratórias<sup>245,246,258-260</sup>, diarreias<sup>258,259</sup> e alergias<sup>245</sup>.

Lapillone et al<sup>258</sup> observaram que lactentes alimentados com fórmula infantil com AGPICL tiveram uma menor incidência e retardo no início de doenças respiratórias (bronquite/bronquiolite, estridor) e sintomas de doenças respiratórias (congestão nasal, tosse), bem como de diarreia, ao longo do primeiro ano de vida. Em outro estudo<sup>246</sup>, crianças saudáveis que receberam fórmula suplementada com DHA e ARA também apresentaram uma menor incidência de bronquiolite/bronquite durante o primeiro ano de vida. O enriquecimento de DHA na dieta através do consumo de leite suplementado com óleo de peixe reduziu a incidência e gravidade de infecções respiratórias e diarreia em escolares tailandeses durante o período de 6 meses de suplementação<sup>259</sup>.

No estudo de Birch et al<sup>245</sup>, os lactentes alimentados com fórmula suplementada com DHA e ARA, desde a primeira semana de vida e de forma continuada até 1 ano, tiveram uma incidência reduzida e início retardado não somente de infecções respiratórias, mas também de doenças alérgicas comuns, em comparação com lactentes alimentados com fórmula sem DHA/ARA. Nesse mesmo estudo, o grupo suplementado também teve menos visitas médicas devido a estas doenças ao longo dos primeiros 3 anos de vida. Juntos, estes estudos suportam o conceito de que uma fonte dietética de AGPICL da série  $\omega$ -3 pode melhorar a função imunológica em crianças e, assim, apoiar a resistência a doenças.

Considerando as evidências de que o aumento da ingestão de  $\omega$ -6 sobre  $\omega$ -3 pode ter um impacto sobre os desfechos alérgicos<sup>261</sup>, aumentando a susceptibilidade à sensibilização alérgica, é importante não somente garantir o consumo de quantidades suficientes de AGPICL, mas também uma relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 dentro do recomendado. Yu et al<sup>262</sup>, em estudo avaliando 22 adolescentes com asma e/ou dermatite alérgica e 23 controles da mesma idade não-atópicos, observou que as concentrações de AGPCL  $\omega$ -3 foram reduzidas no soro de alérgicos em comparação com o grupo controle. Além disso, a proporção de  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 foi maior no grupo alérgico.



A razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 na dieta das pessoas que viveram no período que antecedeu a industrialização variava em torno de 1:1 a 2:1, devido ao consumo abundante de vegetais e de alimentos de origem marinha contendo ácidos graxos  $\omega$ -3. Com a industrialização, ocorreu um aumento progressivo dessa razão, devido, principalmente, à produção de óleos refinados oriundos de espécies oleaginosas com alto teor de  $\omega$ -6, resultando em dietas com quantidades inadequadas de ácidos graxos  $\omega$ -3. Nas últimas décadas tem-se determinado, em diversos países, que a ingestão média de ácidos graxos resulta em relações  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 que estão entre 10:1 a 20:1, ocorrendo registros de até 50:1<sup>261</sup>, sendo esse perfil desfavorável, especialmente nas situações em que existe uma resposta inflamatória exacerbada. Torna-se então imprescindível a diminuição da razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 nas dietas modernas.

Diante do exposto, conclui-se que, especialmente durante os 5 primeiros anos de vida, as crianças devem ter garantida a ingestão dietética adequada e suficiente de lipídeos da família  $\omega$ ômega-3 a fim de terem produção endógena de DHA, bem como devem ser estimuladas a consumir fontes nutricionais diretas de DHA. Apesar de estabelecida a importância do DHA na saúde infantil, os requerimentos mínimos ou a ingestão dietética recomendada desse AGPÍCL ainda são desconhecidos na infância. Nos últimos anos, um grupo de especialistas, baseados nas evidências dos estudos sobre suplementação de DHA, concluiu que as fórmulas infantis devem conter, no mínimo, 0,2% do total de lipídeos sob a forma de DHA e não devem exceder 0,5%, além de conter os ácidos ARA e EPA<sup>263</sup>.

### 3.6 $\beta$ -Glucano

$\beta$ -glucanos (BG) são polissacarídeos não amiláceos presentes na estrutura da parede celular de algas, bactérias, leveduras, fungos e plantas superiores como alguns cereais (aveia e cevada)<sup>264</sup>. Nas últimas décadas estes polímeros vêm recebendo especial atenção por sua bioatividade, com efeitos benéficos sobre o metabolismo e sobre a resposta imune.

Eles compõem um grupo heterogêneo de polissacarídeos naturais, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia. A estrutura química dos BG

consiste de uma cadeia linear central de monômeros D-glicose, unidos por ligações B-glicosídicas do tipo  $\beta$  (1-3), com ramificações compostas por ligações do tipo  $\beta$  (1-4) ou  $\beta$  (1-6), a depender de sua fonte. BG de diferentes fontes têm diferenças em suas estruturas e, conseqüentemente, essas diferenças estruturais têm grandes implicações na sua bioatividade<sup>264</sup>.

Os BG isolados de plantas possuem ramificações com ligações do tipo  $\beta$  (1-4) e os provenientes de fungos e leveduras possuem cadeias laterais unidas por ligações do tipo  $\beta$  (1-6)<sup>265</sup>, sendo os isolados de leveduras mais implicados na área imunológica<sup>266</sup>, enquanto que os isolados de plantas estão associados à efeitos metabólicos<sup>267</sup>. Dessa forma, conclui-se que nem todos os BG são capazes de modular as funções imunológicas.

A fibra solúvel BG (1→4 e 1→3) está associada à benefícios nos parâmetros metabólicos. Por sua capacidade de formar um gel viscoso, auxilia no controle de peso, promove diminuição dos picos glicêmicos pós-prandiais<sup>268</sup> e melhora o perfil lipídico sanguíneo, pela diminuição da absorção de gorduras, sais biliares e colesterol no trato gastrointestinal<sup>269</sup>. A sua atuação na prevenção e tratamento de hipercolesterolemia e diabetes têm destacado suas propriedades funcionais na redução da incidência e prevalência de doenças cardiovasculares<sup>270</sup>, sendo de grande valia para a saúde da população em geral. A aveia (*Avena sativa* L.) tem se destacado como uma importante fonte dietética deste tipo de BG<sup>271</sup>, sendo por isso recomendado pela *Food and Drug Administration* (FDA)<sup>272</sup> o consumo diário de, no mínimo, 3 gramas de BG, proveniente de aveia ou cevada, juntamente com uma dieta com baixos níveis de colesterol e gordura saturada, visando reduzir o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Além de sua importante atuação no metabolismo glicídico e lipídico, evidências cumulativas obtidas a partir de modelos animais e estudos em humanos destacam fortemente o efeito imunoestimulante de BG do tipo 1→6 e 1→3, com efeito imunomodulatório em infecções de origem bacteriana, viral, fúngica e parasitária<sup>273</sup>. Vale ressaltar que os BG obtidos de fungos, bactérias e leveduras pertencem a uma classe de substâncias conhecidas como modificadores da resposta biológica, com

Formatado: Fonte: Itálico

atividade imunomodulatória evidente em ambas as direções: positiva (imunostimulação) e também negativa (imunossupressão)<sup>274</sup>.

Uma importante fonte de BG (1→6 e 1→3) é a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>275</sup>, também conhecida como levedura de fermentação, que é amplamente empregada nas indústrias de panificação, cervejaria e sucoalcoleira. Em *S. cerevisiae*, a parede celular representa de 15 a 30% do peso seco total da célula<sup>275</sup>, sendo esta composta por glucano (48-60%), manoproteínas (20-23%), quitina (0,6-2,7%) e uma pequena porção de lipídios<sup>276</sup>.

Os BG extraídos da parede celular de *S. cerevisiae* são imunomoduladores potentes com efeitos sobre a imunidade inata e adaptativa. Esses polissacarídeos são designados como modificadores da resposta biológica, por interagirem com as células de defesa, tais como macrófagos e linfócitos, estimulando-as a aumentar a secreção de substâncias antimicrobianas e, conseqüentemente, potencializando a destruição de microorganismos patogênicos<sup>277</sup>.

O efeito imunostimulante dos BG está relacionado à sua interação com receptores específicos presentes em células do sistema imune, como macrófagos, monócitos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos e células *natural killer*, mas também em células do epitélio intestinal<sup>278</sup>. Inúmeros receptores estão relacionados ao reconhecimento do BG, incluindo dectina-1, receptor do sistema complemento 3 (CR3), lactosilceramida e receptor *scavenger*. O mecanismo de resposta parece ser mediado pela combinação destes, porém o papel melhor esclarecido é o da dectina-1<sup>279</sup>.

A dectina-1 é uma glicoproteína transmembrana tipo II que, ao se ligar a  $\beta$ -1,3 e 1,6 glucano, pode iniciar e regular a resposta imune inata<sup>279</sup>. Este receptor reconhece BG encontrados na parede celular bacteriana ou fúngica e se expressa principalmente em células de origem mielóide, incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos<sup>280</sup>. A ligação dos BG à dectina-1 induz a uma cascata de respostas imunes inatas e adaptativas, tais como fagocitose, *burst* oxidativo, degranulação de neutrófilos e a produção de mediadores lipídicos da

inflamação, citocinas e quimiocinas, considerados mediadores-chave da resposta imune humoral para uma infecção<sup>281</sup>.

Os BG também induzem à mecanismos antialérgicos, o que abre novas perspectivas para o tratamento e prevenção de doenças alérgicas, com base na ativação da resposta Th1 e supressão paralela de reações imunológicas alérgicas, restaurando o equilíbrio Th1/Th2/Th17<sup>282,283</sup>.

Segundo Jesenak et al<sup>280</sup>, o uso de polissacarídeos biologicamente ativos e outros agentes de imunomodulação de origem natural abre novas perspectivas para o tratamento e prevenção de doenças alérgicas, com base na ativação da resposta Th1 com supressão paralela de reações imunológicas alérgicas, e com a restauração do equilíbrio Th1/Th2/Th17.

Diversos estudos têm mostrado o efeito dos BG na proteção contra alergias e infecções respiratórias em adultos<sup>284-287</sup> e crianças<sup>288,289</sup>. Na população adulta, a suplementação oral com BG (1,3)-(1,6) reduziu em 25% a ocorrência de episódios de resfriado comum sintomáticos, durante a estação fria, em indivíduos saudáveis<sup>284</sup>; melhorou os sintomas alérgicos e a severidade dos sintomas<sup>285</sup>; reduziu a congestão nasal induzida por rinite alérgica<sup>286</sup>; e resultou em melhora dos sintomas clínicos de rinoconjuntivite alérgica<sup>287</sup>. Nesses estudos, foram testadas doses variadas de BG (900mg, 250mg e 500mg, por dia, respectivamente), suplementadas por via oral, com duração da intervenção variando de 4 à 16 semanas. Em um dos estudos<sup>287</sup>, a suplementação com BG oral letiniano, extraído do cogumelo *shiitake*, resultou em melhora dos sintomas alérgicos até 6 meses após interrupção do tratamento, sugerindo uma possível manutenção do efeito.

Observa-se a existência de um menor número de estudos avaliando os efeitos dos BG na população pediátrica. Em ensaio clínico<sup>289</sup> realizado com suplementação oral de BG pleurano (extraído do *Pleurotus ostreatus*) em crianças, 36% das suplementadas não sofreu de qualquer infecção respiratória durante o tratamento, comparados aos 21% do grupo placebo ( $p < 0,05$ ).

~~A suplementação com BG pleurano resultou em potencial efeito supressor sobre os marcadores de inflamação alérgica no sangue periférico, especialmente em indivíduos atópicos<sup>286</sup>. A aplicação deste BG estabilizou os níveis de IgE total no soro, além de reduzir a eosinofilia sanguínea periférica.~~

O uso de BG também tem sido associado à mudanças nos marcadores imunológicos. Injeção subcutânea de BG em crianças asmáticas de 6 a 12 anos resultou em aumento dos níveis séricos de IL-10 e redução dos sintomas de asma<sup>290</sup>. O mesmo efeito foi observado em ratos, em que a administração de *curdlan* injetável (BG derivado de *Alcaligenes faecalis*) inibiu o recrutamento de eosinófilos induzido por antígenos e a produção de citocinas Th2 nas vias aéreas, além de induzir a produção de IL-10 por linfócitos T CD4. Em um estudo duplo-cego controlado por placebo<sup>291</sup>, pacientes com rinite alérgica tratados com BG extraído de *S. cerevisiae* durante 12 semanas, em adição ao tratamento anti-alérgico clássico, apresentaram uma diminuição significativa das citocinas Th2 (IL-4 e IL-5), com aumento paralelo da citocina Th1 (IL-12), na amostra do fluido de lavagem nasal. Eles não observaram qualquer mudança no nível de citocinas no grupo controle. Também foi detectada uma redução significativa das quantidades de eosinófilos nas lavagens nasais, mas com uma concentração inalterada no sangue periférico dos pacientes tratados adicionalmente com BG.

Javmen et al<sup>292</sup> mostraram, em experimento com camundongos da linhagem BALB/C, que preparações de BG extraído do *S. cerevisiae* aumentaram a produção de IFN-gama, podendo este ser usado para estimulação do sistema imune em mamíferos. IFN-gama desempenha um papel importante na imunidade contra infecções virais e bacterianas.

Formatado: Não Realce

Formatado: Não Realce

Formatado: Não Realce

Formatado: Não Realce

Todas essas formas de estimulação da imunidade descritas acima são mecanismos que podem auxiliar na resistência às infecções e no controle de doenças alérgicas.

Embora existam numerosas investigações *in vitro* e *in vivo* sobre os efeitos imunomodulatórios dos BG, ensaios clínicos bem controlados em humanos são bastante escassos, principalmente na população pediátrica. Devido a diferentes fontes naturais dos BG, às diferenças de aplicação (intraperitoneal, injeções intravenosas ou subcutâneas, ou por via oral), diferenças na preparação e, portanto, diferenças estruturais, os resultados obtidos nos estudos clínicos são heterogêneos e, muitas vezes, até contraditórios<sup>274</sup>. Diante disso, destaca-se a importância de realização de mais ensaios clínicos avaliando os efeitos dos BG sobre os marcadores imunológicos em crianças e, conseqüentemente, sobre a ocorrência de infecções respiratórias, gastrointestinais e manifestações alérgicas.

Formatado: À esquerda, Espaço  
Depois de: 10 pt, Espaçamento entre  
linhas: Múltiplos 1,15 lin.

#### 4 METODOLOGIA

Estudo prospectivo, duplo cego, randomizado e controlado realizado com crianças de 1 a 4 anos de idade, em 02 creches de Salvador-Ba. As creches situavam-se em

bairros distintos da cidade (Pau da Lima e Nazaré), porém ambas filantrópicas e com população de condição sócio-econômica igualmente baixa. Nelas, as crianças permaneciam em tempo integral (07 às 17h), recebendo um total de 05 refeições ao dia.

Foram elegíveis as crianças de um a quatro anos de idade que estivessem consumindo leite de vaca ou uma bebida láctea por pelo menos 48 horas antes da randomização. Os critérios de exclusão foram: >50% da alimentação total consistindo de leite materno; consumo de prebióticos ou probióticos nos 15 dias anteriores à randomização; diarreia ou IRA durante as 48 horas antes da randomização; um escore Z de peso para a altura < -3; ou qualquer doença grave concomitante.

As crianças elegíveis foram randomizadas para receber um dos dois produtos do estudo de acordo com uma sequência de randomização gerada em computador fornecida pelo patrocinador do estudo (*Mead Johnson Nutrition*). O próximo envelope selado de randomização na sequência era aberto para revelar o código do produto que o participante devia receber. Os rótulos dos produtos (nas cores verde, azul, vermelho e cinza) e os envelopes de randomização foram criados para evitar o desmascaramento, e os produtos do estudo eram semelhantes quanto ao odor, cor e sabor (baunilha). Devido à grande variação de idades e para ajustar os possíveis impactos dessa variável sobre os resultados, os participantes foram estratificados na randomização em faixas etárias de 12-24 meses de idade ou 25-48 meses de idade. Estimou-se que as crianças nessas duas faixas etárias seriam razoavelmente homogêneas em termos dos possíveis resultados relacionados ao consumo do produto em teste, incluindo a susceptibilidade à infecções respiratórias, diarreia e manifestações alérgicas.

O estudo foi realizado no período de outubro de 2011 a abril de 2012, totalizando 28 semanas de intervenção. O Comitê de Ética da Universidade Federal da Bahia aprovou o protocolo (ANEXO A), e pelo menos um dos pais/tutor legal forneceu o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B) assinado antes da inclusão.

No presente ensaio clínico, as crianças foram alimentadas com um CL experimental, de acordo com a definição do *Codex Alimentarius* para a fórmula de seguimento<sup>293</sup> contendo 25mg de DHA, 1,2g de uma mistura de PDX/GOS (proporção de 1:1) e 8,7mg de  $\beta$ -glucano de levedura (Wellmune WGP®, Biothera, Eagan, Minesota) por dose, ou um CL isocalórico e sem suplementos imunomoduladores (grupo controle). Os produtos do estudo foram administrados três vezes ao dia durante 28 semanas. Todos os outros alimentos da dieta das crianças deste estudo foram adequados para a faixa etária e nutricionalmente balanceados com relação aos macronutrientes e micronutrientes.

Os produtos do estudo foram oferecidos em substituição às bebidas habituais do café da manhã, lanche da tarde e jantar. As doses do café da manhã e lanche da tarde foram oferecidas na creche, e a da noite, assim como as do fim de semana e feriados, foram oferecidas em casa pelo cuidador. Cada dose consistia em 40 g de pó diluído em 200mL de água. Após administração do CL, o restante de cada dose era medido e registrado em formulários fonte (ANEXOS C E D). O APÊNDICE A descreve a composição nutricional dos produtos do estudo.

Para oferta diária do produto do estudo em casa as crianças levavam kits semanais contendo o produto em pó (sachês), água mineral e formulários para registro das informações. Os pais/responsáveis legais foram devidamente orientados quanto ao preparo do leite e a anotação dos dados.

O desfecho primário do estudo foi a incidência de IRA, doença diarreica e/ou manifestações alérgicas. A IRA compreendia as infecções respiratórias das vias aéreas superiores (incluindo o resfriado comum, faringite, amigdalite, otite média, sinusite e rinite infecciosas) e as infecções do trato respiratório inferior (incluindo pneumonia, bronquiolite e bronquite)<sup>294</sup>. A doença diarreica foi definida como  $\geq 3$  evacuações de fezes líquidas ou semilíquidas em 24 horas com febre e/ou vômitos e/ou desidratação e comprometimento do estado geral<sup>294</sup>. As manifestações alérgicas incluíam rinite alérgica ou conjuntivite, broncoespasmo, tosse alérgica, eczema e urticária<sup>294</sup>. Os desfechos secundários incluíram a incidência de todos os eventos adversos, o crescimento, as características das fezes, os marcadores



imunológicos fecais e séricos, o nível de ferro e zinco e a incidência de parasitas fecais.

Durante as 28 semanas de estudo foi realizado o registro diário do número de evacuações intestinais e da consistência das fezes: na creche (de segunda à sexta), os dados foram registrados por profissionais da equipe do estudo (ANEXO E); e em casa, esses dados foram registrados pelo cuidador (ANEXO D), com base no guia de consistência das fezes (ANEXO F).

Em uma análise *post hoc*, foi comparada a incidência de constipação durante o estudo nos dois grupos. A constipação foi definida como a presença de pelo menos dois dos seguintes itens por pelo menos duas semanas ininterruptas: fezes duras, dificuldade ou dor para evacuar e um intervalo >72 horas sem evacuações.

Todos os resultados clínicos foram diagnosticados pelos pediatras do estudo. Os participantes eram avaliados pelos pediatras no consultório da creche toda vez que uma queixa de saúde fosse relatada, seja pelos pais/cuidadores ou assistentes da instituição, e esta queixa era registrada em fichas clínicas que caracterizavam detalhadamente o evento, duração, gravidade e conduta adotada (ANEXO G). Além disso, a cada quatro semanas os participantes eram rotineiramente avaliados pela equipe de nutrição do estudo quanto às medidas antropométricas (peso e estatura). Tais medidas de peso e estatura foram obtidas no *baseline* e, a partir de então, a cada quatro semanas, totalizando 08 avaliações antropométricas ao longo do estudo, sendo posteriormente convertidas em *scores Z* baseados nos padrões de crescimento da OMS<sup>295</sup>. As amostras de sangue e fezes foram colhidas no início e no final do estudo para avaliar o número de células do sangue periférico, a ferritina e zinco séricos, os marcadores imunológicos por ELISA (IgAs fecal, e IL-10, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, IL-4 e IFN- $\gamma$  séricos) e os parasitas fecais por microscopia direta. As análises laboratoriais foram realizadas pela *R&D Systems*, Minneapolis, Minnesota, EUA; pela *Doctor's Data*, St. Charles, Illinois, EUA; pelo laboratório Central do C-HUPES-UFBA e Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia da UFBA.

### **Tamanho da amostra e estatística**

Foi necessária uma amostra com 125 crianças por grupo para alcançar 90% de poder estatístico, assumindo-se uma proporção para o grupo controle de 0,5 e uma proporção para o grupo de teste de 0,3 em um nível alfa de 0,05. As frequências de IRA, doença diarreica e manifestações alérgicas foram comparadas através do teste de Cochran-Mantel-Haenszel estratificado pela faixa etária e foram ainda analisadas utilizando o modelo de Andersen-Gill com os eventos recorrentes sendo modelados segundo uma premissa de riscos proporcionais. A IgA secretória fecal e o TGF-  $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 séricos, bem como suas alterações desde o início até o fim do estudo, foram comparados utilizando o teste de van Elteren estratificado pela faixa etária. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado em todos os outros marcadores imunológicos séricos, ferritina e zinco séricos e contagens de sangue periférico, bem como nas alterações da IL-10, ferritina e zinco desde o início até o final do estudo. As alterações nas contagens de células sanguíneas foram analisadas usando a ANCOVA, com os valores iniciais como covariáveis. A frequência de evacuações e a consistência das fezes, os escores Z do peso e estatura para a idade e do peso para estatura foram analisados utilizando a ANOVA para medidas repetidas.

## **5 RESULTADOS**

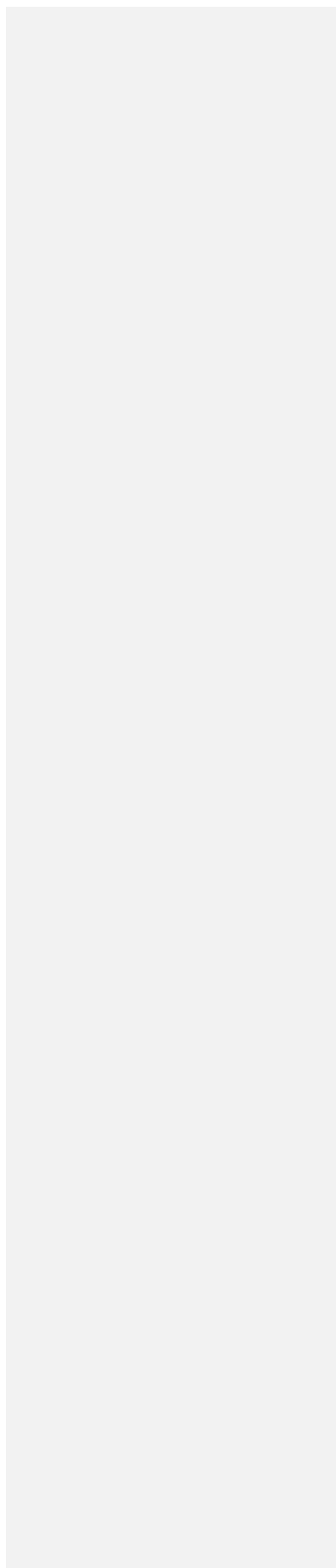
|

Artigo nº 1

**Cow's milk-based beverage consumption in 1- to 4-year-olds and allergic  
manifestations: an Randomized Clinical Trial**

Nutrition Journal 2016;15:19-28

Publicado



RESEARCH

Open Access



# Cow's milk-based beverage consumption in 1- to 4-year-olds and allergic manifestations: an RCT

M. V. Pontes<sup>1</sup>, T. C. M. Ribeiro<sup>1</sup>, H. Ribeiro<sup>1</sup>, A. P. de Mattos<sup>1</sup>, I. R. Almeida<sup>1</sup>, V. M. Leal<sup>1</sup>, G. N. Cabral<sup>1</sup>, S. Stolz<sup>2</sup>, W. Zhuang<sup>2</sup> and D. M. F. Scalabrin<sup>2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Nutrients such as docosahexaenoic acid (DHA), prebiotics and  $\beta$ -glucan have been associated with reduced incidence of respiratory illnesses and allergic manifestations (AM). Our objective was to assess if consumption of a cow's milk-based beverage with these and other nutrients supports respiratory, gastrointestinal, and skin health in otherwise well-nourished, healthy children.

**Methods:** In this double-blind, randomized, controlled trial, healthy children (1–4 years of age) from two daycare centers in Brazil were fed three servings/day of a cow's milk-based beverage (CMBB;  $n = 125$ ) containing DHA, the prebiotics polydextrose (PDX) and galactooligosaccharides (GOS),  $\beta$ -glucan, and other key nutrients, or a control cow's milk-based beverage (control;  $n = 131$ ) for up to 28 weeks. Occurrence of respiratory infections, diarrheal disease and AM was assessed by study pediatricians and the number of episodes were analyzed with the Cochran-Mantel-Haenszel test and the Andersen-Gill model.

**Results:** The CMBB group had fewer episodes of AM, which included allergic rhinitis or conjunctivitis, wheezing, allergic cough, eczema and urticaria, compared to the control group ( $p = 0.021$ ). The hazard ratio for increased number of episodes of AM was lower in the CMBB group compared to control (HR, 0.64; 95 % CI 0.47–0.89;  $p = 0.007$ ). There was no difference in the incidence of respiratory infections and diarrheal disease between groups.

**Conclusion:** A cow's milk-based beverage containing DHA, PDX/GOS, and yeast  $\beta$ -glucan, and supplemented with micronutrients, including zinc, vitamin A and iron, when consumed 3 times/day for 28 weeks by healthy 1- to 4-year-old children was associated with fewer episodes of allergic manifestations in the skin and the respiratory tract.

**Trial registration:** registration number: NCT01431469

**Keywords:** DHA, Prebiotics, Yeast  $\beta$ -glucan, Allergic manifestations, Children

## Background

Two leading causes of morbidity and mortality among children younger than 5 years of age are respiratory infections and diarrheal disease [1], which can be inter-related, as diarrhea increases the risk of lower respiratory infections [1, 2]. The global rise of allergic diseases, including asthma, atopic dermatitis and allergic rhinitis, is another cause of concern in children, with a significant impact on quality of life [3–5]. Nutrition-related

factors are responsible for 11 % of the total global disease burden in children younger than 5 years [6]. Children are particularly vulnerable to diet inadequacies, which can compromise various mechanisms of immune function, thereby increasing risk of infections [7, 8] and also of allergic diseases, since oral tolerance to antigens may be impaired [9]. A recent study in 2- to 6-year-old daycare children from all regions in Brazil showed that even those of the highest socioeconomic levels had insufficient consumption of fiber and micronutrients, including calcium and vitamins D and E [10]. A systematic review concluded that apparently well-nourished children younger than 5 years from developed countries

\* Correspondence: [deolindascalabrin@gmail.com](mailto:deolindascalabrin@gmail.com)

<sup>2</sup>Mead Johnson Pediatric Nutrition Institute, Evansville, IN, USA  
Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Pontes et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

have diets that are inadequate in meeting the recommendations, placing them at nutritional risk [11]. Therefore, even diets of eutrophic children have room for improvement.

There is currently no agreement on the impact of a dietary improvement in children whose nutrient intake meets minimal requirements but may not be the most effective to promote improved health outcomes. Certain nutrients support the immune system, such as long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), especially omega-3 LCPUFAs, whose consumption has been associated with reduced allergic and/or respiratory illnesses in infants and children [12–16]. Likewise, prebiotic digosaccharides support the immune system through stimulation of beneficial gut bacteria [17–20] and were associated with decreased respiratory infections and allergic diseases [21–24].  $\beta$ -glucan, a polysaccharide derived from yeasts, fungi or bacteria, has also demonstrated immune-supporting properties [25, 26], with data showing protection against respiratory infections and allergy in adults and children [26–28]. In a recent randomized clinical trial in 3- to 4-year-old children attending daycare in China, we demonstrated that daily consumption of a cow's-milk based beverage (CMBB) containing a combination of nutrients including docosahexaenoic acid (DHA), the prebiotics polydextrose (PDX) and galactodigosaccharides (GOS), and yeast  $\beta$ -glucan, and enriched with micronutrients such as vitamin A, zinc and iron, was associated with fewer acute respiratory infections (ARI) compared to cow's milk [29].

Our objective in the current study was to evaluate if consumption of the nutritionally enriched CMBB used in the study in China had an effect on the incidence of ARI and diarrheal disease and secondarily on allergic manifestations (AM) in a distinct population of children attending daycare in Brazil. Typically, children in China start attending daycare when they are 3 year-old whereas in Brazil children usually start at daycare when they are 1 year old or earlier. Consequently, we wanted to assess in the current study if potential outcomes associated with consumption of the CMBB are influenced by age, ethnicity, climate and/or socioeconomic status. The implication would be to allow recommendation of the CMBB to children from different parts of the world with diverse ethnic and socioeconomic status.

## Methods

### Population

Children (1 up to 4 years of age) from 2 daycare centers in Salvador, Bahia, Brazil who had been consuming cow's milk or cow's milk-based beverage for at least 48 hours prior to randomization were eligible. Exclusion criteria were: > 50 % of total feedings consisting of breast milk; consumption of prebiotics or probiotics in the 15 days

prior to randomization; diarrhea or ARI during the 48 h prior to randomization; a z-score of weight-for-height < -3; or any serious concurrent illness.

Eligible children were randomly assigned to one of two study products according to a computer-generated randomization sequence provided by the study sponsor (Mead Johnson Nutrition). The next sealed randomization envelope in sequence was opened to reveal the code of the product that the participant should receive. Product labels and randomization envelopes were created to prevent unblinding and the study products were similar in odor, color, and flavor (vanilla). Due to the broad variation of ages and to adjust for any potential impact of age on outcomes, participants were stratified at randomization into 12–24 months of age or 25–48 months of age. We estimated that children in these two age-range groups would be fairly homogenous in terms of potential outcomes related to the consumption of CMBB, including susceptibility to infections, diarrhea and AM.

The study was conducted from October 2011 to April 2012. The Federal University of Bahia Ethical Committee approved the protocol, and a parent/legal guardian provided signed informed consent prior to enrollment.

### Design

In this double-blind (participants and researchers), randomized, controlled, parallel-designed, prospective trial, children were fed an experimental CMBB, according to the CODEX definition for follow-up formula [30], with 25 mg of DHA, 1.2 g of a blend of PDX/GOS (1:1 ratio) and 8.7 mg of yeast  $\beta$ -glucan (Wellmune WGP<sup>®</sup>, Biothera, Eagan, Minnesota) per serving, or an isocaloric, non-supplemented cow's milk-based beverage (control). Study products were given three times per day for 28 weeks, as a replacement for the usual breakfast, afternoon and dinner beverages. The breakfast and afternoon servings were offered by daycare attendants and the evening serving as well as weekend and holiday's servings were offered at home by the caregiver. Each serving consisted of 40 g of powder mixed with 200 mL of water. The leftover of each serving was measured and recorded. See Table 1 for nutrient composition of study products.

### Outcomes

The primary outcome was incidence of ARI and/or diarrheal disease. ARI comprised upper respiratory infections, including common cold, pharyngitis, tonsillitis, otitis media, infectious sinusitis and rhinitis, and lower respiratory infections, including pneumonia, bronchiolitis and bronchitis [31]. Diarrheal disease was defined as  $\geq 3$  liquid or semi-liquid stools in 24 h with fever and/or vomiting and/or dehydration and compromised general status. Secondary outcomes included incidence of AM (allergic rhinitis or conjunctivitis, wheezing, allergic cough, eczema

**Table 1** Nutrient composition of study products

Per 40 g serving of powder	Control	CMBB
Energy, kcal	180	180
Protein, g	7.3	7.3
Fat, g	6.6	6.6
- DHA, mg	-	25
Carbohydrate, g	23	23
- Dietary fiber, g (1:1 ratio PDX/GOS)	-	1.2
- Beta-1,3/1,6-glucans, mg	-	8.7
Vitamin A, IU	380	630
Vitamin D, IU	31	119
Vitamin E, IU	0.33	2.6
Vitamin K, mcg	0.41	9.5
Thiamine, mcg	57	210
Riboflavin, mcg	520	490
Vitamin B <sub>6</sub> , mcg	42	183
Vitamin B <sub>12</sub> , mcg	0.72	0.72
Niacin, mcg	144	2200
Folic acid, mcg	7.8	31
Pantothenic acid, mcg	770	1160
Biotin, mcg	5.4	4.7
Vitamin C, mg	2.4	29
Choline, mg	28	44
Calcium, mg	280	290
Phosphorus, mg	200	187
Magnesium, mg	25	26
Sodium, mg	97	96
Potassium, mg	400	420
Chloride, mg	330	320
Iodine, mcg	13.4	15.2
Iron, mg	0.05	3.0
Zinc, mg	0.72	2.3
Manganese, mcg	5	19.2
Copper, mcg	4.8	8.2

- Indicates that product did not contain the nutrient

and urticaria) [31], incidence of all adverse events, growth, stool characteristics, fecal and serum immune markers, iron and zinc status and incidence of stool parasites.

In a *post hoc* analysis, we compared incidence of constipation during the study in the two study groups. Constipation was defined as presence of at least two of the following for at least two uninterrupted weeks: hard stools, difficulty or pain to defecate and a >72-h interval without defecation.

All clinical outcomes were diagnosed by study pediatricians. Participants were evaluated by study pediatricians at the pediatric office in the daycare every time a health complaint was reported, either by parents/caregivers or

daycare assistants. In addition, every 4 weeks participants were routinely assessed by study pediatricians at the time of anthropometric measurements. Weight and length/height measurements were obtained during randomization and every 4 weeks thereafter and converted into z-scores based on WHO growth standards [32]. Blood and stool samples were collected at baseline and end of study to assess peripheral blood cell count, serum ferritin and zinc, immune markers by ELISA (fecal secretory IgA and serum IL-10, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, IL-4 and IFN- $\gamma$ ) and stool parasites by direct microscopy. Laboratory analyses were conducted by R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Doctor's Data, St. Charles, IL, USA; and the study site's local lab.

#### Sample size and statistics

A sample size of 125 completed per group was needed to achieve 90 % power, assuming a control group proportion of 0.5 and a test group proportion of 0.3 at an alpha level of 0.05. Frequencies of ARI, diarrheal disease and AM were compared using the Cochran-Mantel-Haenszel test stratified by age category and were further analyzed using the Andersen-Gill model with recurrent events modeled under the framework of the proportional hazards assumption. Fecal sIgA and serum TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 as well as their changes from baseline to end of study were compared using the van Elteren test stratified by age category. The Kruskal-Wallis test was used for all other serum immune markers, serum ferritin and zinc and peripheral blood counts, as well as changes in IL-10 and ferritin and zinc from baseline to end of study. Changes in peripheral blood counts were analyzed using ANCOVA, with baseline values as covariates. Stool frequency and consistency and weight- and length/height-for-age and weight-for-length/height z-scores were analyzed using repeated measures ANOVA.

## Results

### Study population and clinical outcomes

The study enrolled 256 children (control = 131; CMBB = 125); 2 discontinued in control and five in the CMBB group. Demographic and baseline characteristics (race, age, gender distribution and weight- and length/height-for-age and weight-for-length/height z-scores) were similar between groups. There were no growth differences between groups during the study. In both groups there was significant increase from baseline to end of study in weight- and length/height-for-age z-scores, as well as weight-for-length/height z-scores (females: 0.4 and 0.2 to 0.5 and 0.3; males: 0.4 and 0.4 to 0.5 and 0.5, in control and CMBB, respectively;  $p < 0.001$ ). The average daily intake of study products was not significantly different between groups over the duration of the study (12–24 months of age: control 531 mL/day vs. CMBB 504 mL/day,  $p = 0.32$ ; 25–



48 months of age: control 547 mL/day vs. CMBB 498 mL/day,  $p = 0.06$ ).

There was no difference in the incidence of ARI or diarrheal disease between groups. The CMBB group had fewer episodes of AM compared to control (Table 2). The hazard ratio for increased number of episodes of AM was lower in the CMBB group compared to control, with no difference for ARI or diarrheal disease (Fig. 1). There was no significant difference between groups in the hazard ratio of having at least one episode of ARI (0.93, 95 % CI 0.49, 1.79;  $p = 0.84$ ), diarrheal disease (1.57, 95 % CI 0.71, 3.46;  $p = 0.26$ ) or AM (0.61, 95 % CI 0.36, 1.04;  $p = 0.07$ ). Among 99 types of adverse events reported and compared between groups, only occurrence of thrush was statistically different between groups (5 cases in CMBB vs. none in control;  $p = 0.03$ ); 10 participants who experienced at least one serious adverse event were reported in the control vs. 2 in the CMBB group.

The CMBB group had softer stools compared with control in the first 3 months of the study ( $p \leq 0.024$ ). In the subgroup of children 12–24 months of age, 8 of 98 children (8 %) met the criteria for constipation. However, all were in the control group, and five of the eight (63 %) remained constipated at end of the study. In the subgroup of children 25–48 months of age, no significant difference was detected in the percentage of children who remained constipated at end of study (CMBB group 1/14; 7 % vs. control group 3/10; 30 %;  $p = 0.27$ ).

#### Blood and fecal outcomes

There were no differences between groups in any of the measured immune markers (Table 3). Additionally, no relevant differences were observed between groups for serum zinc and ferritin, hemoglobin, hematocrit, and red blood cells (Table 4); white blood cells and platelets (Table 5). According to WHO criteria (anemia: hemoglobin < 11 g/dL) [33], 18.04 % of the overall population was anemic at baseline and 13.33 % at end of

study; 37.50 % was iron deficient at baseline and 45.83 % at end of study (iron deficiency: ferritin < 12 ng/mL) [33], with no differences between groups. Incidence of fecal parasites detected among the 17 assessed parasites is presented in Table 6.

#### Discussion

In this randomized, double-blind, controlled study we demonstrated for the first time that healthy 1- to 4-year-old children who consumed a CMBB with DHA, PDX/GOS and yeast  $\beta$ -glucan for 28 weeks had fewer AM episodes compared to children who consumed an unfortified, cow's milk-based beverage. No effect on ARI or diarrheal disease was associated with consumption of the CMBB.

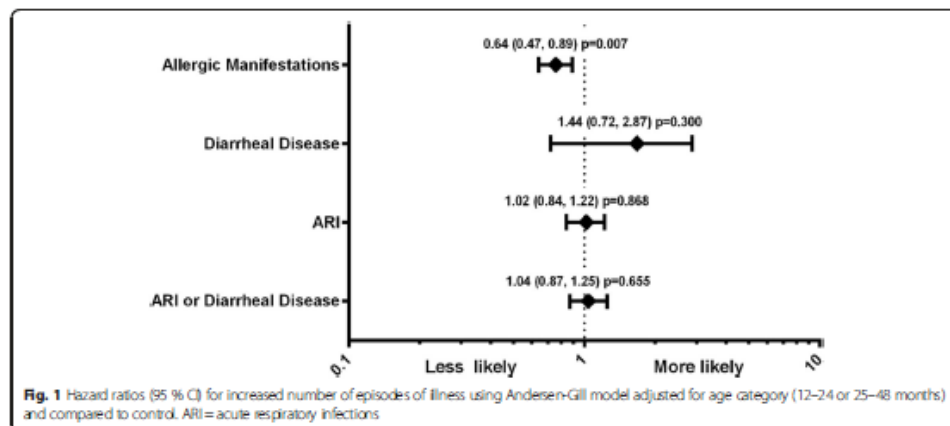
These results are consistent with studies linking protection against AM with LCPUFAs [12, 34], prebiotics [21, 22, 35] and  $\beta$ -glucan [28, 36, 37]. Dietary LCPUFAs were associated with less atopic dermatitis and wheezing [12, 34], and amelioration of symptoms in asthmatic children [38]. Likewise, prebiotics have been associated with reduced incidence of atopic dermatitis, wheezing and allergic rhinitis [21, 35].  $\beta$ -glucan was shown to alleviate symptoms of asthma in children when injected subcutaneously for 8 weeks [39] and symptoms of allergic rhinitis in adults [28, 36, 37]. In an RCT, adults with seasonal allergic rhinitis receiving  $\beta$ -glucan 250 mg/day orally for 4 weeks had reduced nasal and eye symptoms compared with a group who received placebo [28]. Additionally, vitamin D deficiency has been correlated with respiratory allergy [40], thus the addition of vitamin D to the CMBB could have contributed to our results. Future studies may identify the contribution of individual nutrients to the present findings.

LCPUFAs modulate some aspects of the innate and adaptive immune systems via different mechanisms, affecting cell membrane fluidity, membrane receptors and signaling pathways. DHA can prevent NF- $\kappa$ B

**Table 2** Frequency of episodes of illness during the 28-week study period

	Number of episodes						p-value*
	None	1	2	3	4	>5	
<b>Acute respiratory infections (ARI)</b>							
Control; n (%)	25 (19)	40 (31)	28 (21)	21 (16)	10 (8)	7 (5)	0.938
CMBB; n (%)	25 (20)	40 (32)	24 (19)	16 (13)	14 (11)	6 (5)	
<b>Diarrheal disease</b>							
Control; n (%)	119 (91)	11 (8)	0 (0)	1 (1)	–	–	0.354
CMBB; n (%)	108 (86)	15 (12)	2 (2)	0 (0)	–	–	
<b>Allergic manifestations (AM)</b>							
Control; n (%)	71 (54)	30 (23)	19 (15)	10 (8)	1 (1)	–	0.021
CMBB; n (%)	81 (65)	28 (22)	12 (10)	3(2)	1 (1)	–	

\*Statistical analysis used Cochran-Mantel-Haenszel test adjusted for age category

**Table 3** Comparison of immune markers between study groups

Variable <sup>a</sup>	Control median (IQR) <sup>b</sup>	CMBB median (IQR) <sup>b</sup>	p-value <sup>a</sup>
Fecal Secretory IgA, mg/dL			
Baseline	102 (12–226)	67 (7–228)	0.975
Week 28	45 (8–183)	32 (6–153)	0.452
Baseline to Week 28	-1 (-110–28)	-5 (-131–24)	0.664
IL-10, pg/mL			
Baseline	19.1 (11.9–27.5)	17.3 (12.0–27.6)	0.760
Week 28	13.9 (9.1–18.6)	13.6 (9.8–19.1)	0.771
Baseline to Week 28	-4.9 (-13.0–3.0)	-3.9 (-12.0–0.0)	0.827
TGF-β1, pg/mL			
Baseline	20572 (15943–25641)	22386 (17161–29081)	0.109
Week 28	29133 (22432–35466)	29131 (22010–37532)	0.957
Baseline to Week 28	7863 (2569–14178)	6351 (-1346–12472)	0.132
TGF-β2, pg/mL <sup>c</sup>			
Baseline	344.1 (252.9–479.8)	326.0 (2262.2–461.7)	0.801
Week 28	438.1 (296.7–600.2)	414.5 (2331.0–586.3)	0.602
Baseline to Week 28	48.7 (0–123)	48.7 (0–125)	0.465
IL-4, pg/mL <sup>d</sup>			
Baseline	<1.6 (<1.6–<1.6)	<1.6 (<1.6–<1.6)	0.305
Week 28	<1.6 (<1.6–<1.6)	<1.6 (<1.6–<1.6)	0.305
IFN-γ, pg/mL <sup>d</sup>			
Baseline	<15.6 (<15.6–<15.6)	<15.6 (<15.6–<15.6)	0.368
Week 28	<15.6 (<15.6–<15.6)	<15.6 (<15.6–<15.6)	0.378

<sup>a</sup>All markers except fecal secretory IgA were measured in serum<sup>b</sup>IQR = 25–75 % interquartile range<sup>c</sup>28 % of samples were under the detection limit<sup>d</sup>Changes from baseline to week 28 were not analyzed because most of the samples were under detection limit<sup>e</sup>Van Elteren test stratified by age category was used for fecal secretory IgA, TGF-β1 and TGF-β2; Kruskal-Wallis test was used for all other immune markers



**Table 4** Comparison of zinc, iron and red blood cell status between study groups

Variable	Control median (IQR) <sup>a</sup>	CMBB median (IQR) <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>
Serum Zinc, $\mu\text{mol/L}$			
Baseline	21.4 (17.6–25.4)	21.8 (17.2–25.9)	0.793
Week 28	24.4 (20.5–29.5)	24.6 (20.2–28.2)	0.648
Baseline to Week 28	3.2 (–1.0–8.0)	3.3 (–2.0–8.0)	0.820
Serum Ferritin, ng/mL <sup>b</sup>			
Baseline	16.4 (<10–26.2)	14.8 (<10–21.8)	0.413
Week 28	13.5 (<10–19.6)	13.3 (<10–21.8)	0.863
Baseline to Week 28	–2.2 (–10.0–3.0)	0.0 (–7.0–6.0)	0.148
Hemoglobin, g/dL			
Baseline	11.8 (11.2–12.3)	11.7 (11.1–12.3)	0.432
Week 28	12.0 (11.4–12.6)	11.9 (11.4–12.5)	0.595
Baseline to Week 28 <sup>c</sup>	0.26 (0.1)	0.30 (0.1)	0.561
Hematocrit, %			
Baseline	35.5 (34.0–37.1)	35.3 (33.8–37.2)	0.560
Week 28	35.1 (33.0–36.9)	34.9 (33.4–36.8)	0.736
Baseline to Week 28 <sup>c</sup>	–0.41 (0.2)	0.32 (0.2)	0.747
Red Blood Cells, $\times 10^9/\text{mL}$			
Baseline	4.6 (4.4–4.8)	4.6 (4.4–4.8)	0.678
Week 28	4.6 (4.3–4.7)	4.5 (4.2–4.8)	0.200
Baseline to Week 28 <sup>c</sup>	–0.05 (0.0)	–0.12 (0.0)	0.024

<sup>a</sup>IQR = 25–75 % interquartile range<sup>b</sup>26 % of the samples were at or under the detection limit<sup>c</sup>Changes from baseline to study week 28 were analyzed using analysis of covariance (ANCOVA), with baseline values as covariate; the values listed are adjusted mean (SE)

\*Kruskal-Wallis test was used for all variables except the ones described in footnote c

**Table 5** Comparison of white blood cells and platelets between study groups

Variable	Control median (IQR) <sup>a</sup>	CMBB median (IQR) <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>
White Blood Cells, $\times 10^9/\text{mL}$			
Baseline	9.7 (7.5–11.4)	9.1 (7.3–11.6)	0.471
Week 28	8.3 (7.2–10.6)	8.5 (7.2–10.1)	0.710
Baseline to Week 28 <sup>b</sup>	–0.95 (0.2)	–0.75 (0.2)	0.565
Neutrophils, %			
Baseline	41.0 (29.5–49.5)	36.4 (28.4–45.5)	0.069
Week 28	38.8 (28.9–47.2)	37.2 (29.9–45.3)	0.371
Baseline to Week 28 <sup>b</sup>	0.25 (1.0)	–0.57 (1.1)	0.578
Lymphocytes, %			
Baseline	45.7 (35.0–55.7)	50.9 (40.2–58.0)	0.028
Week 28	47.1 (37.6–56.3)	48.3 (40.8–56.5)	0.230
Baseline to Week 28 <sup>b</sup>	–0.26 (1.0)	0.99 (1.0)	0.390
Platelets, $\times 10^9/\text{mL}$			
Baseline	341 (286–401)	345.5 (301.5–400.5)	0.760
Week 28	315 (266–369)	311 (263–367)	0.771
Baseline to Week 28 <sup>b</sup>	–3.9 (0.77)	–3.7 (0.82)	0.837

<sup>a</sup>IQR = 25–75 % interquartile range<sup>b</sup>Changes from baseline to study week 28 were analyzed using analysis of covariance (ANCOVA), with baseline values as covariate; the values listed are adjusted mean (SE)

\*Kruskal-Wallis test was used for baseline and study week 28 values of all variables in this table

**Table 6** Incidence of fecal parasites at baseline and study week 28 in the overall population<sup>a</sup>

Type of parasite	12–24 months of age n (%)	25–48 months of age n (%)
<i>Giardia duodenalis</i>		
Baseline	21 (21.6)	38 (24.4)
Week 28	36 (37.9)	37 (25.7)
<i>Blastocystis hominis</i>		
Baseline	2 (2.1)	4 (2.6)
Week 28	6 (6.3)	7 (4.9)
<i>Endolimax nana</i>		
Baseline	0 (0)	9 (5.8)
Week 28	5 (5.3)	4 (2.8)
<i>Entamoeba coli</i>		
Baseline	0 (0)	7 (4.5)
Week 28	0 (0)	8 (5.6)
<i>Ascaris lumbricoides</i>		
Baseline	1 (1.0)	3 (1.9)
Week 28	0 (0)	4 (2.8)
<i>Trichuris trichiura</i>		
Baseline	0 (0)	3 (1.9)
Week 28	0 (0)	4 (2.8)
<i>Cryptosporidium</i> sp.		
Baseline	3 (3.1)	0 (0)
Week 28	0 (0)	0 (0)
<i>Entamoeba histolytica</i>		
Baseline	0 (0)	0 (0)
Week 28	0 (0)	1 (0.7)

<sup>a</sup>Participants from both study groups combined. Participants who were symptomatic as per physician's evaluation received anti-parasite treatment during the study

activation with consequent decrease in production of IgE and pro-inflammatory cytokines that initiate and prolong allergic reactions [41]. DHA metabolites such as resolvins and protectins also act to limit inflammation [42]. Prebiotics, through stimulation of gut bacteria, may cause skewing of the perinatal allergy-prone Th2 milieu towards a balanced Th1 immune pathway [43].  $\beta$ -glucan polysaccharides may also induce anti-allergic mechanisms [44]. In asthmatic children,  $\beta$ -glucan promoted an increase of IL-10 cytokine [39], which can inhibit Th2 mediators and allergic inflammation [45]. Interestingly, higher exposure to microbial components endotoxin and  $\beta$ -glucan was associated with decreased risk of sensitization to inhalant allergens, in accordance with the hygiene hypothesis [46].

Similar to the study in China [29], there was no effect on diarrheal disease in the current study. Additionally, we found no effect of CMBB on ARI in the Brazilian cohort, in contrast to the study in China in which the

CMBB group had fewer episodes of ARI and just one case of AM in the whole study population [29]. Several factors could explain the different results. The diverse racial and genetic backgrounds of the two populations may have differently affected the impact of the various nutrients of the CMBB on the immune system. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three trial reported low prevalence of asthma and wheezing in the Asia-Pacific region and high prevalence in Latin America [47] and Brazil is among the countries with the highest prevalence of asthma [48]. Repeated episodes of ARI were more frequent in the Brazil study, likely due to the younger age (1–4 years vs. 3–4 years in China) and predisposing conditions linked to lower socioeconomic level in the Brazil cohort.

The combined prevalence of *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* in our study (up to 5.6 % in the 2- to 4 year-olds at study week 28) is similar to the 5.4 % prevalence of these helminths reported in children attending daycare in Salvador, Brazil [49] and lower than the prevalence reported in daycare children in São Paulo (13 %) [50]. However, the prevalence of *Giardia duodenalis* in our study (up to 26 % in the 2- to 4-year-olds at study week 28) was higher than the prevalence of *Giardia* in those two studies [49, 50]. Intestinal parasites may have contributed to the high incidence of AM in our cohort, as suggested in a large survey in Brazilian children < 5 years [51], including *Giardia*, which was shown to be a risk factor for allergy [52].

Five children in the CMBB group, corresponding to 2 % of the overall population, were diagnosed with thrush; one of them had varicella and one had been on a recent course of antibiotic, both potential risk factors for thrush [53]. High rates of colonization with *Candida* are reported in healthy children, 12.5 % in 2 year-olds [54] and 45 % in 3 to 5 year-olds [55]. We found an incidence of thrush of 2.4 % in a previous study evaluating an experimental cow's milk-based beverage in one of the daycare centers of the current study [56], corresponding to three cases in the control group and suggesting that thrush is not uncommon in that population of daycare children.

In the first 3 months of the study, the CMBB group had softer stools compared with control. We previously demonstrated that daycare children of a similar age receiving a CMBB with the same prebiotic blend used in this study had softer and more frequent stools [56]. There are very limited data on the role of prebiotics to alleviate constipation in young children [57]. In the current study, no conclusions can be made regarding the incidence of constipation in the 12- to 24- month age group, since no one in this group receiving the CMBB met the criteria for constipation in the *post hoc* analysis. In the small number of participants who met the criteria

for constipation in the 25- to 48- month age group, fewer children receiving CMBB remained constipated at end of study than control, although the difference was not statistically significant.

An increase in weight and length/height z-scores from baseline to end of study was observed in both groups but there were no differences in growth between the two groups. According to standard criteria to diagnose malnutrition [58], none of the children were malnourished at enrollment. Inadequate adherence to dietary guidelines has been identified in apparently well-nourished children < 5 years of age [11]. Moreover, young children consuming unfortified cow's milk were found to be at increased risk of insufficient intake of various nutrients, including iron and vitamin D, compared with those consuming a fortified CMBB [59, 60]. These data suggest that the use of a CMBB such as the one in this study may be justified to correct inadequate nutrient intake leading to hidden nutritional deficiencies that can impact a child's health and development in the absence of an effect on growth. Iron deficiency, for instance, can lead to decreased cognitive function even in the absence of anemia [61]. Additionally, some nutrient deficiencies such as zinc deficiency impair normal appetite prompting a vicious circle; thus correction of the deficiency helps establish an adequate eating pattern [62].

There were no differences between groups in zinc and iron status at onset and end of study, with an incidence of anemia in the overall population of 18 and 13 %, at baseline and end of study, respectively. Reported prevalence of anemia in Brazil reached 47 % in children < 5 years of age, affecting all income strata but being higher in the poorest ones [63]. Participants in our study spent all weekdays at the daycare, receiving a high standard of dietary care, which likely contributed to the low incidence of anemia. Our findings are consistent with data showing a positive association between daycare attendance and hemoglobin level [64], which points to daycare attendance as protective against anemia.

The strengths of the current study include confirmation of diagnosis of ARI, diarrheal disease and AM as well as adverse events by experienced study pediatricians, close monitoring of the children at the daycare on a daily basis and meticulous assessment of intake of study formula. A weakness of the study is the inclusion of four immune active components and increased amount of minerals and vitamins in an experimental formula compared to a control formula without those improvements, which does not allow attributing the benefits of the experimental formula to individual components.

## Conclusion

In this study, regular consumption of a cow's milk-based beverage containing DHA, PDX/GOS, and yeast  $\beta$ -glucan, and supplemented with micronutrients including zinc, vitamins A and D, and iron promoted improved immune outcomes, with fewer episodes of allergic manifestations in the skin and the respiratory tract in young children. These outcomes are highly relevant for a child's overall health and physical, cognitive, psychological and social development and may contribute to the quality of life of the whole family, potentially decreasing school absenteeism, thus allowing less disruption on the lives of working parents. They may also have a direct economical impact linked to the cost of treating AM episodes, for parents and the health care system, and those costs likely surpass the cost of providing CMBB to the child.

Naturally occurring prebiotics,  $\beta$ -glucan and DHA are usually present in normal diet but their levels vary according to the quality of the diet and may not be sufficient to promote measurable health benefits. A CMBB such as the one used in this study may be of benefit in increasing the intake of such nutrients and correcting nutritional deficiencies that can affect immune function. We propose that a CMBB should be consumed in the context of a healthy, balanced diet. Since this is the first study showing a benefit of this CMBB on allergic manifestations in healthy young children, additional studies are warranted to confirm the current results and reinforce the recommendation of this formula to help reducing allergic manifestations.

## Ethics approval

The Research Ethics Committee of the University Hospital Complex Professor Edgard Santos, Federal University of Bahia, Brazil, and the National Research Ethics Committee (CONEP) approved this project on April 4, 2011 (NO. 76/2009).

## Abbreviations

AM: Allergic manifestation(s); ANCOVA: Analysis of covariance; ANOVA: Analysis of variance; ARI: Acute respiratory infection(s); CMBB: Cow's milk-based beverage; DHA: Docosahexaenoic acid; GOS: Galactooligosaccharides; IFN: Interferon; Ig: Immunoglobulin; IL: Interleukin; LCPUFAs: Long-chain polyunsaturated fatty acids; NF: Nuclear factor; PDX: Polydextrose; RCT: Randomized controlled trial; TGF: Tumor growth factor.

## Competing interest

Dr. Scialabrin, S. Stolz and W. Zhuang work in Clinical Research, Department of Medical Affairs at Mead Johnson Nutrition. All of the remaining authors have no competing interest to disclose.

## Authors' contributions

MVP conceptualized and designed the study, coordinated data collection and analysis, reviewed and revised the manuscript, and approved the final manuscript. TCMR conceptualized and designed the study, supervised and coordinated data collection and analysis, interpreted the data, reviewed and revised the manuscript, and approved the final manuscript. HR conceptualized and designed the study, supervised data collection, interpreted the data, reviewed and revised the manuscript, and approved



the final manuscript. APdM conceptualized and designed the study, coordinated data collection, reviewed and revised the manuscript, and approved the final manuscript. IRA participated in data collection, reviewed and revised the manuscript, and approved the final manuscript. VML participated in data collection, reviewed and revised the manuscript, and approved the final manuscript. GNC participated in data collection, reviewed and revised the manuscript, and approved the final manuscript. SS conceptualized and designed the study, monitored data collection, reviewed and revised the manuscript, and approved the final manuscript. WZ analyzed and interpreted the data, reviewed and revised the manuscript, and approved the final manuscript. DMFS conceptualized and designed the study, analyzed and interpreted the data, reviewed and revised the manuscript, and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

We thank the children and parents who participated in the study, the coordinators of the daycares, Clese Cerqueira and Lígia Valente, and the daycare staff for their collaboration. We thank Paul Strong, PhD for writing assistance, and Cheryl Harris, MS for assistance with the statistical analysis/interpretation.

#### Funding source

This study was funded by Mead Johnson Nutrition.

#### Financial disclosure

The study products were provided by Mead Johnson Nutrition. Dr. Scalabrin, S. Stoltz, and W. Zhuang work in Clinical Research, Department of Medical Affairs at Mead Johnson Nutrition. All of the remaining authors have no financial relationships to disclose.

#### Author details

<sup>1</sup>Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil. <sup>2</sup>Mead Johnson Pediatric Nutrition Institute, Evansville, IN, USA.

Received: 10 November 2015 Accepted: 18 February 2016

Published online: 27 February 2016

#### References

- Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan J, Lawn JE, Cousens S, Mathes C, Black RE. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*. 2014;385:430–40.
- Walker CL, Peim J, Katz J, Tielch JM, Black RE. Diarrhea as a risk factor for acute lower respiratory tract infections among young children in low income settings. *J Glob Health*. 2013;3(010402).
- Asher M, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC phases one and three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006;368:733–43.
- Scheer SH, Noone SA, Munoz-Furlong A. The impact of childhood food allergy on quality of life. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;87:461–4.
- Melzer EO. Quality of life in adults and children with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:545–53.
- Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, Mathes C, Rivera J. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet*. 2008;371:243–60.
- Rytter MJ, Kolte L, Briend A, Fris H, Christensen VB. The immune system in children with malnutrition—a systematic review. *PLoS One*. 2014;9:e105017.
- Cunningham-Rundles S, McNeelley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:1119–28. quiz 1129.
- Campbell DJ, Murch SH, Eka M, Sullivan PB, Sanyang MS, Jobarteh B, Lunn PG. Chronic T cell-mediated enteropathy in rural West African children: relationship with nutritional status and small bowel function. *Pediatr Res*. 2003;54:306–11.
- Bueno MB, Fisberg RM, Maximino P, Rodrigues Gde P, Fisberg M. Nutritional risk among Brazilian children 2 to 6 years old: a multicenter study. *Nutrition*. 2013;29:405–10.
- Smithers LG, Golley RK, Bradonir L, Lynch JW. Characterizing whole diets of young children from developed countries and the association between diet and health: a systematic review. *Nutr Rev*. 2011;69:649–67.
- Birch EE, Khoury JC, Bereseth C, Castaneda YS, Couch JM, Bean J, Tamer R, Harris CL, Mirmesser SH, Scalabrin DM. The impact of early nutrition on incidence of allergic manifestations and common respiratory illnesses in children. *J Pediatr*. 2010;156:902–6. 906 e901.
- Lapillonne A, Pastor N, Zhuang W, Scalabrin DM. Infants fed formula with added long chain polyunsaturated fatty acids have reduced incidence of respiratory illnesses and diarrhea during the first year of life. *BMC Pediatr*. 2014;14:168.
- Thienprasert A, Samuhaseneetoo S, Popplestone K, West AL, Miles EA, Calder PC. Fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids selectively affect plasma cytokines and decrease illness in Thai schoolchildren: a randomized, double-blind, placebo-controlled intervention trial. *J Pediatr*. 2009;154:391–5.
- Mirza LM, Kering EH, Neely MR, Sullivan DK, Wampler J, Harris CL, Bereseth CL, Carlson SE. Toddler formula supplemented with docosahexaenoic acid (DHA) improves DHA status and respiratory health in a randomized, double-blind, controlled trial of US children less than 3 years of age. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2010;82:287–98.
- Hageman JH, Hooyenga P, Diersen-Schade DA, Scalabrin DM, Wichers HJ, Birch EE. The impact of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids on respiratory illness in infants and children. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012;12:564–73.
- Fanaro S, Marten B, Bagna R, Vigi V, Fabris C, Pena-Quintana L, Arguelles F, Scholz-Ahrens KE, Sawatzki G, Zelenka R, et al. Galactooligosaccharides are bifidogenic and safe at weaning: a double-blind randomized multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009;48:82–8.
- Scalabrin DM, Mirmesser SH, Welling GW, Harris CL, Maruyuz JD, Walker DC, Bos NA, Tolkkio S, Salminen S, Vanderhoof JA. New prebiotic blend of polydextrose and galactooligosaccharides has a bifidogenic effect in young infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54:343–52.
- Scholten PA, Alliet P, Raes M, Alles MS, Koes H, Boehm G, Knippen LM, Knol J, Vandeplass Y. Fecal secretory immunoglobulin A is increased in healthy infants who receive a formula with short-chain galactooligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides. *J Nutr*. 2008;138:1141–7.
- Giovannini M, Verdaci E, Gregori D, Ballali S, Soldi S, Ghisleri D, et al. Prebiotic effect of an infant formula supplemented with galactooligosaccharides: randomized multicenter trial. *J Am Coll Nutr*. 2014;23:385–93.
- Aslanoglu S, Moro GE, Boehm G, Wierz F, Stahl B, Bertino E. Early neutral prebiotic oligosaccharide supplementation reduces the incidence of some allergic manifestations in the first 5 years of life. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012;26:49–59.
- Osborn DA, Sinn JK. Prebiotics in infants for prevention of allergy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;3CD006474.
- Luoto R, Ruuskanen O, Waris M, Kalliomaki M, Salminen S, Isolauri E. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: A randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:405–13.
- Chatchatee P, Lee WS, Camilho E, Kosuwon P, Smalakachon N, Yavuz Y, Schouten B, Graaff PL, Szajewska H. Effects of growing-up milk supplemented with prebiotics and LCPUFAs on infections in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;58:428–37.
- Jesenak M, Hrubisko M, Majtan J, Rennerova Z, Banovic P. Anti-allergic effect of Pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. *Phytother Res*. 2014;28:471–4.
- Jesenak M, Majtan J, Rennerova Z, Kyselovic J, Banovic P, Hrubisko M. Immunomodulatory effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. *Int Immunopharmacol*. 2013;15:395–9.
- Auinger A, Riedel L, Bothe G, Busch R, Guenwald J. Yeast (1,3)-(1,6)-beta-glucan helps to maintain the body's defence against pathogens: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicentric study in healthy subjects. *Eur J Nutr*. 2013;52(8):1913–8.
- Talbot SM, Talbot JA, Talbot TL, Dingler E. Beta-glucan supplementation, allergy symptoms, and quality of life in self-described ragweed allergy sufferers. *Food Sci Nutr*. 2013;1:90–101.
- Li F, Jin X, Liu B, Zhuang W, Scalabrin D. Follow-up formula consumption in 3- to 4-year-olds and respiratory infections: an RCT. *Pediatrics*. 2014;133:e1533–1540.
- CODEX. Codex standard for follow-up formula: codex stan 156–1987. Geneva: Codex; 1987.
- Kliegman RM, Stanton BF, Schor NF, St. Geme JW, Behrman RE. Nelson Textbook of Pediatrics. 19th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2011.

32. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl.* 2006;450:76–85.
33. World Health Organization. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control: a guide for programme managers. Geneva: WHO/NHD/013; 2001.
34. DVaz N, Meldrum SJ, Dunstan JA, Martino D, McCarthy S, Metcalfe J, Tulic MK, Mori TA, Prescott SL. Postnatal fish oil supplementation in high-risk infants to prevent allergy: randomized controlled trial. *Pediatrics.* 2012;130:674–82.
35. Gruber C, van Stuijvenberg M, Mosca F, Moro G, Chirico G, Bissegger CP, Biedler J, Boehm G, Wahn U. Reduced occurrence of early atopic dermatitis because of immunoreactive prebiotics among low-atopy-risk infants. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126:791–7.
36. Moyad MA, Robinson LE, Kitelsrud JM, Reeves SG, Weaver SE, Guzman AI, Bubak ME. Immunogenic yeast-based fermentation product reduces allergic rhinitis-induced nasal congestion: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Adv Ther.* 2009;26:795–804.
37. Yamada J, Hamuro J, Hatanaka H, Hamabata K, Kinoshita S. Alleviation of seasonal allergic symptoms with superfine beta-1,3-glucan: a randomized study. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119:1119–26.
38. Nagakura T, Matsuda S, Shichijo K, Sugimoto H, Hata K. Dietary supplementation with fish oil rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in children with bronchial asthma. *Eur Respir J.* 2000;16:861–5.
39. Sarinho E, Medeiros D, Schor D, Rego Silva A, Sales V, Motta ME, et al. Production of interleukin-10 in asthmatic children after Beta-1-3-glucan. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2009;37:188–92.
40. Bener A, Elhaye MS, Bener HZ, Hamid Q. The impact of vitamin D deficiency on asthma, allergic rhinitis and wheezing in children: an emerging public health problem. *J Family Community Med.* 2014;21:154–61.
41. van den Elsen L, Garsen J, Willemssen L. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of allergic and cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2012;18:2375–92.
42. Sehan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:349–61.
43. Frei R, Akdis M, O'Mahony L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015;31:153–8.
44. Kawashima S, Hirose K, Iwata A, Takahashi K, Ohkubo A, Tamachi T, Ikeda K, Kagami S, Nakajima H. beta-glucan curdlan induces IL-10-producing CD4+ T cells and inhibits allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2012;189:5713–21.
45. Wang SB, Deng YQ, Ren J, Xiao BK, Liu Z, Tao ZZ. Exogenous interleukin-10 alleviates allergic inflammation but inhibits local interleukin-10 expression in a mouse allergic rhinitis model. *BMC Immunol.* 2014;15:9.
46. Gehring U, Heinrich J, Hoek G, Giovannangelo M, Nordling E, Belander T, Gerritsen J, de Jongste JC, Smit HA, Wichmann HE, et al. Bacteria and mould components in house dust and children's allergic sensitisation. *Eur Respir J.* 2007;29:1144–53.
47. Lai CK, Beasley R, Crane J, Foliaki S, Shah J, Weland S. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax.* 2009;64:476–83.
48. Barreto ML, R-SR, Malta DC, Oliveira-Campos M, Andreazzi MA, Cruz AA. Prevalence of asthma symptoms among adolescents in Brazil: National Adolescent School-based Health Survey (PeNSE 2012). *Rev Bras Epidemiol Suppl PeNSE.* 2014;17(1):106–15. SUPPL. PeNSE.
49. Lander RL, Lander AG, Houghton L, Williams SM, Costa-Ribeiro H, Barreto DL, Mattos AP, Gibson RS. Factors influencing growth and intestinal parasitic infections in preschoolers attending philanthropic daycare centers in Salvador, Northeast Region of Brazil. *Cad Saude Publica.* 2012;28:2177–88.
50. Muniz PT, Ferreira MJ, Ferreira CS, Conde WL, Monteiro CA. Intestinal parasitic infections in young children in Sao Paulo, Brazil: prevalences, temporal trends and associations with physical growth. *Anni Trop Med Parasitol.* 2002;96:503–12.
51. Berido MH, Ferreira MJ, Cardoso MR, Konno SC, Monteiro CA. Wheezing conditions in early childhood: prevalence and risk factors in the city of Sao Paulo, Brazil. *Bull World Health Organ.* 2004;62:516–22.
52. Hagel I, Puccio F, Lopez E, Lugo D, Gabriela M, Di Priso MC. Intestinal parasitic infections and atopic dermatitis among Venezuelan Warao Amerindian pre-school children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2014;25:276–82.
53. Alpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002;78:455–9.
54. Hannula J, Saarela M, Jousimies-Somer H, Takala A, Syytjanen R, Kononen E, Askainen S. Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. *Oral Microbiol Immunol.* 1999;14:176–82.
55. Bedicovsky I, Ben-Aryeh H, Stargel R, Gutman D. Oral Candida in children. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984;57:37–40.
56. Ribeiro TC, Costa-Ribeiro Jr H, Almeida PS, Pontes MV, Leite ME, Filadelfo LR, Khoury JC, Bean JA, Mitmesser SH, Vanderhoof JA, Scalabrini DM. Stool pattern changes in toddlers consuming a follow-on formula supplemented with polydextrose and galactooligosaccharides. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54:288–90.
57. Bongers ME, de Lorijn F, Reitsma JB, Groeneweg M, Taminiou JA, Beninga MA. The clinical effect of a new infant formula in term infants with constipation: a double-blind, randomized cross-over trial. *Nutr J.* 2007;6:8.
58. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Garza C, Yang H. Comparison of the World Health Organization (WHO) child growth standards and the national center for health statistics/WHO international growth reference: implications for child health programmes. *Public Health Nutr.* 2006;9:942–7.
59. Ghisolfi J, Fantino M, Turck D, de Courcy GP, Vidalhet M. Nutrient intakes of children aged 1–2 years as a function of milk consumption, cows' milk or growing-up milk. *Public Health Nutr.* 2013;16:524–34.
60. Walton J, Flynn A. Nutritional adequacy of diets containing growing up milks or unfortified cow's milk in Irish children (aged 12–24 months). *Food Nutr Res.* 2013;57:21836.
61. More S, Shivkumar VB, Gangane N, Shende S. Effects of iron deficiency on cognitive function in school going adolescent females in rural area of central India. *Anemia.* 2013;2013:819136.
62. Shay DK, Mangian HF. Neurobiology of zinc-influenced eating behavior. *J Nutr.* 2000;130:1493S–9S.
63. Monteiro CA, SS, Mondini L. Secular trends in child anemia in S. Paulo city, Brazil (1984–1996). *Rev Saude Publica.* 2000;34(6):62–72.
64. de Novoa Oliveira M, Martorell R, Nguyen P. Risk factors associated with hemoglobin levels and nutritional status among Brazilian children attending daycare centers in Sao Paulo City, Brazil. *Arch Latinoam Nutr.* 2010;60:23–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



## 6 DISCUSSÃO

Os resultados deste ensaio clínico controlado, duplo cego e randomizado mostram que consumo de um composto lácteo acrescido de componentes com potencial imunomodulador (DHA, uma mistura de prebióticos GOS/PDX e BG de levedura) por crianças de 1 a 4 anos, durante 28 semanas, resultou em redução do risco de ocorrência de manifestações clínicas alérgicas. Esse foi o primeiro estudo a mostrar o efeito protetor desses três componentes bioativos juntos sobre a incidência de alergias em pré-escolares. Não foi identificado nenhum impacto do consumo do CL sobre a ocorrência de infecções respiratórias e doença diarreica.

Doenças alérgicas são prevalentes e representam um importante problema de saúde em crescimento tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento<sup>25</sup>. O Brasil é um dos países com maior prevalência de doenças alérgicas, na América Latina e no mundo, sendo as taxas mais elevadas observadas nas regiões Norte e Nordeste<sup>32</sup>. A incidência de manifestações alérgicas na população geral deste ensaio clínico foi de 40%, sendo que quase metade destas crianças (45%) apresentou 2 ou mais episódios alérgicos no período do estudo. Segundo o Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância (ISAAC) fase 3<sup>33</sup>, a prevalência de sintomas alérgicos em crianças de 6 a 7 anos de idade em Salvador foi de 17,2% para asma ativa, 39,8% para rinite alérgica, 17,4% para rinoconjuntivite e 8,6% para eczema.

Há evidências crescentes que AGPICLs, prebióticos e BG de levedura podem, através de diferentes mecanismos, modular a resposta imunológica de forma a reduzir o risco de doenças alérgicas. Prebióticos influenciam o sistema imune diretamente ou indiretamente, como um resultado da fermentação intestinal e promoção do crescimento de certas bactérias da microbiota, com consequente aumento da resposta Th1 e inibição da diferenciação da resposta Th2<sup>296</sup>. Além disso, os AGCC resultantes da fermentação dos prebióticos, principalmente o butirato, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12) e óxido nítrico e aumentam a liberação de IL-10 por macrófagos<sup>157</sup>. Os AGPICLs são funcionalmente os mais importantes AG para as células imunes, sendo incorporados em fosfolipídios de todas as membranas celulares, onde asseguram o ambiente

adequado para a função de proteína de membrana, mantém a fluidez da membrana, regulam a sinalização celular, expressão de genes e função celular, além de servir de substrato para a síntese de mediadores lipídicos<sup>222</sup>. O DHA atua inibindo a síntese de mediadores pró-inflamatórios e IgE, através da inativação do NF-κB<sup>234</sup>, e atuam como precursores de moléculas bioativas chamadas resolvinas, maresinas e protectinas, que possuem atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras<sup>232</sup>. Os BG de leveduras são imunomoduladores potentes, com efeitos sobre a imunidade inata e adaptativa, que também induzem à mecanismos anti-alérgicos através do estímulo à produção de citocinas anti-inflamatórias por linfócitos T CD4, levando à supressão das reações imunológicas alérgicas, restaurando assim o equilíbrio Th1/Th2<sup>282</sup>.

Diversos estudos têm mostrado o efeito protetor dos prebióticos<sup>138,180,206,210,297</sup>, AGPCL<sup>243-245,248,298,299</sup> e BG<sup>282,283,285-287</sup> na ocorrência de manifestações alérgicas, em adultos e crianças, entretanto na maioria destes estudos tais ingredientes foram testados de forma isolada. Prebióticos foram associados à redução da incidência de dermatite atópica<sup>180,297</sup>, eczema<sup>138</sup>, rinoconjuntivite alérgica<sup>210</sup> e urticária alérgica<sup>210</sup>. Arslanoglu et al<sup>210</sup> observaram manutenção da proteção de prebióticos para dermatite atópica e rinoconjuntivite alérgica além do período de intervenção, até os 5 anos de idade. Igualmente, AGPCL foram associados a menos casos de dermatite atópica e broncoespasmo<sup>245,298</sup> e à melhora dos sintomas em crianças asmáticas<sup>299</sup>. A administração de BG foi associada à redução da congestão nasal e rinorréia em adultos com rinite alérgica<sup>286</sup>, à redução dos sintomas alérgicos gerais e severidade dos mesmos<sup>285</sup> e aliviou os sintomas alérgicos sazonais, como rinorréia, espirros, congestão nasal e prurido e lacrimejamento ocular<sup>287</sup>.

Estudo realizado na China, com o mesmo CL testado nesse ensaio clínico, foi o primeiro a avaliar o efeito do DHA, prebióticos e BG juntos sobre a ocorrência de infecções e manifestações alérgicas em crianças<sup>300</sup>, entretanto com resultado diferente de nossa coorte brasileira, mostrando efeito protetor do CL na ocorrência de infecções respiratórias. As crianças chinesas alimentadas com a fórmula teste apresentaram menos episódios e menor duração de infecções respiratórias agudas, além de terem necessitado menos de tratamento com antibiótico sistêmico.

Apesar de não ter sido evidenciado nenhum efeito do CL teste sobre a ocorrência de infecções respiratórias em nosso estudo, a incidência de IRA foi bastante alta, uma vez que 80% da população estudada apresentou pelo menos um episódio ao longo das 28 semanas de intervenção. Além de elevada a incidência de IRA, houve uma grande repetição dos episódios (30% das crianças que apresentaram IRA tiveram 3 ou mais infecções no período). Estudos sugerem que frequentar uma creche é um importante fator de risco para infecções respiratórias<sup>20</sup> e que crianças na pré-escola e em creches apresentam uma alta frequência de IRA devido ao contato diário com outras crianças<sup>21</sup>.

Quanto à necessidade de uso de antibiótico sistêmico, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo observado que 50% das crianças de cada grupo fez uso no mínimo uma vez ao longo do estudo ( $p= 1,0$ ).

Ao compararmos a incidência de infecções respiratórias nos 2 estudos (Brasil e China), observa-se menos episódios na coorte chinesa, que apresentou incidência de 47% comparados aos 80% no Brasil. A maior incidência de IRA no nosso estudo brasileiro pode ser decorrente da menor idade das crianças avaliadas (1 a 4 anos no Brasil e 3 a 4 anos na China), o que as torna mais susceptível às infecções, pela imaturidade imunológica própria da idade<sup>38</sup>. Outro fator de risco de destaque para as IRAs é a condição sócioeconômica da população estudada, que foi inferior na nossa coorte.

Quanto ao efeito do CL teste sobre a ocorrência de doença diarréica, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum dos estudos. Vale ressaltar que a incidência de diarreia na coorte brasileira foi de apenas 12% (29 casos) e que na coorte chinesa não foi registrado nenhum episódio de diarreia, o que confirma a tendência mundial de redução da infecção gastrointestinal na população pediátrica.

Embora o CL teste tenha apresentado efeito de proteção na ocorrência de manifestações alérgicas em nosso estudo, não foi evidenciado qualquer impacto sobre os marcadores imunológicos dosados nas fezes e no soro, diferentemente do observado na coorte chinesa, na qual o consumo do CL com DHA, prebióticos e BG



resultou em níveis significativamente mais elevados da citocina anti-inflamatória IL-10, além de elevação da contagem de leucócitos no fim do estudo, sugerindo um mecanismo anti-inflamatório e/ou um aumento das células imunes efetoras. O estudo da China foi o primeiro a mostrar um potencial impacto da ingestão oral de BG de levedura sobre marcadores imunológicos em crianças saudáveis.

Os produtos de nosso estudo (teste e controle) foram igualmente aceitos, o que mostra que o CL teste foi aprovado quanto à sua palatabilidade, mesmo com todas as modificações realizadas na composição de nutrientes através da adição de oligossacarídeos, polissacarídeos e ácidos graxos, além de vitaminas e minerais.

Análise parasitológica da população estudada identificou prevalência de helmintos e protozoários intestinais de aproximadamente 45% ao final do estudo, sendo esta superior à de um estudo realizado em pré-escolares de creches em Salvador, que encontrou parasitose em 30% dos avaliados<sup>301</sup>. O protozoário *Giardia duodenalis* foi o mais frequente, responsável por 65% das infecções parasitárias (valor muito acima dos 12,9% identificados em estudo anterior<sup>301</sup>), seguido pelo *Blastocystis hominis* (11%). Quanto à prevalência combinada dos helmintos *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*, normalmente os mais frequentes na população, foi responsável por apenas 5,6% das parasitoses de nosso estudo, semelhante à de 5,4% relatada em crianças que frequentam creches em Salvador<sup>301</sup>.

Formatado: Não Realce

Formatado: Não Realce

Formatado: Não Realce

A prevalência elevada de parasitose em nosso estudo pode ser a responsável pela alta incidência de manifestações alérgicas ocorrida, de acordo com estudos que mostram que infecção parasitária pode ser um fator de risco para alergia<sup>302,303</sup>. Segundo Alcantara-Neves<sup>302</sup>, infecções por helmintos estão forte e positivamente associadas à eosinofilia, aumento de IgE total e a uma resposta imune do tipo Th2 e em outro estudo realizado em pré-escolares venezuelanos<sup>303</sup>, a inflamação intestinal causada por *G. duodenalis* mostrou favorecer a reatividade alérgica alimentar e contribuir para manifestações de dermatite atópica.

Formatado: Não Realce

No presente estudo, as crianças que receberam o CL teste apresentaram fezes mais macias nos primeiros 3 meses de intervenção em comparação ao grupo controle, sem qualquer impacto sobre a frequência de dejeções. Há evidências de que a

adição de prebióticos em fórmulas infantis torna a consistência das fezes e a frequência de evacuações mais próximas às de lactentes amamentados<sup>134</sup>. Diversos ensaios clínicos controlados e randomizados<sup>128,146,175,184,191,304</sup>, avaliando o efeito de diferentes tipos de prebióticos (GOS<sup>128,191</sup>, GOS e FOS<sup>146</sup>, inulina<sup>304</sup>, GOS e PDX<sup>175,184</sup>), em doses variadas (de 4 a 8g/L), mostraram que lactentes alimentados com fórmulas suplementadas com prebióticos apresentaram fezes mais amolecidas e mais frequentes em comparação ao grupo sem suplementação de prebiótico. Similarmente ao nosso estudo, ensaio clínico com suplementação de GOS e FOS ou FOS e oligofrutose (4 ou 8g/L) mostrou efeito apenas na consistência das fezes, com frequência de evacuações menor no grupo alimentado com fórmula (com ou sem prebiótico), em comparação ao grupo amamentado.

Além de avaliar o efeito dos prebióticos sobre a frequência e consistência das fezes nos grupos estudados, houve também avaliação, em uma análise *post hoc*, do seu efeito sobre a constipação intestinal. Na população geral deste estudo, 12,5% (32/256) das crianças preencheram os critérios de constipação estabelecidos no protocolo, sendo que 75% dos casos (24/32) pertenciam ao subgrupo de 25–48 meses (teste: 14/78, 18%; controle: 10/80, 10,5%), estando os casos um pouco mais concentrados no grupo teste (58,3%). Após 28 semanas de estudo, houve uma redução dos casos de constipação em ambos os grupos teste e controle desse subgrupo, entretanto sem diferença significativa do ponto de vista estatístico ( $p = 0,27$ ). Os sujeitos menores de 2 anos, além de terem apresentado apenas 25% (8/32) dos casos de constipação, todos se concentraram no grupo controle, o que impossibilitou a avaliação do efeito do prebiótico sobre a constipação nessa faixa de idade.

A constipação funcional é uma desordem comum, principalmente na população pediátrica, que apresenta prevalências elevadas em todo o mundo (0,7% – 29%), tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento<sup>305</sup>. Segundo pesquisas, a prevalência mundial de constipação infantil está aumentando e ameaçando tornar-se um grande problema de saúde pública<sup>305</sup>. Dois estudos realizados no Brasil revelaram prevalências preocupantemente altas de mais de 20% em crianças de 1 a 10 anos<sup>306,307</sup>. Vale ressaltar que as repercussões possíveis desta doença são alarmantes. Embora não esteja diretamente relacionada com a mortalidade, a

constipação compromete bastante a qualidade de vida do indivíduo, podendo resultar em deficiências na educação<sup>308</sup>. Apesar de alguns estudos apontarem o efeito dos prebióticos sobre o ritmo intestinal, até o momento não há evidência para o seu uso na constipação infantil<sup>168</sup>.

Acredita-se que a menor incidência de constipação no início do estudo encontrada no subgrupo de 12-24 meses seja decorrente da amamentação, uma vez que 47% (46/98) das crianças dessa faixa etária ainda mamavam, enquanto apenas 16% (26/158) entre maiores de 24 meses, levando-se em consideração que o leite materno é uma fonte importante de oligossacarídeos não digeríveis de alta complexidade e em quantidade satisfatória<sup>104</sup>.

A prevalência de amamentação na população estudada, no *baseline*, foi de quase 30% (72/256), estando 68% (49/72) dos amamentados na faixa etária de 12-24m. De acordo com a II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal, do Ministério da Saúde<sup>309</sup>, a mediana de aleitamento materno em crianças de Salvador foi de 351 dias (IIQ: 322-391 dias), mostrando que mesmos frequentando creches, o que seria um fator de risco para o desmame, 1/3 das crianças estudadas ainda mamavam no início do primeiro ano de vida.

As crianças deste estudo apresentaram crescimento pômbero-estatural adequado no período da intervenção e não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, confirmando a segurança do CL teste na garantia do ganho de peso e estatura, estando de acordo com estudos diversos avaliando o crescimento de crianças alimentadas com fórmulas contendo DHA, prebióticos e/ou  $\beta$ -glucano de forma isolada<sup>146,182,184</sup> ou associada<sup>300,310</sup>. Nenhuma criança estava desnutrida no *baseline*, segundo os critérios da OMS<sup>311</sup>, sendo identificados 95% de eutrofia, 3% de sobrepeso e 2% de obesidade na população estudada. A comparação entre as PNDSs de 1996 e 2006 evidenciou redução importante no risco de desnutrição infantil no Brasil, em particular na região Nordeste e nos estratos de menor poder aquisitivo<sup>45</sup>. Segundo a PNDS de 2006<sup>45</sup>, observa-se elevação da prevalência do excesso de peso, com taxas variando entre 5% e 7% na maioria dos estratos estudados, estando nossos dados de acordo com a estatística de referência. Importante destacar que as 02 creches estudadas contavam com a

assistência de nutricionistas que eram responsáveis pela avaliação antropométrica das crianças, assim como pelas adequações de cardápios, visando assegurar o aporte adequado de macro e micronutrientes.

Não houve diferença entre os grupos quanto aos níveis de zinco e ferro no início e ao final do estudo, com uma incidência de anemia na população geral de 18 e 13%, no início e ao final do estudo, respectivamente. A prevalência relatada de anemia no Brasil atingiu 47% nas crianças menores de cinco anos de idade, afetando todos os níveis de renda, mas sendo superior nos com uma renda menor<sup>312</sup>. Os participantes do nosso estudo passaram todos os dias da semana na creche, recebendo um alto padrão de cuidados alimentares, o que provavelmente contribuiu para a baixa incidência de anemia. Os nossos resultados são consistentes com os dados que mostram uma associação positiva entre frequência à creche e o nível de hemoglobina<sup>313</sup>, o que indica a frequência à creche como uma proteção contra a anemia.

Ao longo das 28 semanas de intervenção ocorreram 99 tipos de eventos adversos, sendo a diferença estatisticamente significativa entre os grupos apenas para candidíase oral ( $p=0,03$ ). A *Candida albicans* está presente na flora comensal normal de indivíduos saudáveis, sendo relatadas altas taxas de colonização em crianças saudáveis: 12,5% em crianças com dois anos de idade<sup>314</sup> e 45% em crianças de três a cinco anos de idade<sup>315</sup>. Entretanto, uma variedade de fatores sistêmicos e locais pode deprimir o sistema imunológico do indivíduo, aumentando sua susceptibilidade para o crescimento excessivo desse fungo na mucosa oral, originando assim a candidíase oral<sup>316</sup>. Apesar da diferença significativa entre os grupos, a incidência de candidíase na população geral do estudo foi de apenas 2% (5 casos), sendo que uma das crianças teve varicela e uma tinha recebido um ciclo recente de antibiótico, ambos potenciais fatores de risco para a candidíase oral<sup>317</sup>. A incidência desse evento em nosso estudo foi semelhante ao encontrado em ensaio clínico anterior realizado em uma das creches (2,4%)<sup>175</sup>, o que sugere que a candidíase oral não é incomum na população de crianças de creche. A semelhança entre os grupos quanto à ocorrência da quase totalidade de eventos adversos reforça que a fórmula contendo DHA, prebióticos e BG de levedura é segura para consumo por crianças de 1 a 4 anos, além de bem tolerada.

Importante enfatizar que o ensaio clínico em questão foi realizado com base nas Boas Práticas em Pesquisa Clínica (BPC), que foram rigorosamente seguidas para garantir não apenas resultados fidedignos e de real impacto clínico, mas também a segurança e integridade dos voluntários da pesquisa. A randomização aleatória dos sujeitos elegíveis foi capaz de garantir a homogeneidade entre os grupos teste e controle, que pode ser confirmado pela análise dos dados demográficos no início do estudo (semelhança entre os grupos quanto à raça, idade, distribuição por sexo e indicador P/A). As taxas de perda de seguimento foram baixas em ambos os grupos (1,5% no grupo controle e 4% no grupo teste), e nenhuma perda foi decorrente de evento adverso ou intolerância ao produto testado, o que reforça a segurança do CL e a boa condução da pesquisa clínica.

O estudo foi conduzido por equipe devidamente capacitada. Os desfechos principais (IRA, doença diarréica e manifestações alérgicas), bem como os eventos adversos, foram diagnosticados por pediatras experientes em ensaios clínicos desta natureza, sendo este um dos pontos fortes desse estudo. Esses pediatras foram responsáveis pela avaliação e acompanhamento criterioso de todas as queixas clínicas relatadas, seja pelos pais/responsáveis das crianças ou pelos cuidadores. Foram registrados 12 eventos adversos graves ao longo do estudo (10 no grupo controle e 02 no grupo teste), porém nenhum foi associado ao consumo do CL em questão.

Uma equipe grande e preparada de nutrição, composta por nutricionistas e estagiários, se responsabilizou pelo preparo adequado da fórmula na diluição padrão, assim como pela garantia de oferta do produto certo para cada criança, ao longo dos 6 meses de estudo, pontos cruciais para assegurar o sucesso da intervenção.

Entretanto, um ponto negativo deste estudo foi associado à diferente composição de vitaminas e minerais das fórmulas comparadas. Idealmente, os produtos deveriam ser idênticos quanto aos micronutrientes, diferindo apenas nos componentes bioativos imunomoduladores avaliados (DHA, prebióticos e BG). Isso permitiria atribuir o efeito protetor encontrado sobre a ocorrência de manifestações alérgicas exclusivamente aos componentes testados, considerando que os micronutrientes podem ter potencializado o efeito do produto na modulação do sistema imune. Não

podemos assim descartar uma potencial contribuição dos micronutrientes nos efeitos encontrados, apesar de sabermos tratar-se de população que consome alimentos adequados e supervisionados para as quantidades de macro e micronutrientes. Revisões sistemáticas e metanálises mostram potencial benefício do uso da vitamina D na asma<sup>318,319</sup>. É sabido que a vitamina D inibe a expressão de IgE em células B e favorece a síntese de IL-10, a qual inibe o perfil Th2, protegendo contra condições alérgicas<sup>320</sup>. Importante enfatizar que, apesar das diferenças em micronutrientes entre os produtos do estudo, a fórmula controle apresentava composição de nutrientes de acordo com as exigências do *Codex Alimentarius*.

## 7 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo mostram que crianças de 1 a 4 anos alimentadas por 28 semanas com um composto lácteo suplementado com prebióticos (PDX e GOS), DHA e BG de levedura apresentaram menos episódios de manifestações alérgicas em comparação à crianças que consumiram a fórmula controle sem a suplementação. Nenhum efeito sobre infecções respiratórias agudas ou doença diarréica foi evidenciado.

Quanto aos desfechos secundários, não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quanto ao crescimento, ingestão dos produtos teste e controle e ocorrência de eventos adversos, sendo o CL teste, portanto, seguro para uso em crianças nessa faixa etária.

Apesar do efeito protetor do CL sobre a ocorrência de manifestações alérgicas, não houve qualquer impacto sobre os marcadores imunológicos dosados nas fezes e no soro, assim como na contagem de células periféricas das séries branca e vermelha. Os grupos também foram semelhantes nas dosagens séricas de ferritina e zinco ao final do período de intervenção.

Diante do possível efeito potencializador dos micronutrientes na resposta imune, sugere-se a realização de novos estudos, em populações diferentes, para reafirmar os achados de nossa coorte e da coorte chinesa, que evidenciaram efeito protetor do CL na ocorrência de manifestações alérgicas e infecções respiratórias, respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

~~Em um ensaio clínico bem desenhado, duplo-cego, controlado e randomizado, envolvendo 767 crianças saudáveis com idade entre 11 e 29 meses, Chatchatee et al.<sup>200</sup> mostrou pela primeira vez um risco reduzido de infecções após o consumo de uma fórmula de seguimento suplementada com probióticos GOS/FOS e DHA. Entretanto, a redução de risco não teve relevância clínica, pois foi de apenas 6% no grupo teste, o que justifica a realização de novos estudos para confirmação destes achados.~~

Formatado: Não Realce

1. Liu L, Oza S, Hogan D, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet* 2015;385:430-40.
2. Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, et al. Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2008;46:815-23.
3. Pinto KDBPC, Maggi RRS, Alves JGB. Análise de risco socio-ambiental para comprometimento pleural na pneumonia grave em crianças menores de 5 anos. *Ver Panam Salud Publica* 2004;15(2):104-9.
4. UNICEF. Situação mundial da infância 2008. 2008:164.
5. Cardoso AM. A persistencia das infeccoes respiratórias agudas como problema de saude publica. *Cad Saude Publica* 2010;26(7):1270.
6. (UNICEF) UNICsEF, (WHO) WHO. Diarrhea: why children are still dying and what can be done. 2009.
7. Mendes PSA, Ribeiro Júnior HC, Mendes CMC. Tendência temporal da mortalidade geral e morbidade hospitalar por doença diarreica em crianças brasileiras menores de cinco anos no período de 2000 a 2010. *Jornal de pediatria* 2013;89(3):315-25.
8. Organization WH. Diarrhoeal disease. Fact sheet nº 330 2009.
9. Kronemberger DMP, Clevelário Júnior J. Análise dos impactos na saúde e no Sistema Único de Saúde decorrente de agravos relacionados ao esgotamento sanitário inadequado nos municípios brasileiros com mais de 300.000 habitantes. 2010.
10. (WGO) WGO. Guia Prático da Organização Mundial de Gastroenterologia. Diarréia Aguda. 2008.
11. Saúde. MdSBSdVeSDdAdSd. Análise da situação das doenças transmissíveis no Brasil no período de 2000 a 2010. 2012:46-92.
12. Hospitalar. BSd. Morbidade Hospitalar do SUS – por local de residência – Brasil. Departamento de Informática do SUS (DATASUS) 2011.
13. UNICEF. The State of the World's Children. Table 1: Basic Indicators. 2009.
14. Saúde Md. Mortalidade infantil e fetal. Sistema de Informação sobre Mortalidade 2016:<http://svs.aids.gov.br/dashboard/mortalidade/infantil.show.mtw>.
15. Snyder JD, Merson MH. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bulletin of the World Health Organization* 1982;60:605-13.
16. Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bulletin of the World Health Organization* 1992;70:705-14.
17. You D, Hug L, Ejdemyr S, et al. Global, regional, and national levels and trends in under-5 mortality between 1990 and 2015, with scenario-based projections to 2030: a systematic analysis by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. *Lancet* 2015;386:2275-86.
18. Rodrigues FE, Tatto RB, Vauchinski L, et al. Pneumonia mortality in Brazilian children aged 4 years and younger. *Jornal de pediatria* 2011;87:111-4.
19. Nesti MM, Goldbaum M. Infectious diseases and daycare and preschool education. *Jornal de pediatria* 2007;83:299-312.
20. Kamper-Jorgensen M, Wohlfahrt J, Simonsen J, Gronbaek M, Benn CS. Population-based study of the impact of childcare attendance on hospitalizations for acute respiratory infections. *Pediatrics* 2006;118:1439-46.



21. Lu N, Samuels ME, Shi L, Baker SL, Glover SH, Sanders JM. Child day care risks of common infectious diseases revisited. *Child: care, health and development* 2004;30:361-8.
22. Nylund L, Satokari R, Nikkila J, et al. Microarray analysis reveals marked intestinal microbiota aberrancy in infants having eczema compared to healthy children in at-risk for atopic disease. *BMC microbiology* 2013;13:12.
23. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006;368:733-43.
24. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *The European respiratory journal* 2008;31:143-78.
25. Ebert CS, Jr., Pillsbury HC, 3rd. Epidemiology of allergy. *Otolaryngologic clinics of North America* 2011;44:537-48, vii.
26. Walker WA. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Annals of nutrition & metabolism* 2013;63 Suppl 2:8-15.
27. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000;55 Suppl 1:S2-10.
28. Illi S, von Mutius E, Lau S, et al. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *Bmj* 2001;322:390-5.
29. Bloomfield SF, Rook GA, Scott EA, Shanahan F, Stanwell-Smith R, Turner P. Time to abandon the hygiene hypothesis: new perspectives on allergic disease, the human microbiome, infectious disease prevention and the role of targeted hygiene. *Perspectives in public health* 2016;136:213-24.
30. Rantala AK, Jaakkola MS, Makikyro EM, Hugg TT, Jaakkola JJ. Early Respiratory Infections and the Development of Asthma in the First 27 Years of Life. *American journal of epidemiology* 2015;182:615-23.
31. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Global Initiative for Asthma P. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004;59:469-78.
32. Solé D MK, Camelo-Nunes IC, Freitas LS, Britto M, Rosário NA, et al. Changes in the prevalence of asthma and allergic diseases among brazilian schoolchildren (13-14 years old): comparison between ISAAC phases one and three. *Journal of tropical pediatrics* 2007;53:13-21.
33. Solé D WG, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK; ISAAC - Grupo Brasileiro. . Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase 3. *J Pediatr (Rio J)* 2006;82:341-6.
34. Sole D, Camelo-Nunes IC, Wandalsen GF, Mallozi MC. Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Revista paulista de pediatria : orgao oficial da Sociedade de Pediatria de Sao Paulo* 2014;32:114-25.
35. Meltzer EO, Bukstein DA. The economic impact of allergic rhinitis and current guidelines for treatment. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2011;106:S12-6.
36. Black RE, Victora CG, Walker SP, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet* 2013;382:427-51.
37. Rytter MJ, Kolte L, Briend A, Friis H, Christensen VB. The immune system in children with malnutrition--a systematic review. *PloS one* 2014;9:e105017.
38. Lima DB, Fujimori E, Borges AL, Silva MM. Feeding in the two first years of life. *Revista da Escola de Enfermagem da U S P* 2011;45 Spec No 2:1705-9.
39. Bueno AL CM. Micronutrientes envolvidos no crescimento. *Rev HCPA* 2007;27:47-56.
40. Batista Filho M, Rissin A. [Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends]. *Cad Saude Publica* 2003;19 Suppl 1:S181-91.
41. Monteiro CA, Benicio MH, Konno SC, Silva AC, Lima AL, Conde WL. Causes for the decline in child under-nutrition in Brazil, 1996-2007. *Revista de saude publica* 2009;43:35-43.
42. Jardim-Botelho A, Queiroz Gurgel R, Simeone Henriques G, et al. Micronutrient deficiencies in normal and overweight infants in a low socio-economic population in north-east Brazil. *Paediatrics and international child health* 2016;36:198-202.
43. Shamah T, Villalpando S. The role of enriched foods in infant and child nutrition. *The British journal of nutrition* 2006;96 Suppl 1:S73-7.
44. FAO IaW. The State of Food Insecurity in the World 2015. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress Rome, FAO 2015.
45. Ministry of Health B. National Survey on Demography and Health of Women and Children – PNDS, 2006. Dimensions of Reproduction and Child Health. Brasília DF 2009:213–64.

46. Goulart RMM BM, Taddei JAAC. Uma revisão das ações de nutrição e do papel do nutricionista em creches. *Rev Nutr* 2010;23:655-65.
47. Bueno MB, Fisberg RM, Maximino P, Rodrigues Gde P, Fisberg M. Nutritional risk among Brazilian children 2 to 6 years old: a multicenter study. *Nutrition* 2013;29:405-10.
48. Smithers LG, Golley RK, Brazionis L, Lynch JW. Characterizing whole diets of young children from developed countries and the association between diet and health: a systematic review. *Nutrition reviews* 2011;69:449-67.
49. Bernardi JR, Gama CM, Vitolo MR. [An infant feeding update program at healthcare centers and its impact on breastfeeding and morbidity]. *Cad Saude Publica* 2011;27:1213-22.
50. Cunningham-Rundles S, Ahrn S, Abuav-Nussbaum R, Dnistrian A. Development of immunocompetence: role of micronutrients and microorganisms. *Nutrition reviews* 2002;60:S68-72.
51. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. *Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. Free radical research* 1996;25:57-74.
52. Jimenez-Chillaron JC, Diaz R, Martinez D, et al. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie* 2012;94:2242-63.
53. Prado MS, Strina A, Barreto ML, Oliveira-Assis AM, Paz LM, Cairncross S. Risk factors for infection with *Giardia duodenalis* in pre-school children in the city of Salvador, Brazil. *Epidemiology and infection* 2003;131:899-906.
54. Assis AM, Barreto ML, Gomes GS, et al. Childhood anemia prevalence and associated factors in Salvador, Bahia, Brazil. *Cad Saude Publica* 2004;20:1633-41.
55. Martins MC, Santos LM, Assis AM. [Prevalence of hypovitaminosis A among preschool children from northeastern Brazil, 1998]. *Revista de saude publica* 2004;38:537-42.
56. Carvalho CA, Fonseca PC, Priore SE, Franceschini Sdo C, Novaes JF. [Food consumption and nutritional adequacy in Brazilian children: a systematic review]. *Revista paulista de pediatria : orgao oficial da Sociedade de Pediatria de Sao Paulo* 2015;33:211-21.
57. Organization. WH. The optimal duration of exclusive breastfeeding - Report of an expert consultation. Geneva, Switzerland 2011.
58. Section on B. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012;129:e827-41.
59. *Pediatria. SBd. Manual de orientação para a alimentação do lactente, do pré-escolar, do escolar, do adolescente e na escola. Departamento de Nutrologia* 2012;3aEd. Rio de Janeiro,RJ:SBP.
60. Suthutvoravut U, Abiodun PO, Chomtho S, et al. Composition of Follow-Up Formula for Young Children Aged 12-36 Months: Recommendations of an International Expert Group Coordinated by the Nutrition Association of Thailand and the Early Nutrition Academy. *Annals of nutrition & metabolism* 2015;67:119-32.
61. WHO. Essential Nutrition Actions: Improving Maternal, Newborn, Infant and Young Child Health and Nutrition. Geneva 2013.
62. Oliveira AMOA PS, Prado MS, Barreto ML. . Alimentação complementar nos primeiros dois anos de vida. *Rev Nutr* 2005;18.
63. Przyrembel H, Agostoni C. Growing-up milk: a necessity or marketing? *World review of nutrition and dietetics* 2013;108:49-55.
64. Ghisolfi J, Fantino M, Turck D, de Courcy GP, Vidailhet M. Nutrient intakes of children aged 1-2 years as a function of milk consumption, cows' milk or growing-up milk. *Public health nutrition* 2013;16:524-34.
65. Walton J, Flynn A. Nutritional adequacy of diets containing growing up milks or unfortified cow's milk in Irish children (aged 12-24 months). *Food Nutr Res* 2013;57.
66. Crowe KM, Francis C, Academy of N, Dietetics. Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 2013;113:1096-103.
67. Comité de nutrition de la Société française de p. [Functional foods and pediatric nutrition]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Société française de pediatrie* 2001;8:573-6.
68. Prescott SL. Early Nutrition as a Major Determinant of 'Immune Health': Implications for Allergy, Obesity and Other Noncommunicable Diseases. *Nestle Nutrition Institute workshop series* 2016;85:1-17.
69. Lynch SV. Gut Microbiota and Allergic Disease. *New Insights. Annals of the American Thoracic Society* 2016;13 Suppl 1:S51-4.
70. Tojo R, Suarez A, Clemente MG, et al. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World journal of gastroenterology : WJG* 2014;20:15163-76.
71. Sjogren YM, Tomicic S, Lundberg A, et al. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2009;39:1842-51.

72. Martin R, Nauta AJ, Ben Amor K, Knippels LM, Knol J, Garssen J. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Beneficial microbes* 2010;1:367-82.
73. Biedermann L, Rogler G. The intestinal microbiota: its role in health and disease. *European journal of pediatrics* 2015;174:151-67.
74. Jeurink PV, van Esch BC, Rijniere A, Garssen J, Knippels LM. Mechanisms underlying immune effects of dietary oligosaccharides. *The American journal of clinical nutrition* 2013;98:572S-7S.
75. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-9.
76. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 1998;42:2-7.
77. Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American journal of clinical nutrition* 1999;69:1052S-7S.
78. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635-8.
79. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *The British journal of nutrition* 1998;80 Suppl 1:S147-71.
80. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature reviews Microbiology* 2013;11:227-38.
81. Buccigrossi V, Nicastro E, Guarino A. Functions of intestinal microflora in children. *Current opinion in gastroenterology* 2013;29:31-8.
82. Elson CO, Alexander KL. Host-microbiota interactions in the intestine. *Digestive diseases* 2015;33:131-6.
83. Chung H, Pamp SJ, Hill JA, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* 2012;149:1578-93.
84. Di Mauro A, Neu J, Riezzo G, et al. Gastrointestinal function development and microbiota. *Italian journal of pediatrics* 2013;39:15.
85. Mozetic RM SS, Ganen AP. The importance of nutrition in the first one thousand days. *Revista Eletrônica Acervo Saúde* 2016;Vol 8 (2):876-84.
86. Yuan Q, Walker WA. Innate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2004;38:463-73.
87. Rook GA. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2012;42:5-15.
88. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989;299:1259-60.
89. Bendiks M, Kopp MV. The relationship between advances in understanding the microbiome and the maturing hygiene hypothesis. *Current allergy and asthma reports* 2013;13:487-94.
90. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *The New England journal of medicine* 2011;364:701-9.
91. Pelucchi C, Galeone C, Bach JF, La Vecchia C, Chatenoud L. Pet exposure and risk of atopic dermatitis at the pediatric age: a meta-analysis of birth cohort studies. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013;132:616-22 e7.
92. Huang L, Chen Q, Zhao Y, Wang W, Fang F, Bao Y. Is elective cesarean section associated with a higher risk of asthma? A meta-analysis. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 2015;52:16-25.
93. Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001;108:516-20.
94. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* 2007;56:661-7.
95. Ouwehand AC, Isolauri E, He F, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001;108:144-5.
96. He F, Ouwehand AC, Isolauri E, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Comparison of mucosal adhesion and species identification of *bifidobacteria* isolated from healthy and allergic infants. *FEMS immunology and medical microbiology* 2001;30:43-7.
97. Sjogren YM, Jenmalm MC, Bottcher MF, Bjorksten B, Sverremark-Ekstrom E. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2009;39:518-26.
98. Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM, et al. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007;120:343-50.

99. Prokesova L, Lodinova-Zadnikova R, Zizka J, et al. Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2006;17:175-83.
100. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific reports* 2016;6:23129.
101. Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006;118:511-21.
102. Morelli L. Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *The Journal of nutrition* 2008;138:1791S-5S.
103. Knol J, Scholtens P, Kafka C, et al. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2005;40:36-42.
104. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early human development* 2015;91:629-35.
105. Narayan NR, Mendez-Lagares G, Ardeshir A, Lu D, Van Rompay KK, Hartigan-O'Connor DJ. Persistent effects of early infant diet and associated microbiota on the juvenile immune system. *Gut microbes* 2015;6:284-9.
106. Roger LC, Costabile A, Holland DT, Hoyles L, McCartney AL. Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology* 2010;156:3329-41.
107. Fan W, Huo G, Li X, et al. Diversity of the intestinal microbiota in different patterns of feeding infants by Illumina high-throughput sequencing. *World journal of microbiology & biotechnology* 2013;29:2365-72.
108. Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Aguilera M, et al. Three main factors define changes in fecal microbiota associated with feeding modality in infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2013;57:461-6.
109. Voreades N, Kozil A, Weir TL. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in microbiology* 2014;5:494.
110. Ismail AS, Hooper LV. Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2005;289:G779-84.
111. Yaron S, Shachar D, Abrams L, et al. Effect of high beta-palmitate content in infant formula on the intestinal microbiota of term infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2013;56:376-81.
112. Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Rodriguez JM, Boza J, Xaus J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *The British journal of nutrition* 2007;98 Suppl 1:S96-100.
113. Solis G, de Los Reyes-Gavilan CG, Fernandez N, Margolles A, Gueimonde M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* 2010;16:307-10.
114. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American journal of clinical nutrition* 2012;96:544-51.
115. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American journal of clinical nutrition* 1999;69:1035S-45S.
116. Martin R, Jimenez E, Heilig H, et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and environmental microbiology* 2009;75:965-9.
117. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012;486:222-7.
118. Jeffery IB, O'Toole PW. Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living. *Nutrients* 2013;5:234-52.
119. David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;505:559-63.
120. Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutrition reviews* 2015;73 Suppl 1:32-40.
121. Li M, Wang M, Donovan SM. Early development of the gut microbiome and immune-mediated childhood disorders. *Seminars in reproductive medicine* 2014;32:74-86.
122. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition* 1995;125:1401-12.

123. Priebe MG, Vonk RJ, Sun X, He T, Harmsen HJ, Welling GW. The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre- and probiotics. *European journal of nutrition* 2002;41 Suppl 1:12-10.
124. Manning TS, Gibson GR. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2004;18:287-98.
125. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *The British journal of nutrition* 2010;104 Suppl 2:S1-63.
126. Probert HM, Apajalahti JH, Rautonen N, Stowell J, Gibson GR. Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. *Applied and environmental microbiology* 2004;70:4505-11.
127. Jie Z, Bang-Yao L, Ming-Jie X, et al. Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. *The American journal of clinical nutrition* 2000;72:1503-9.
128. Giovannini M, Verduci E, Gregori D, et al. Prebiotic effect of an infant formula supplemented with galacto-oligosaccharides: randomized multicenter trial. *Journal of the American College of Nutrition* 2014;33:385-93.
129. do Carmo MM, Walker JC, Novello D, et al. Polydextrose: Physiological Function, and Effects on Health. *Nutrients* 2016;8.
130. Sherman PM, Cabana M, Gibson GR, et al. Potential roles and clinical utility of prebiotics in newborns, infants, and children: proceedings from a global prebiotic summit meeting, New York City, June 27-28, 2008. *The Journal of pediatrics* 2009;155:S61-70.
131. Barile D, Rastall RA. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Current opinion in biotechnology* 2013;24:214-9.
132. Gopal PK, Gill HS. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *The British journal of nutrition* 2000;84 Suppl 1:S69-74.
133. Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annual review of nutrition* 2000;20:699-722.
134. Vandenplas Y, Zakharova I, Dmitrieva Y. Oligosaccharides in infant formula: more evidence to validate the role of prebiotics. *The British journal of nutrition* 2015;113:1339-44.
135. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition* 2007;137:830S-7S.
136. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews* 2004;17:259-75.
137. Gibson GR. Understanding prebiotics in infant and childhood nutrition. *The journal of family health care* 2006;16:119-22.
138. Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, et al. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007;119:192-8.
139. Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, et al. Prebiotic oligosaccharides in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2004;39:465-73.
140. Salminen S, Endo A, Isolauri E, Scalabrin D. Early Gut Colonization with Lactobacilli and Staphylococcus in Infants: the Hygiene Hypothesis Extended. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2015.
141. Ben XM, Zhou XY, Zhao WH, et al. Supplementation of milk formula with galacto-oligosaccharides improves intestinal micro-flora and fermentation in term infants. *Chinese medical journal* 2004;117:927-31.
142. Boehm G, Lidestri M, Casetta P, et al. Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition* 2002;86:F178-81.
143. Kim SH, Lee da H, Meyer D. Supplementation of baby formula with native inulin has a prebiotic effect in formula-fed babies. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 2007;16:172-7.
144. Fanaro S, Marten B, Bagna R, et al. Galacto-oligosaccharides are bifidogenic and safe at weaning: a double-blind randomized multicenter study. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2009;48:82-8.
145. Moro GE, Arslanoglu S. Reproducing the bifidogenic effect of human milk in formula-fed infants: why and how? *Acta Paediatr Suppl* 2005;94:14-7.
146. Costalos C, Kapiki A, Apostolou M, Papatoma E. The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants. *Early human development* 2008;84:45-9.
147. Brunser O, Gotteland M, Cruchet S, Figueroa G, Garrido D, Steenhout P. Effect of a milk formula with prebiotics on the intestinal microbiota of infants after an antibiotic treatment. *Pediatric research* 2006;59:451-6.

148. Euler AR, Mitchell DK, Kline R, Pickering LK. Prebiotic effect of fructo-oligosaccharide supplemented term infant formula at two concentrations compared with unsupplemented formula and human milk. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2005;40:157-64.
149. Nakamura N, Gaskins HR, Collier CT, et al. Molecular ecological analysis of fecal bacterial populations from term infants fed formula supplemented with selected blends of prebiotics. *Applied and environmental microbiology* 2009;75:1121-8.
150. Magne F, Hachelaf W, Suau A, et al. A longitudinal study of infant faecal microbiota during weaning. *FEMS microbiology ecology* 2006;58:563-71.
151. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology* 2007;5:e177.
152. Rao S, Srinivasjois R, Patole S. Prebiotic supplementation in full-term neonates: a systematic review of randomized controlled trials. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 2009;163:755-64.
153. Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement* 1996;216:132-48.
154. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews* 2001;81:1031-64.
155. Holscher HD, Faust KL, Czerkies LA, et al. Effects of prebiotic-containing infant formula on gastrointestinal tolerance and fecal microbiota in a randomized controlled trial. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* 2012;36:95S-105S.
156. Stiverson J, Williams T, Chen J, et al. Prebiotic Oligosaccharides: Comparative Evaluation Using In Vitro Cultures of Infants' Fecal Microbiomes. *Applied and environmental microbiology* 2014;80:7388-97.
157. Park JS, Lee EJ, Lee JC, Kim WK, Kim HS. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways. *International immunopharmacology* 2007;7:70-7.
158. Vester Boler BM, Hernot DC, Boileau TW, et al. Carbohydrates blended with polydextrose lower gas production and short-chain fatty acid production in an in vitro system. *Nutrition research* 2009;29:631-9.
159. Quinlan PT, Lockton S, Irwin J, Lucas AL. The relationship between stool hardness and stool composition in breast- and formula-fed infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 1995;20:81-90.
160. Weaver LT, Ewing G, Taylor LC. The bowel habit of milk-fed infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 1988;7:568-71.
161. Cummings JH. Constipation, dietary fibre and the control of large bowel function. *Postgraduate medical journal* 1984;60:811-9.
162. Roberfroid M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical reviews in food science and nutrition* 1993;33:103-48.
163. Cherbut C. Motor effects of short-chain fatty acids and lactate in the gastrointestinal tract. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2003;62:95-9.
164. Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, et al. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *The British journal of nutrition* 1999;81:121-32.
165. Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American journal of clinical nutrition* 1999;69:1046S-51S.
166. Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki SI, Kuwahara A. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 2008;59 Suppl 2:251-62.
167. Yajima T. Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *The Journal of physiology* 1985;368:667-78.
168. Francavilla R, Cristofori F, Indrio F. Indications and Recommendations by Societies and Institutions for the Use of Probiotics and Prebiotics in Paediatric Functional Intestinal Disorders. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2016;63 Suppl 1:S36-7.
169. Scholtens PA, Goossens DA, Staiano A. Stool characteristics of infants receiving short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides: a review. *World journal of gastroenterology : WJG* 2014;20:13446-52.
170. Moro G, Minoli I, Mosca M, et al. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2002;34:291-5.

171. Veereman-Wauters G, Staelens S, Van de Broek H, et al. Physiological and bifidogenic effects of prebiotic supplements in infant formulae. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2011;52:763-71.
172. Bisceglia M, Indrio F, Riezzo G, Poerio V, Corapi U, Raimondi F. The effect of prebiotics in the management of neonatal hyperbilirubinaemia. *Acta paediatrica* 2009;98:1579-81.
173. Modi N, Uthaya S, Fell J, Kulinskaya E. A randomized, double-blind, controlled trial of the effect of prebiotic oligosaccharides on enteral tolerance in preterm infants (ISRCTN77444690). *Pediatric research* 2010;68:440-5.
174. Mihatsch WA, Hoegel J, Pohlandt F. Prebiotic oligosaccharides reduce stool viscosity and accelerate gastrointestinal transport in preterm infants. *Acta paediatrica* 2006;95:843-8.
175. Ribeiro TC, Costa-Ribeiro H, Jr., Almeida PS, et al. Stool pattern changes in toddlers consuming a follow-on formula supplemented with polydextrose and galactooligosaccharides. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2012;54:288-90.
176. Indrio F, Riezzo G, Raimondi F, et al. Prebiotics improve gastric motility and gastric electrical activity in preterm newborns. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2009;49:258-61.
177. Decsi T, Arato A, Balogh M, et al. [Randomised placebo controlled double blind study on the effect of prebiotic oligosaccharides on intestinal flora in healthy infants]. *Orvosi hetilap* 2005;146:2445-50.
178. Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Boehm G, Kock R, Vigi V. Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new component for infant formulae: effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2005;41:186-90.
179. Moro GE, Mosca F, Miniello V, et al. Effects of a new mixture of prebiotics on faecal flora and stools in term infants. *Acta Paediatr Suppl* 2003;91:77-9.
180. Moro G, Arslanoglu S, Stahl B, Jelinek J, Wahn U, Boehm G. A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Archives of disease in childhood* 2006;91:814-9.
181. Williams T, Choe Y, Price P, et al. Tolerance of formulas containing prebiotics in healthy, term infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2014;59:653-8.
182. Ziegler E, Vanderhoof JA, Petschow B, et al. Term infants fed formula supplemented with selected blends of prebiotics grow normally and have soft stools similar to those reported for breast-fed infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2007;44:359-64.
183. Scalabrini DM, Mitmesser SH, Welling GW, et al. New prebiotic blend of polydextrose and galacto-oligosaccharides has a bifidogenic effect in young infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2012;54:343-52.
184. Ashley C, Johnston WH, Harris CL, Stolz SI, Wampler JL, Berseth CL. Growth and tolerance of infants fed formula supplemented with polydextrose (PDX) and/or galactooligosaccharides (GOS): double-blind, randomized, controlled trial. *Nutrition journal* 2012;11:38.
185. Walker WA. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2000;30 Suppl 2:S2-7.
186. Nakamura Y, Nosaka S, Suzuki M, et al. Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. *Clinical and experimental immunology* 2004;137:52-8.
187. Scholtens PA, Alliet P, Raes M, et al. Fecal secretory immunoglobulin A is increased in healthy infants who receive a formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructooligosaccharides. *The Journal of nutrition* 2008;138:1141-7.
188. Kobayashi K, Fujiyama Y, Hagiwara K, Kondoh H. Resistance of normal serum IgA and secretory IgA to bacterial IgA proteases: evidence for the presence of enzyme-neutralizing antibodies in both serum and secretory IgA, and also in serum IgG. *Microbiology and immunology* 1987;31:1097-106.
189. Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, Lamm ME. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunology today* 1993;14:430-5.
190. Suzuki K, Meek B, Doi Y, et al. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:1981-6.
191. Sierra C, Bernal MJ, Blasco J, et al. Prebiotic effect during the first year of life in healthy infants fed formula containing GOS as the only prebiotic: a multicentre, randomised, double-blind and placebo-controlled trial. *European journal of nutrition* 2015;54:89-99.
192. Bode L, Kunz C, Muhly-Reinholz M, Mayer K, Seeger W, Rudloff S. Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thrombosis and haemostasis* 2004;92:1402-10.

193. Eiwegger T, Stahl B, Haidl P, et al. Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2010;21:1179-88.
194. Naarding MA, Ludwig IS, Groot F, et al. Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:3256-64.
195. Field CJ, McBurney MI, Massimino S, Hayek MG, Sunvold GD. The fermentable fiber content of the diet alters the function and composition of canine gut associated lymphoid tissue. *Veterinary immunology and immunopathology* 1999;72:325-41.
196. Lim BO, Yamada K, Nonaka M, Kuramoto Y, Hung P, Sugano M. Dietary fibers modulate indices of intestinal immune function in rats. *The Journal of nutrition* 1997;127:663-7.
197. Kudoh K, Shimizu J, Wada M, Takita T, Kanke Y, Innami S. Effect of indigestible saccharides on B lymphocyte response of intestinal mucosa and cecal fermentation in rats. *Journal of nutritional science and vitaminology* 1998;44:103-12.
198. Kanauchi O, Andoh A, Iwanaga T, et al. Germinated barley foodstuffs attenuate colonic mucosal damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model. *Journal of gastroenterology and hepatology* 1999;14:1173-9.
199. Milo LA, Reardon KA, Tappenden KA. Effects of short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition on intestinal pro-inflammatory cytokine abundance. *Digestive diseases and sciences* 2002;47:2049-55.
200. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;47:397-403.
201. Herfel TM, Jacobi SK, Lin X, et al. Polydextrose enrichment of infant formula demonstrates prebiotic characteristics by altering intestinal microbiota, organic acid concentrations, and cytokine expression in suckling piglets. *The Journal of nutrition* 2011;141:2139-45.
202. Raes M, Scholtens PA, Alliet P, et al. Exploration of basal immune parameters in healthy infants receiving an infant milk formula supplemented with prebiotics. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2010;21:e377-85.
203. Schmelzle H, Wirth S, Skopnik H, et al. Randomized double-blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partially hydrolyzed protein, a high beta-palmitic acid level, and nondigestible oligosaccharides. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2003;36:343-51.
204. Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G. Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. *The Journal of nutrition* 2007;137:2420-4.
205. Bruzzese E, Volpicelli M, Squeglia V, et al. A formula containing galacto- and fructo-oligosaccharides prevents intestinal and extra-intestinal infections: an observational study. *Clinical nutrition* 2009;28:156-61.
206. Osborn DA, Sinn JK. Prebiotics in infants for prevention of allergy. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013;3:CD006474.
207. Verheijden KA, Akbari P, Willemsen LE, et al. Inflammation-induced expression of the alarmin interleukin 33 can be suppressed by galacto-oligosaccharides. *International archives of allergy and immunology* 2015;167:127-36.
208. Garcia-Miguel M, Gonzalez MJ, Quera R, Hermoso MA. Innate immunity modulation by the IL-33/ST2 system in intestinal mucosa. *BioMed research international* 2013;2013:142492.
209. Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Current opinion in immunology* 2014;31:31-7.
210. Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G, Wienz F, Stahl B, Bertino E. Early neutral prebiotic oligosaccharide supplementation reduces the incidence of some allergic manifestations in the first 5 years of life. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 2012;26:49-59.
211. Muraro A, Halken S, Arshad SH, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines. Primary prevention of food allergy. *Allergy* 2014;69:590-601.
212. Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2011;52:238-50.
213. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2000;18:383-99.



214. Wanten GJ, Calder PC. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *The American journal of clinical nutrition* 2007;85:1171-84.
215. Giovannini M, Agostoni C, Salari PC. The role of lipids in nutrition during the first months of life. *The Journal of international medical research* 1991;19:351-62.
216. Agostoni C. Role of long-chain polyunsaturated fatty acids in the first year of life. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2008;47 Suppl 2:S41-4.
217. Racine RA, Deckelbaum RJ. Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2007;10:123-8.
218. Innis SM. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Advances in experimental medicine and biology* 2004;554:27-43.
219. Howe P, Buckley J. Metabolic health benefits of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Military medicine* 2014;179:138-43.
220. Parker-Barnes JM, Das T, Bobik E, et al. Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:8284-9.
221. Gottrand F. Long-chain polyunsaturated fatty acids influence the immune system of infants. *The Journal of nutrition* 2008;138:1807S-12S.
222. Calder PC. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Molecular nutrition & food research* 2012;56:1073-80.
223. Campoy C, Escolano-Margarit MV, Anjos T, Szajewska H, Uauy R. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *The British journal of nutrition* 2012;107 Suppl 2:S85-106.
224. Grimm H, Mayer K, Mayser P, Eigenbrodt E. Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *The British journal of nutrition* 2002;87 Suppl 1:S59-67.
225. Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 2001;17:669-73.
226. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2007;21:325-32.
227. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of clinical investigation* 2001;108:15-23.
228. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:1751-6.
229. Stephensen CB. Fish oil and inflammatory disease: is asthma the next target for n-3 fatty acid supplements? *Nutrition reviews* 2004;62:486-9.
230. Calder PC, Albers R, Antoine JM, et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *The British journal of nutrition* 2009;101 Suppl 1:S1-45.
231. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *The American journal of clinical nutrition* 2000;71:343S-8S.
232. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews Immunology* 2008;8:349-61.
233. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American journal of clinical nutrition* 2006;83:1505S-19S.
234. van den Elsen L, Garssen J, Willemsen L. Long chain N-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of allergic and cardiovascular disease. *Current pharmaceutical design* 2012;18:2375-92.
235. Field CJ, Clandinin MT, Van Aerde JE. Polyunsaturated fatty acids and T-cell function: implications for the neonate. *Lipids* 2001;36:1025-32.
236. de Jong AJ, Kloppenburg M, Toes RE, Ioan-Facsinay A. Fatty acids, lipid mediators, and T-cell function. *Frontiers in immunology* 2014;5:483.
237. Jensen CL, Maude M, Anderson RE, Heird WC. Effect of docosahexaenoic acid supplementation of lactating women on the fatty acid composition of breast milk lipids and maternal and infant plasma phospholipids. *The American journal of clinical nutrition* 2000;71:292S-9S.
238. Olafsdottir AS, Thorsdottir I, Wagner KH, Elmadafa I. Polyunsaturated fatty acids in the diet and breast milk of lactating icelandic women with traditional fish and cod liver oil consumption. *Annals of nutrition & metabolism* 2006;50:270-6.

239. da Cunha J, Macedo da Costa TH, Ito MK. Influences of maternal dietary intake and suckling on breast milk lipid and fatty acid composition in low-income women from Brasilia, Brazil. *Early human development* 2005;81:303-11.
240. Dunstan JA, Roper J, Mitoulas L, Hartmann PE, Simmer K, Prescott SL. The effect of supplementation with fish oil during pregnancy on breast milk immunoglobulin A, soluble CD14, cytokine levels and fatty acid composition. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2004;34:1237-42.
241. Dunstan JA, Mitoulas LR, Dixon G, et al. The effects of fish oil supplementation in pregnancy on breast milk fatty acid composition over the course of lactation: a randomized controlled trial. *Pediatric research* 2007;62:689-94.
242. Warstedt K, Furuholm C, Duchon K, Falth-Magnusson K, Fageras M. The effects of omega-3 fatty acid supplementation in pregnancy on maternal eicosanoid, cytokine, and chemokine secretion. *Pediatric research* 2009;66:212-7.
243. Gunaratne AW, Makrides M, Collins CT. Maternal prenatal and/or postnatal n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) supplementation for preventing allergies in early childhood. *The Cochrane database of systematic reviews* 2015;7:CD010085.
244. Miyata J, Arita M. Role of omega-3 fatty acids and their metabolites in asthma and allergic diseases. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 2015;64:27-34.
245. Birch EE, Khoury JC, Berseth CL, et al. The impact of early nutrition on incidence of allergic manifestations and common respiratory illnesses in children. *The Journal of pediatrics* 2010;156:902-6, 6 e1.
246. Pastor N, Soler B, Mitmesser SH, Ferguson P, Lifschitz C. Infants fed docosahexaenoic acid- and arachidonic acid-supplemented formula have decreased incidence of bronchiolitis/bronchitis the first year of life. *Clinical pediatrics* 2006;45:850-5.
247. Hageman JH, Hooyenga P, Diersen-Schade DA, Scalabrin DM, Wichers HJ, Birch EE. The impact of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids on respiratory illness in infants and children. *Current allergy and asthma reports* 2012;12:564-73.
248. Alm B, Aberg N, Erdes L, et al. Early introduction of fish decreases the risk of eczema in infants. *Archives of disease in childhood* 2009;94:11-5.
249. Virtanen SM, Kaila M, Pekkanen J, et al. Early introduction of oats associated with decreased risk of persistent asthma and early introduction of fish with decreased risk of allergic rhinitis. *The British journal of nutrition* 2010;103:266-73.
250. Goksor E, Alm B, Thengilsdottir H, Pettersson R, Aberg N, Wennergren G. Preschool wheeze - impact of early fish introduction and neonatal antibiotics. *Acta paediatrica* 2011;100:1561-6.
251. Miharshahi S, Peat JK, Webb K, et al. Effect of omega-3 fatty acid concentrations in plasma on symptoms of asthma at 18 months of age. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2004;15:517-22.
252. Peat JK, Miharshahi S, Kemp AS, et al. Three-year outcomes of dietary fatty acid modification and house dust mite reduction in the Childhood Asthma Prevention Study. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004;114:807-13.
253. Nutrologia ABd. I Consenso da Associação Brasileira de Nutrologia sobre recomendações de DHA durante gestação, lactação e infância *International Journal of Nutrology XVIII Congresso Brasileiro de Nutrologia* 2014;Ano 7 - Nº 3.
254. Barreto SM PA, Sichieri R, Monteiro CA, Batista-Filho M, Schimidt MI, Lotufo P, Assis AM, Guimarães V, Victora CG, Coitinho D, Passos VMA. Análise da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, da Organização Mundial da Saúde. *Epid Serv Saúde* 2005;14:41-68.
255. Grummer RR. Effect of feed on the composition of milk fat. *Journal of dairy science* 1991;74:3244-57.
256. Field CJ, Thomson CA, Van Aerde JE, et al. Lower proportion of CD45R0+ cells and deficient interleukin-10 production by formula-fed infants, compared with human-fed, is corrected with supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2000;31:291-9.
257. Field CJ, Van Aerde JE, Robinson LE, Clandinin MT. Effect of providing a formula supplemented with long-chain polyunsaturated fatty acids on immunity in full-term neonates. *The British journal of nutrition* 2008;99:91-9.
258. Lapillonne A, Pastor N, Zhuang W, Scalabrin DM. Infants fed formula with added long chain polyunsaturated fatty acids have reduced incidence of respiratory illnesses and diarrhea during the first year of life. *BMC pediatrics* 2014;14:168.

259. Thienprasert A, Samuhaseneetoo S, Popplestone K, West AL, Miles EA, Calder PC. Fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids selectively affect plasma cytokines and decrease illness in Thai schoolchildren: a randomized, double-blind, placebo-controlled intervention trial. *The Journal of pediatrics* 2009;154:391-5.
260. Minns LM, Kerling EH, Neely MR, et al. Toddler formula supplemented with docosahexaenoic acid (DHA) improves DHA status and respiratory health in a randomized, double-blind, controlled trial of US children less than 3 years of age. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 2010;82:287-93.
261. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental biology and medicine* 2008;233:674-88.
262. Yu G, Bjorksten B. Polyunsaturated fatty acids in school children in relation to allergy and serum IgE levels. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 1998;9:133-8.
263. Gil-Campos M, Dalmau Serra J, Comité de Nutrición de la Asociación Española de P. [Importance of docosahexaenoic acid (DHA): Functions and recommendations for its ingestion in infants]. *Anales de pediatría* 2010;73:142 e1-8.
264. Miura NN, Adachi Y, Yadomae T, Tamura H, Tanaka S, Ohno N. Structure and biological activities of beta-glucans from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Microbiology and immunology* 2003;47:173-82.
265. Rahar S, Swami G, Nagpal N, Nagpal MA, Singh GS. Preparation, characterization, and biological properties of beta-glucans. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* 2011;2:94-103.
266. Mantovani MS, Bellini MF, Angeli JP, Oliveira RJ, Silva AF, Ribeiro LR. beta-Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. *Mutation research* 2008;658:154-61.
267. King DE, Mainous AG, 3rd, Egan BM, Woolson RF, Geesey ME. Fiber and C-reactive protein in diabetes, hypertension, and obesity. *Diabetes care* 2005;28:1487-9.
268. Francelino Andrade E, Vieira Lobato R, Vasques Araujo T, Gilberto Zangeronimo M, Vicente Sousa R, Jose Pereira L. Effect of beta-glucans in the control of blood glucose levels of diabetic patients: a systematic review. *Nutrición hospitalaria* 2014;31:170-7.
269. Nwachukwu ID, Devassy JG, Aluko RE, Jones PJ. Cholesterol-lowering properties of oat beta-glucan and the promotion of cardiovascular health: did Health Canada make the right call? *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 2015;40:535-42.
270. Ho HV, Sievenpiper JL, Zurbau A, et al. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of the effect of barley beta-glucan on LDL-C, non-HDL-C and apoB for cardiovascular disease risk reduction-iv. *European journal of clinical nutrition* 2016.
271. Singh R, De S, Belkheir A. Avena sativa (Oat), a potential nutraceutical and therapeutic agent: an overview. *Critical reviews in food science and nutrition* 2013;53:126-44.
272. Food, Drug Administration HHS. Food labeling: health claims; soluble fiber from certain foods and risk of coronary heart disease. Interim final rule. *Federal register* 2008;73:9938-47.
273. Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina* 2007;43:597-606.
274. Novak M, Vetvicka V. Glucans as biological response modifiers. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 2009;9:67-75.
275. Cid VJ, Duran A, del Rey F, Snyder MP, Nombela C, Sanchez M. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 1995;59:345-86.
276. Klis FM. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 1994;10:851-69.
277. Seljelid R, Rasmussen LT, Larm O, Hoffman J. The protective effect of beta 1-3D-glucan-derivatized plastic beads against *Escherichia coli* infection in mice. *Scandinavian journal of immunology* 1987;25:55-60.
278. Brown GD, Gordon S. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cellular microbiology* 2005;7:471-9.
279. Sun L, Zhao Y. The biological role of dectin-1 in immune response. *International reviews of immunology* 2007;26:349-64.
280. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, et al. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *Journal of immunology* 2002;169:3876-82.
281. Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunological reviews* 2009;230:38-50.

282. Jesenak M, Banovcin P, Rennerova Z, Majtan J. beta-Glucans in the treatment and prevention of allergic diseases. *Allergologia et immunopathologia* 2014;42:149-56.
283. Kawashima S, Hirose K, Iwata A, et al. beta-glucan curdlan induces IL-10-producing CD4+ T cells and inhibits allergic airway inflammation. *Journal of immunology* 2012;189:5713-21.
284. Auinger A, Riede L, Bothe G, Busch R, Gruenwald J. Yeast (1,3)-(1,6)-beta-glucan helps to maintain the body's defence against pathogens: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicentric study in healthy subjects. *European journal of nutrition* 2013;52:1913-8.
285. Talbott SM, Talbott JA, Talbott TL, Dingler E. beta-Glucan supplementation, allergy symptoms, and quality of life in self-described ragweed allergy sufferers. *Food science & nutrition* 2013;1:90-101.
286. Moyad MA, Robinson LE, Kittelsrud JM, et al. Immunogenic yeast-based fermentation product reduces allergic rhinitis-induced nasal congestion: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Advances in therapy* 2009;26:795-804.
287. Yamada J, Hamuro J, Hatanaka H, Hamabata K, Kinoshita S. Alleviation of seasonal allergic symptoms with superfine beta-1,3-glucan: a randomized study. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007;119:1119-26.
288. Jesenak M, Hrubisko M, Majtan J, Rennerova Z, Banovcin P. Anti-allergic effect of Pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. *Phytotherapy research* : PTR 2014;28:471-4.
289. Jesenak M, Majtan J, Rennerova Z, Kyselovic J, Banovcin P, Hrubisko M. Immunomodulatory effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. *International immunopharmacology* 2013;15:395-9.
290. Sarinho E, Medeiros D, Schor D, et al. Production of interleukin-10 in asthmatic children after Beta-1-3-glucan. *Allergologia et immunopathologia* 2009;37:188-92.
291. Kirmaz C, Bayrak P, Yilmaz O, Yuksel H. Effects of glucan treatment on the Th1/Th2 balance in patients with allergic rhinitis: a double-blind placebo-controlled study. *European cytokine network* 2005;16:128-34.
292. Javmen A, Nemeikaite-Ceniene A, Bratchikov M, et al. beta-Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* Induces IFN-gamma Production In Vivo in BALB/c Mice. *In vivo* 2015;29:359-63.
293. CODEX. Codex standard for follow-Up formula: codex stan 156–1987. Geneva: Codex 1987.
294. Kliegman RM SB, Schor NF, St. Geme JW, Behrman RE. *Nelson Textbook of Pediatrics*. . 19th ed Philadelphia, PA: Elsevier Saunders 2011.
295. Group WHOMGRS. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl* 2006;450:76-85.
296. Frei R, Akdis M, O'Mahony L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Current opinion in gastroenterology* 2015;31:153-8.
297. Gruber C, van Stuijvenberg M, Mosca F, et al. Reduced occurrence of early atopic dermatitis because of immunoactive prebiotics among low-atopy-risk infants. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010;126:791-7.
298. D'Vaz N, Meldrum SJ, Dunstan JA, et al. Postnatal fish oil supplementation in high-risk infants to prevent allergy: randomized controlled trial. *Pediatrics* 2012;130:674-82.
299. Nagakura T, Matsuda S, Shichijyo K, Sugimoto H, Hata K. Dietary supplementation with fish oil rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in children with bronchial asthma. *The European respiratory journal* 2000;16:861-5.
300. Li F, Jin X, Liu B, Zhuang W, Scalabrin D. Follow-up formula consumption in 3- to 4-year-olds and respiratory infections: an RCT. *Pediatrics* 2014;133:e1533-40.
301. Lander RL, Lander AG, Houghton L, et al. Factors influencing growth and intestinal parasitic infections in preschoolers attending philanthropic daycare centers in Salvador, Northeast Region of Brazil. *Cad Saude Publica* 2012;28:2177-88.
302. Alcantara-Neves NM, de SGBG, Veiga RV, et al. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC research notes* 2014;7:817.
303. Hagel I, Puccio F, Lopez E, Lugo D, Cabrera M, Di Prisco MC. Intestinal parasitic infections and atopic dermatitis among Venezuelan Warao Amerindian pre- school children. *Pediatric allergy and immunology* : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology 2014;25:276-82.
304. Closa-Monasterolo R, Gispert-Llaurado M, Luque V, et al. Safety and efficacy of inulin and oligofructose supplementation in infant formula: results from a randomized clinical trial. *Clinical nutrition* 2013;32:918-27.

305. Rajindrajith S, Devanarayana NM, Crispus Perera BJ, Benninga MA. Childhood constipation as an emerging public health problem. *World journal of gastroenterology* : WJG 2016;22:6864-75.
306. de Araujo Sant'Anna AM, Calçado AC. Constipation in school-aged children at public schools in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 1999;29:190-3.
307. Del Ciampo IR GL, Del Ciampo LA, Fernandes MI. . Prevalence of chronic constipation in children at a primary health care unit. *Jornal de pediatria* 2002;78:497-502.
308. Kovacic K, Sood MR, Mugie S, et al. A multicenter study on childhood constipation and fecal incontinence: effects on quality of life. *The Journal of pediatrics* 2015;166:1482-7 e1.
309. Estratégias. BMDSSdAàSDdAPe. II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal. 2009;1ª edição:108.
310. Chatchatee P, Lee WS, Carrilho E, et al. Effects of growing-up milk supplemented with prebiotics and LCPUFAs on infections in young children. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2014;58:428-37.
311. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Garza C, Yang H, Group WHOMGRS. Comparison of the World Health Organization (WHO) Child Growth Standards and the National Center for Health Statistics/WHO international growth reference: implications for child health programmes. *Public health nutrition* 2006;9:942-7.
312. Monteiro CA, Szarfarc SC, Mondini L. [Secular trends in childhood in the city of Sao Paulo, Brazil (1984-1996)]. *Revista de saude publica* 2000;34:62-72.
313. de Novaes Oliveira M MR, Nguyen P. Risk factors associated with hemoglobin levels and nutritional status among Brazilian children attending daycare centers in Sao Paulo City, Brazil. . *Arch Latinoam Nutr* 2010;60:23-9.
314. Hannula J, Saarela M, Jousimies-Somer H, et al. Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. *Oral microbiology and immunology* 1999;14:176-82.
315. Berdicevsky I, Ben-Aryeh H, Szargel R, Gutman D. Oral Candida in children. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984;57:37-40.
316. Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontology* 2000 2009;49:39-59.
317. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgraduate medical journal* 2002;78:455-9.
318. Nurmatov U, Devereux G, Sheikh A. Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: systematic review and meta-analysis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011;127:724-33 e1-30.
319. Bantz SK, Zhu Z, Zheng T. The Role of Vitamin D in Pediatric Asthma. *Annals of pediatrics & child health* 2015;3.
320. Heine G, Niesner U, Chang HD, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *European journal of immunology* 2008;38:2210-8.

## APÊNDICE

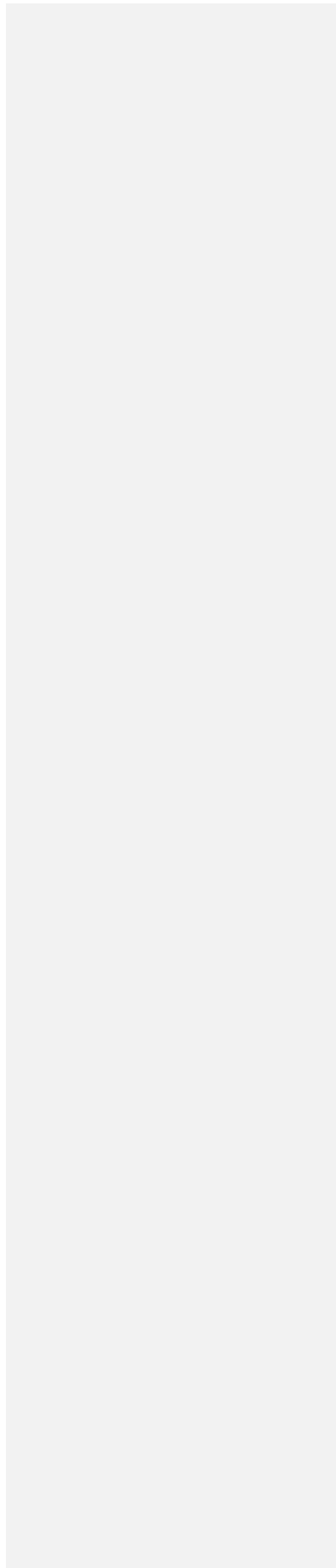
### APÊNDICE A – Composição nutricional dos produtos do estudo

<b>Por porção de 40 g de pó</b>	<b>Controle</b>	<b>Teste</b>
Energia, kcal	180	180
Proteína, g	7,3	7,3
Gordura, g	6,6	6,6
- DHA, mg	-	25
Carboidrato, g	23	23
- Fibra alimentar, g (PDX/ GOS na proporção de 1:1)	-	1,2
- Beta-1,3/ 1,6-glucanas, mg	-	8,7
Vitamina A, UI	380	630
Vitamina D, UI	31	119
Vitamina E, UI	0,33	2,6
Vitamina K <sub>1</sub> , mcg	0,41	9,5
Tiamina, mcg	57	210
Riboflavina, mcg	520	490
Vitamina B <sub>6</sub> , mcg	42	183
Vitamina B <sub>12</sub> , mcg	0,72	0,72
Niacina, mcg	144	2.200
Ácido fólico, mcg	7,8	31
Ácido pantotênico, mcg	770	1.160
Biotina, mcg	5,4	4,7
Vitamina C, mg	2,4	29
Colina, mg	28	44
Cálcio, mg	280	290
Fósforo, mg	200	187
Magnésio, mg	25	26
Sódio, mg	97	96
Potássio, mg	400	420
Cloreto, mg	330	320
Iodo, mcg	13,4	15,2
Ferro, mg	0,05	3,0
Zinco, mg	0,72	2,3
Manganês, mcg	5	19,2
Cobre, mcg	4,8	82

- Indica que o produto não continha o nutriente

## **ANEXOS**

### **ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for the content of the research ethics committee opinion. It occupies the majority of the lower half of the page.

## Universidade Federal da Bahia

Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos  
Diretoria Adjunta de Ensino e Pesquisa e Extensão (DAEPE)

### Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Rua Augusto Viana, s/n – Canela. Salvador – Bahia. Cep: 40.110-060

Tel.: (71) 3283-8140 FAX: (71) 3283-8141

E-mail: cep.hupes@gmail.com

### FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO CEP – 076/2009

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) avaliou o Projeto descrito abaixo:

**Projeto de Pesquisa:** Avaliação da eficácia e tolerância de uma fórmula de seguimento contendo prebióticos, ácido docosahexaenóico e um polissacarídeo em crianças de 12 a 48 meses de idade de duas creches em Salvador, Bahia, Brasil.

**Pesquisador Responsável:** Hugo da Costa Ribeiro Junior.

**Data do Parecer:** 17.12.2009

**Parecer:** Projeto Aprovado

Atenciosamente,

  
ROBERTO BADARÓ, MD PHD  
Coordenador CEP  
CHUPES

Resolução CNS 196/96 item IX.2 letra c

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e final de seu projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**TÍTULO:** Avaliação da eficácia e tolerância de uma fórmula de seguimento contendo prebióticos, ácido docosahexaenóico e um polissacarídeo natural em crianças de 12 a 48 meses de idade de duas creches em Salvador, Bahia, Brasil

**PATROCINADOR:** Mead Johnson & Company

**NÚMERO DO PROTOCOLO:** 6001, Revisão 2

**INVESTIGADOR:** Dr. Hugo Ribeiro, Jr., Professor Adjunto de Pediatria Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia Salvador, Bahia, Brasil

**TELEFONE:** (55 71 3331-2027)

## **INTRODUÇÃO**

### **Estamos convidando seu filho a participar deste estudo de pesquisa.**

Antes de concordar com a participação de seu filho neste estudo de pesquisa, é importante ler e entender as explicações abaixo sobre os procedimentos a serem realizados. Neste documento são descritos o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e as precauções do estudo. Também são descritos outros procedimentos disponíveis para seu filho e seu direito de permitir a admissão de seu filho no estudo ou de retirá-lo do estudo em qualquer momento. Não é possível oferecer nenhuma garantia ou certeza com relação aos resultados do estudo.

Você poderá fazer qualquer pergunta em qualquer momento para garantir que a sua decisão de permitir que o seu filho participe deste estudo não seja influenciada de qualquer maneira. Você receberá uma cópia assinada deste termo de consentimento.

### **FUNDAMENTOS:**

O ácido docosahexaenóico, em geral chamado de DHA, é um tipo de gordura ômega-3 que é um componente das células do organismo, inclusive das células responsáveis pela defesa imunológica do organismo. O DHA ajuda no desenvolvimento visual e mental dos bebês e por essa razão tem sido acrescentado em fórmulas de leites infantis como um ingrediente alimentar em muitos países, inclusive no Brasil. Alguns estudos realizados mostraram que esse ingrediente alimentar também pode ajudar a proteger contra alergias e infecções respiratórias se forem acrescentados à dieta de bebês e crianças.

Os prebióticos são ingredientes alimentares que não são digeridos no trato gastrointestinal, mas que podem ajudar no crescimento de algumas bactérias do intestino ("bactérias boas"), que são encontradas naturalmente no sistema digestivo. Isso, por sua vez, promove um funcionamento saudável do intestino, melhora a função imunológica e cria uma barreira

contra bactérias indesejadas ("bactérias ruins"). Dois exemplos de prebióticos são os galactooligosacarídeos, geralmente chamados de GOS e a polidextrose, geralmente chamada de PDX. Algumas fórmulas infantis de países da Europa, Estados Unidos, Ásia e América Latina contêm GOS.

Os beta-glucanos são ingredientes alimentares naturalmente encontrados em muitos alimentos, como cereais e no fermento de pão. Embora, até o presente momento, não tenha sido realizado nenhum estudo com beta-glucanos em crianças, foi demonstrado que esses ingredientes alimentares são seguros e aumentam a resistência a infecções em adultos.

#### **OBJETIVO DO ESTUDO:**

O objetivo deste estudo é determinar se uma bebida à base de leite que contenha DHA, GOS, PDX, e beta-glucanos ajudaria a reduzir as ocorrências de diarreia e doenças respiratórias em crianças com idade entre 12 meses e 4 anos.

#### **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

Aproximadamente 275 crianças participarão deste estudo em duas creches diferentes. A duração da participação das crianças neste estudo será de aproximadamente 28 semanas. As informações sobre a participação das crianças neste estudo serão coletadas enquanto as crianças estiverem na creche, durante os finais de semana e feriados. Se uma criança faltar na creche, um funcionário da creche visitará essa criança para obter informações sobre a ausência e sobre o seu estado de saúde.

Para poder participar deste estudo, seu filho deve ter entre 12 e 48 meses de idade (inclusive no 1º e 4º aniversários). O peso e a altura de seu filho deve estar dentro da faixa normal para crianças da mesma idade. Seu filho deve consumir leite ou bebida à base de leite como parte da dieta normal e não pode estar sendo amamentado exclusivamente no peito ou consumindo prebióticos ou probióticos; seu filho também não pode ter nenhuma doença grave ativa, diarreia ou infecção respiratória nem apresentar história de doença grave ou malformação congênita nociva, que na opinião do investigador possa interferir na avaliação da criança. Se concordar com a participação de seu filho no estudo, deve ler e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido antes que qualquer procedimento relacionado ao estudo seja realizado.

Depois que seu filho for considerado qualificado para participar deste estudo, uma das duas bebidas à base de leite do estudo será aleatoriamente selecionada para ele, de maneira semelhante ao jogo de cara ou coroa.

- Produto experimental: Uma fórmula de seguimento contendo DHA, prebióticos e beta-glucanos
- Produto de controle: Leite de vaca integral

Seu filho terá 1 chance em 2 de receber o produto experimental. Nem você nem o médico do estudo responsável pela avaliação das crianças saberá qual dos produtos seu filho receberá. No entanto, essa informação poderá ser revelada em caso de necessidade.

O conteúdo nutricional dessas bebidas à base de leite está em conformidade com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde do Brasil.

Após a seleção aleatória do produto do estudo, seu filho receberá duas porções do produto do estudo todos os dias em que for à creche pelos seis meses seguintes. Uma porção será servida no café da manhã e a outra será servida no lanche da tarde na creche. O produto do estudo será servido ao seu filho no lugar da bebida normalmente servida no café da manhã e à tarde. Uma porção do produto em pó será enviada para casa com seu filho todos os dias para que seja misturada com água e consumida no jantar no lugar da bebida normalmente tomada nessa refeição.

Seu filho receberá seis porções do produto do estudo em pó para levar para casa em todos os finais de semana para que a essa porção seja misturada com água e consumida três vezes ao dia. Durante feriados e período de férias, a mãe/pai ou cuidador fará visitas semanais à creche para retirar o produto em estudo para consumo durante o período de ausência da creche. Durante as semanas 20 e 24 do estudo durante o período de férias, seu filho precisará acompanhar o pai/mãe ou cuidador até a creche a fim de ser pesado e ter a sua altura/seu comprimento medido pelo pessoal do estudo.

Cada porção do produto do estudo será composta por 40 g de pó acrescentado a 200 ml de água mineral, perfazendo uma porção total de 229 ml. Você deve dar uma porção do líquido três vezes ao dia durante os finais de semana e durante feriados e período de férias, e uma vez à noite durante os dias de semana quando o seu filho estiver frequentando a creche. O melhor é usar o produto do estudo em substituição à bebida que seu filho geralmente toma nas refeições.

Forneceremos água mineral para misturar ao produto do estudo, uma mochila para levar as porções do pó do produto do estudo para casa e um copo especial para que seu filho use para beber o produto do estudo.

Você não deve dar nenhum outro produto à base de leite (exceto leite materno) durante o estudo, a menos que recomendado pelo pediatra de seu filho ou o médico do estudo.

### **Semana anterior ao dia da admissão**

Os procedimentos a seguir serão realizados na creche uma semana antes do início do uso do produto do estudo.

- Será coletada uma amostra de aproximadamente 20 mL das fezes de seu filho para pesquisa de parasitas e para avaliação de marcadores imunológicos
- Será coletada uma amostra de aproximadamente 5 mL de sangue para realização de um hemograma completo, para avaliar os níveis de ferro e zinco e os marcadores do sistema imunológico da criança

### **Dia da admissão**

Os procedimentos a seguir serão realizados na creche no dia em que seu filho começar a consumir o produto do estudo.

- Avaliação do peso e da altura
- Exame físico
- Avaliação para detecção de qualquer doença
- Registro de qualquer antibiótico que seu filho estiver tomando
- Sorteio aleatório para determinar qual produto do estudo seu filho beberá três vezes ao dia durante o período de 28 semanas do estudo.

#### **Semanas 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28**

O procedimento a seguir será realizado uma vez durante as semanas 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28.

- Medida do peso e da altura

#### **Todos os dias de semana durante o período de 28 semanas do estudo**

Os procedimentos a seguir serão realizados diariamente durante a semana:

- Duas porções do produto do estudo serão servidas ao seu filho pelos profissionais do estudo no café da manhã e no lanche da tarde e você receberá uma porção para o seu filho beber na janta em casa para substituir a bebida normal da refeição, perfazendo um total de três porções do produto do estudo por dia
- Medida da quantidade do produto do estudo que a criança não beber durante o café da manhã e lanche da tarde (medidas feitas pelos profissionais do estudo) e na janta (medida por você)
- Registro pelos profissionais da equipe do estudo de casos de diarreia ou outros problemas do estômago ou do intestino e de infecções respiratórias
- Registro pelos profissionais da equipe do estudo de quaisquer antibióticos e outros medicamentos que seu filho estiver tomando ou usando
- Registro por você e pelos profissionais da equipe do estudo do número de evacuações intestinais de seu filho e da consistência das fezes
- Os profissionais da equipe do estudo realizarão exames físicos de acordo com a necessidade durante todo o estudo

#### **Finais de semana e feriados e período de férias**

Os procedimentos a seguir deverão ser realizados nos finais de semana e nos feriados e períodos de férias:

- Você deve dar três porções do produto do estudo para seu filho beber, uma no café da manhã, uma no lanche da tarde e uma na janta para substituir a bebida normal da refeição
- Você deve medir a quantidade do produto do estudo que seu filho não beber durante essas refeições.
- Você deve notificar os profissionais da equipe do estudo sobre problemas de saúde que a criança tiver nesse período e os medicamentos que forem tomados ou usados
- Você deve registrar o número de evacuações intestinais de seu filho e a consistência média das fezes produzidas todos os dias
- Se seu filho ficar doente durante feriados ou período de férias, será necessário levá-lo para a Unidade Metabólica do hospital (CPPHO) para que ele seja examinado pelo médico do estudo ou outro médico.

### **Última semana do estudo**

Os procedimentos a seguir serão realizados uma vez durante a última semana do estudo (aproximadamente cinco meses e três semanas após o início do estudo)

- Será coletada uma amostra de aproximadamente 20 mL das fezes de seu filho por um profissional da equipe do estudo para pesquisa de parasitas e para avaliação de marcadores imunológicos
- Será coletada uma amostra de aproximadamente 5 mL de sangue por um profissional da equipe do estudo para realização de um hemograma completo, para avaliar os níveis de ferro e zinco e os marcadores do sistema imunológico da criança

### **Acompanhamento após o estudo**

Dois tipos de acompanhamento poderão ser realizados após seu filho completar ou sair do estudo.

1. Se por ocasião da saída do estudo for confirmada a existência de um problema de saúde com início após o começo do estudo, você ou o médico da criança será contatada aproximadamente 30 dias após seu filho ter saído do estudo para determinar o estado de saúde atual da criança.
2. Se seu filho for retirado do estudo antes do final (antes de 28 semanas) por qualquer motivo, você ou o médico da criança será contatada aproximadamente 30 dias após seu filho ter parado de consumir o produto do estudo. Esse acompanhamento será realizado para verificar o estado de saúde do seu filho.

### **RISCOS, DESCONFORTOS E PRECAUÇÕES**

Os possíveis riscos dos produtos do estudo incluem sintomas (reação) de intolerância que podem ocorrer com qualquer produto à base de proteína de leite de vaca, como por exemplo vômitos, diarreia, constipação, cólica abdominal, distensão abdominal, gases, fezes sanguinolentas ou outros sinais de alergia a alimentos como erupções cutâneas ou eczema.

Os riscos associados com a coleta de sangue incluem dor, inflamação da veia, hematoma, sangramento e, em casos raros, infecção no local da injeção.

Um creme ou spray anestésico pode ser usado na pele no local da injeção. O creme ou spray anestésico pode provocar os seguintes efeitos colaterais: vermelhidão, inchaço, descoloração, sensação anormal e coceira, erupção cutânea, alteração da percepção da temperatura e, em casos raros, reação alérgica.

### **RISCOS INESPERADOS**

Como um dos produtos do estudo é experimental, pode haver riscos desconhecidos envolvidos na participação do estudo, incluindo reações alérgicas que, se não forem tratadas imediatamente, podem apresentar riscos para a saúde.

### **BENEFÍCIOS**

Não existem garantias de que seu filho se beneficiará com a participação neste estudo.

### **ALTERNATIVAS PARA A PARTICIPAÇÃO**

A participação de seu filho neste estudo não é obrigatória. A alternativa para a participação neste estudo é continuar dando ao seu filho as bebidas que ele(a) normalmente toma nas refeições. O médico do estudo de seu filho discutirá com você os riscos e os benefícios das opções de bebidas nutricionais.

### **NOVOS ACHADOS**

Durante a participação de seu filho no estudo, você será comunicado sobre quaisquer novas

informações, que possam influenciar sua decisão de permitir que seu filho continue no estudo, que se tornarem disponíveis.

### **CUSTO DA PARTICIPAÇÃO**

Você não precisa pagar nada pela participação de seu filho neste estudo. O produto do estudo e os procedimentos que serão realizados serão gratuitos para você ou para seu plano de seguro saúde, inclusive o SUS - Sistema Único de Saúde.

O estudo não substitui as consultas de rotina de seu filho com o pediatra.

### **COMPENSAÇÃO PELA PARTICIPAÇÃO**

Não será oferecida nenhuma compensação pela participação, com exceção de que o produto do estudo, a água para misturar no pó do produto do estudo, a mochila e o copo serão gratuitos.

### **CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS**

Os registros da participação de seu filho serão mantidos em sigilo, exceto se a revelação for exigida pela lei ou conforme descrito neste termo de consentimento. O médico do estudo, o patrocinador ou os representantes do patrocinador e, em determinadas circunstâncias, o United States Food and Drug Administration (FDA) (Órgão Americano que controla os alimentos e medicamentos), o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), o Ministério da Saúde do Brasil e as autoridades regulatórias brasileiras poderão inspecionar os registros estritamente relacionados ao estudo para verificação dos procedimentos do estudo clínico.

Portanto, não é possível garantir total confidencialidade. Se os resultados deste estudo vierem a ser publicados ou apresentados em eventos científicos, seu filho não será identificado.

### **ARMAZENAMENTO E ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE SANGUE E DE FEZES**

Após o exame das amostras de fezes e de sangue do seu filho para o estudo, o que restar das amostras poderá ser transferido para a Mead Johnson & Company e para laboratórios que trabalham para Mead Johnson & Company. Ao concordar com a participação do seu filho no estudo, você estará também concordando que Mead Johnson & Company use o que restar das amostras para possíveis testes adicionais. No entanto, nenhum teste relacionado à infecção pelo HIV ou testes genéticos do seu filho serão realizados sem que você leia e assine um outro documento de consentimento. As amostras coletadas poderão ser armazenadas por até 15 anos.

### **COMPENSAÇÃO POR DANOS**

Se você acreditar que seu filho tiver sofrido uma lesão ou não estiver bem devido à participação neste estudo, você deve entrar em contato com o médico do estudo através do número de telefone apresentado na página 1 deste termo de consentimento, que estará permanentemente em funcionamento.

A Mead Johnson & Company, o patrocinador deste estudo de pesquisa, pagará pelas despesas decorrentes do tratamento médico de seu filho, se essas despesas médicas forem decorrentes de: a) tratamento de algum efeito colateral resultante da participação de seu filho no estudo ou (b) tratamento de um problema médico causado pelo uso do produto do estudo fornecido para esta pesquisa ou pelos procedimentos realizados em seu filho como parte do estudo. Como participante deste estudo de pesquisa, seu filho tem alguns direitos e

é protegido pela lei e o fato de você assinar este termo de consentimento não fará com que seu filho perca nenhum direito legal nem a proteção da lei.

#### **CONTATO EM CASO DE EMERGÊNCIA/CONTATO COM OS INVESTIGADORES**

Em caso de dúvidas sobre este estudo ou se acreditar que seu filho tenha sofrido algum dano relacionado a este estudo, ou em caso de emergência, entre em contato com o médico do estudo listado na página 1 deste termo de consentimento.

Embora a responsabilidade pelo estudo seja estritamente do pesquisador responsável, em caso de dúvidas sobre os direitos de seu filho como participante deste estudo de pesquisa, ou reclamações relacionadas a este estudo de pesquisa, ligue para o Comitê de Ética em Pesquisa no Complexo Universitário Prof. Edgard Santos, no telefone 32838140 durante o horário comercial de segunda a sexta-feira, das 8 h ao meio-dia e das 14 às 18h.

#### **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E DIREITO DE SAIR DO ESTUDO**

A sua decisão de permitir a participação de seu filho neste estudo é voluntária. Você pode decidir não autorizar a participação de seu filho ou poderá retirar seu filho do estudo por qualquer motivo e em qualquer momento sem que isso acarrete penalidades ou perda de benefícios aos quais seu filho tem direito e sem que isso afete o atendimento médico de seu filho no futuro ou o atendimento na creche.

A participação de seu filho no estudo poderá ser interrompida pelo médico ou pelo patrocinador do estudo sem seu consentimento por uma das seguintes razões:

- Se o estudo for cancelado, com consulta anterior ao CEP/CONEP.
- Se, na opinião do investigador, houver alguma mudança no estado de saúde de seu filho que possa piorar com a continuação da participação no estudo, com notificação ao CEP/CONEP.

#### **CONSENTIMENTO**

Li este termo de consentimento e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas satisfatórias. Este termo de consentimento está sendo assinado voluntariamente e indica minha autorização para que meu filho participe deste estudo, até que eu tome outra decisão. Receberei uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido. Ao assinar este termo de consentimento, não estarei abrindo mão dos direitos legais que meu filho tem como participante de uma pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso do participante

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso da mãe ou responsável legal\*

\_\_\_\_\_  
Assinatura da mãe ou responsável legal\*

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso do pai ou responsável legal\*

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pai ou responsável legal\*

\_\_\_\_\_  
Data

**\*Responsável legal – Com minha assinatura neste Termo de consentimento livre e esclarecido, declaro que tenho autoridade legal (custódia legal) para dar permissão para que essa criança participe deste estudo. Entreguei ao médico do estudo ou pessoa por ele designada cópias dos documentos de custódia que comprovam que tenho a autoridade legal acima descrita (favor anexar).**

\_\_\_\_\_  
Nome por extensor da pessoa que conduziu o processo de obtenção do consentimento

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pessoa que conduziu o processo de  
obtenção do consentimento

\_\_\_\_\_  
Data

Número do participante \_\_\_\_\_





ANEXO D – Formulário para registro diário de consumo da fórmula e de evacuações em casa.

**REGISTRO DE INGESTÃO DA FÓRMULA DO ESTUDO – CASA**

Você está levando para casa 04 sachês de leite em pó, que deverão ser oferecidos a seu(a) filho(a) todas as noites, 1 vez/noite (de segunda a quinta). Juntamente com o leite, você levará água mineral, que deverá ser utilizada para o preparo do leite, e uma folha de registro onde deverá anotar a hora em que você ofereceu o leite para ele e a quantidade que sobrou no copo graduado. Prepare o leite da seguinte forma: meça 200 mL de água mineral e em seguida acrescente 01 sachê do leite, misturando até dissolvê-lo completamente. Não acrescente açúcar, frutas ou farináceo (mucilon, cremogema, arrozina, etc.) neste leite, porque ele já é completo. EVITE OFERECER OUTRO TIPO DE LEITE A SEU FILHO EM CASA! SE ELE AINDA MAMA, O LEITE MATERNO DEVE SER OFERECIDO.

Dia: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Hora	Resto
____:____	

**REGISTRO DE EVACUAÇÕES**

Abaixo você deverá anotar todas as evacuações (fezes) que seu(a) filho(a) apresentar em casa, desde o momento em que sair da creche. Não esqueça de anotar nos espaços abaixo o horário e a consistência de cada dejeção. É muito IMPORTANTE que você anote TODAS as dejeções que ele apresentar em casa. Use as fotos para registrar a consistência em caso de dúvidas.

Dejeção	Hora	Consistência
1º		<input type="checkbox"/> Dura <input type="checkbox"/> Formada <input type="checkbox"/> Mole/pastosa <input type="checkbox"/> Semi-líquida <input type="checkbox"/> Líquida
2º		<input type="checkbox"/> Dura <input type="checkbox"/> Formada <input type="checkbox"/> Mole/pastosa <input type="checkbox"/> Semi-líquida <input type="checkbox"/> Líquida
3º		<input type="checkbox"/> Dura <input type="checkbox"/> Formada <input type="checkbox"/> Mole/pastosa <input type="checkbox"/> Semi-líquida <input type="checkbox"/> Líquida
4º		<input type="checkbox"/> Dura <input type="checkbox"/> Formada <input type="checkbox"/> Mole/pastosa <input type="checkbox"/> Semi-líquida <input type="checkbox"/> Líquida
5º		<input type="checkbox"/> Dura <input type="checkbox"/> Formada <input type="checkbox"/> Mole/pastosa <input type="checkbox"/> Semi-líquida <input type="checkbox"/> Líquida

ANEXO E – Formulário para registro de evacuações na creche.

Projeto 6001

**Creche Pupileira**  
**Formulário para registro de fezes**

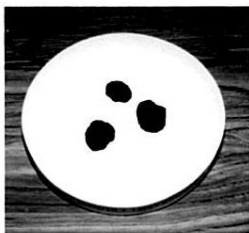
Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Dia da semana: \_\_\_\_\_

<b>GRUPO 2A</b>	<b>1º</b>	<b>2º</b>	<b>3º</b>	<b>4º</b>	<b>5º</b>	<b>6º</b>	<b>7º</b>	<b>8º</b>	<b>9º</b>	<b>10º</b>	<b>Total</b>
ALESSANDRA											
BEATRIZ KAUANE											
CAILANE											
GIANLUCCA											
GUSTAVO											
GABRIEL											
ISABELLA											
JÚLIA											
KAUAN FELIPE											
KAUANY											
LUÍS GABRIEL											
LUIZ CÂNDIDO											
MARIA GABRIELA											
MARIANA											
OTÁVIO LUCAS											
TARCILA											
TAUAN											

(1) D = dura (2) F = formada (3) P = pastosa (4) SL = semi-líquida (5) L = líquida

ANEXO F – Guia de consistência das fezes.

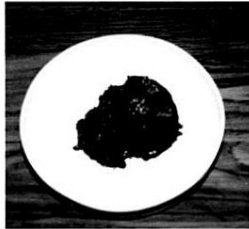
Use estas figuras como referência para determinar a consistência das fezes de seu bebê ao preencher o diário. A cor não importa; leve em consideração somente a consistência das fezes.



1 = Dura  
(bolinhas duras e secas)



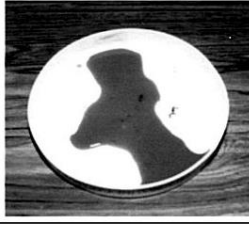
2 = Formada  
(forma definida, não seca)



3 = Mole  
(forma não definida, pastosa)



4 = Não formada ou granulosa  
(sem forma, um pouco de água ou pequenos grânulos)



5 = Aquosa  
(sem forma, principalmente água)

ANEXO G – Ficha para registro de eventos adversos.

Nome: \_\_\_\_\_ Creche: \_\_\_\_\_ Grupo: \_\_\_\_\_

Mês: \_\_\_\_\_ Data de randomização: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

<b>Dia</b>	<b>Data</b>	<b>Está com algum sintoma? Qual?</b>	<b>Conduta adotada</b>	<b>Será suspensa? Período</b>
<b>Segunda</b>	____/____/____			
<b>Terça</b>	____/____/____			
<b>Quarta</b>	____/____/____			
<b>Quinta</b>	____/____/____			
<b>Sexta</b>	____/____/____			
<b>Sábado</b>	____/____/____			
	____/____/____			

Domingo				
---------	--	--	--	--

**REGISTRO DE EVENTOS ADVERSOS**

Nome: \_\_\_\_\_ Grupo: \_\_\_\_\_

Evento adverso	Data dos eventos		O EA é sério?  0 = Não 1 = Sim	Severidade  1 = Leve 2 = Moderada 3 = Severa	Ações tomadas  0 = nenhuma 1 = reduziu a ingestão da FE 2 = suspendeu o produto 3 = descontinuou o produto 4 = prescrita medicação 5 = Outras (especifique)
	Data de início	Data do término			
Evento:  Código:	____/____/____	( ) Término em ____/____/____ ( ) Estabilizou ( ) Em andamento: ____/____/____ ( ) Morte, data: ____/____/____			
Evento:  Código:	____/____/____	( ) Término: ____/____/____ ( ) Estabilizou ( ) Em andamento: ____/____/____ ( ) Morte, data: ____/____/____			
Evento:  Código:	____/____/____	( ) Término: ____/____/____ ( ) Estabilizou ( ) Em andamento: ____/____/____ ( ) Morte, data: ____/____/____			
Evento:	____/____/____	( ) Término: ____/____/____			

Código:		<input type="checkbox"/> Estabilizou <input type="checkbox"/> Em andamento: __/__/__ <input type="checkbox"/> Morte, data: __/__/__				
---------	--	---	--	--	--	--

