



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Luiza Tavares Carneiro Santiago

**Perfil de citocinas no colostro em função da
idade gestacional e do crescimento fetal**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre(a) em Ginecologia,
Obstetrícia e Mastologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a).

Botucatu
2016

Luiza Tavares Carneiro Santiago

Perfil de citocinas no colostro em função da
idade gestacional e do crescimento fetal

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de
Mestre(a) em Ginecologia,
Obstetrícia e Mastologia.

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo
Coorientador(a):Prof(a).Dr(a).

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santiago, Luiza Tavares Carneiro.

Perfil de citocinas no colostro em função da idade gestacional e do crescimento fetal / Luiza Tavares Carneiro Santiago. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo
Capes: 40500004

1. Citocinas. 2. Colostro. 3. Leite humano. 4. Feto - Retardo do desenvolvimento. 5. Amamentação. 6. Prematuros.

Palavras-chave: Citocinas; Colostro; Leite materno; Prematuro; Retardo do crescimento fetal.

Dedicatória

Aos meus pais, Ricardo e Flávia por terem sempre acreditado no meu crescimento profissional e pessoal, permitindo que todos os meus sonhos se tornassem realidade, pelo apoio constante, e por todo amor.

À minha irmã Julia pelo carinho, amizade e parceria.

Ao meu namorado André, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Agradecimentos especiais

À Dra. Lígia Maria S. S. Rugolo, pela inesquecível oportunidade de iniciar meus conhecimentos científicos sob sua orientação, por acreditar, incentivar, apoiar e auxiliar todos os momentos do desenvolvimento desse trabalho e por todo ensinamento majestosamente dividido.

Ao Dr. Nilton Carlos Machado e Dr^a Mary de Assis Carvalho, pelo incentivo de seguir o caminho do aprendizado científico, desde o aprimoramento em Nutrição Clínica em Pediatria. Meus agradecimentos pelo amizade, pelo apoio e por todo aprendizado.

A Nutricionista Natália Alves Freitas, pela parceria nessa jornada, pela amizade e pela imensa contribuição para a coleta de dados desse projeto.

À Prof.^a Cilmerly Suemy Kurokawa e a toda a equipe do laboratório de pediatria experimental pela realização das análises laboratoriais e por todo o apoio durante o desenvolvimento desse projeto.

Outros agradecimentos

À toda a equipe da Neonatologia e aos Residentes da Pediatria, pela convivência e colaboração na coleta de dados desse projeto.

Aos Secretários do Departamento de Pediatria, Adriana, Fabiano e Paulo, pelo convívio e por todo o auxílio nessa jornada.

Às nutricionistas Valéria Nobrega Silva e Vanessa Granado Cassettari, pela amizade, pelo apoio e por todo conhecimento dividido.

À toda equipe de Enfermagem do Ambulatório de Pediatria, que auxiliaram imensamente na execução desse projeto.

A todos os colegas e professores da pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, pelo convívio, competência e disposição em compartilhar experiências.

As Mães e aos Recém-nascidos, que participaram deste projeto. Por causa deles é que esta dissertação se concretizou. Vocês merecem meu eterno agradecimento!

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida durante o mestrado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

Capítulo 1 – Revisão da Literatura

1. Nutrição do recém-nascido: aspectos relacionados à prematuridade e à restrição do crescimento fetal.....	11
2. Importância do aleitamento materno.....	13
3. Leite materno.....	15
4. Justificativa do estudo.....	21
5. Referências bibliográficas.....	24

Capítulo 2 – Artigo científico

1. Introdução.....	34
2. Método	35
3. Resultados	38
4. Discussão	44
5. Referências bibliográficas	49
6. Anexos	52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** - Dados maternos, gestacionais, de nascimento e neonatais nos 4 grupos de recém-nascidos 39
- Tabela 02** - Níveis de citocinas no colostro: comparação entre os 4 grupos de recém-nascidos 40
- Tabela 03** - Efeito da restrição do crescimento intra-uterino nos níveis de citocinas do colostro das mães de prematuros e de recém-nascidos de termo..... 41
- Tabela 04** - Correlação entre as citocinas no colostro das mães de recém-nascidos do 4 grupos.....43

RESUMO

INTRODUÇÃO: O efeito da idade gestacional e do crescimento fetal nos imunocomponentes do leite materno ainda é pouco conhecido.

OBJETIVO: Determinar a quantidade de citocinas no colostro em função da idade gestacional e do crescimento fetal.

MÉTODO: Estudo transversal, envolvendo mães de recém-nascidos prematuros (PT) e de termo (T), nascidos na Maternidade da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em 2014-2015. Critério de inclusão: gestação única; ausência de diabetes materno, ou uso de medicações/drogas ilícitas, sorologias negativas; recém-nascido com peso adequado (AIG) ou pequeno para idade gestacional (PIG) e sem malformação. Excluídos: não obtenção do colostro, mastite, uso de medicamento pela puérpera. Foram estudados 4 grupos: PT-PIG (n=18), PT-AIG (n=42), T-PIG (n=45), T-AIG (controle, n=42). No colostro coletado entre 24-72 horas pós-nascimento, foram dosadas as citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α) por citometria de fluxo. Na comparação entre grupos utilizou-se o Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher, ANOVA, e Correlação de Pearson. **RESULTADOS:** As características maternas foram semelhantes nos 4 grupos. A idade gestacional média foi 34 semanas nos prematuros e 39 semanas nos termos. Os níveis de citocinas do colostro não diferiram entre os grupos de termo e pretermo. O grupo T-PIG apresentou maior quantidade de citocinas comparado aos demais. Nos 4 grupos houve correlação entre as citocinas, especialmente nos T-PIG. **CONCLUSÃO:** A quantidade de citocinas no colostro foi influenciada pelo crescimento fetal e não pela idade gestacional.

Palavras-chave: Citocinas, leite materno, colostro, prematuro, retardo do crescimento fetal

ABSTRACT

INTRODUCTION: The effect of gestational age and fetal growth in the immunocomponents of human milk is not well established. **OBJECTIVE:** To determine the levels of cytokines in colostrum according to gestational age and fetal growth. **METHOD:** Cross-sectional study with mothers of term (T) and preterm (PT) infants, born at the Maternity of Botucatu School of Medicine – UNESP, during 2014 -2015. Inclusion criteria were: single pregnancy; without maternal diabetes or use of medications/illicit drugs; negative maternal serology; newborn without malformation, appropriate-for-gestational age (AGA) and small-for-gestational age (SGA). Participants with mastitis, or use of medication, or failure to obtain colostrum, were excluded. Four groups were studied: PT-SGA (n=18), PT-AGA (n=42), T-SGA (n=45), and T-AGA (control, n=42). Colostrum was collected between 24-72 hours postpartum, and cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α) were measured by flow cytometry. Chi-square or Fisher's exact test, ANOVA and Pearson's correlation were used to evaluate differences among the groups. **RESULTS:** Maternal characteristics were similar among the groups. The mean gestational age was 34 and 39 weeks for preterm and term groups. Cytokines levels in the colostrum were not different between the term and preterm groups. However cytokines levels were significantly higher in colostrum from mothers of T-SGA. A positive correlation among the cytokines was found in all groups, especially in T-SGA. **CONCLUSION:** The cytokines levels in colostrum was influenced by the fetal growth, but not by the gestational age.

Key-words: Cytokines, human milk, colostrum, infant premature, fetal growth retardation

Capítulo 1

Revisão da Literatura

1. Nutrição do recém-nascido: aspectos relacionados à prematuridade e à restrição do crescimento fetal

A idade gestacional e peso de nascimento são importantes fatores prognósticos tanto na sobrevivência quanto na qualidade de vida do recém-nascido. Muitas estratégias de atenção à saúde têm sido implementadas com sucesso por obstetras e neonatologistas para evitar as complicações da prematuridade e do baixo peso ao nascer e melhorar o prognóstico neonatal. Entretanto, o adequado suporte nutricional a esses recém-nascidos ainda é motivo de discussão na literatura e um desafio na prática clínica, especialmente quando se trata de pequenos prematuros, nos quais a elevada morbidade, associada à imaturidade estrutural e fisiológica do trato gastrointestinal são fatores limitantes na nutrição. Assim, nos recém-nascidos doentes a oferta recomendada geralmente não é prescrita e quando prescrita muitas vezes não pode ser cumprida, propiciando acúmulo progressivo de deficiências nutricionais (Anchieta et al, 2004; Rugolo, 2005; ESPGHAN, 2006).

Há forte evidência que a nutrição no início da vida influencia na saúde futura do indivíduo, e está bem documentado na literatura que tanto a restrição do crescimento intra-uterino ou pós-natal, como o excessivo ganho de peso nos primeiros anos de vida associam-se com pior prognóstico de crescimento e desenvolvimento no longo prazo e aumentam o risco de síndrome metabólica no adulto (Adair et al, 2013;

Cordero et al, 2015; Ong et al, 2015). Assim, todos os esforços devem ser feitos para que os prematuros, os recém-nascidos com restrição do crescimento intra-uterino e os pequenos para a idade gestacional tenham crescimento adequado no início da vida. Nesse sentido, o leite materno é considerado o alimento ideal (Underwood, 2013; Andreas et al, 2015).

A nutrição precoce é fundamental não apenas para a recuperação, como para o adequado desenvolvimento neurológico do recém-nascido gravemente doente e a recomendação atual é para investimento intenso nesse aspecto, com início precoce da oferta nutricional por via parenteral e enteral (Ehrenkranz, 2010; . Lapillonne & Griffin, 2013; Hsiao et al, 2014; Konnikova et al, 2015).

A preocupação com o início precoce da alimentação enteral é o risco de enterocolite necrosante, uma doença que acomete predominantemente prematuros e que é nitidamente relacionada à prática alimentar. Entretanto, o atraso no início da alimentação não diminui esse risco e ainda pode propiciar efeitos adversos como: atrofia de mucosa intestinal; disfunção gastrointestinal; translocação bacteriana; menor oferta energética comprometendo o crescimento pós-natal; maior necessidade de nutrição parenteral, uso de cateteres e suas complicações (Morgan et al, 2013; Dutta et al, 2015).

A presença de restrição do crescimento intrauterino é outro aspecto que preocupa quanto ao início da alimentação, especialmente se houver alteração no *Doppler* ante-natal. Recém-nascidos que tiveram alteração no fluxo diastólico da artéria umbilical apresentam com

frequência intolerância alimentar e risco aumentado de enterocolite necrosante, justificando o atraso na introdução da alimentação enteral. Entretanto não há evidência de que essa prática alimentar seja benéfica e deva ser recomendada. Como não está definido o tempo ideal para alimentar esses recém-nascidos, recomenda-se cautela no início e na progressão da dieta dos mesmos, sendo inquestionável a importância do leite materno (Dorling et al, 2005, Barone et al, 2013; Bozzeti et al, 2013).

2. Importância do aleitamento materno

A OMS recomenda que todos os recém-nascidos sejam alimentados com leite materno. (WHO, 2011). Para o recém-nascido prematuro, a recomendação do aleitamento materno tem sido reforçada com base nas propriedades imunológicas do leite materno, no seu papel na maturação gastrintestinal, na formação do vínculo mãe-filho e no melhor prognóstico de crescimento e desenvolvimento (Gregory, 2013; Underwood, 2013; Gibertoni et al, 2015).

Os benefícios do aleitamento materno ocorrem no curto e longo prazo. Além de propiciar imunoproteção passiva, o leite materno fornece vários imunonutrientes e fatores de crescimento que melhoram a barreira intestinal do recém-nascido, diminuindo a permeabilidade a macromoléculas, reduzindo a translocação bacteriana e captação de endotoxinas (Tackoen, 2012). No longo prazo destaca-se o menor risco

de alergias e doenças imuno-inflamatórias em crianças que foram amamentadas (August et al, 2006; Agarwal et al, 2011).

Recém-nascidos prematuros alimentados com leite materno, preferencialmente o leite da própria mãe, apresentam menor incidência de doenças neonatais graves como enterocolite necrosante e infecção/sepse (Nascimento & Issler, 2004; Corpeleijn et al, 2012; Chapman, 2013; Patel et al, 2013), bem como melhor crescimento e desenvolvimento nos primeiros anos de vida (Vohr et al, 2006; Vohr et al, 2007; Edmond et al, 2008), melhor desempenho cognitivo na idade escolar (Ribas-Fitó et al, 2007) e menor risco de síndrome metabólica na vida adulta (Owen et al, 2011).

Na alimentação dos recém-nascidos com restrição de crescimento fetal, o leite materno apresenta benefícios similares aos descritos para prematuros, incluindo, proteção da mucosa intestinal, diminuição do risco de enterocolite necrosante e melhora do sistema imunológico (Palmer, 2011; Bozzeti et al, 2013). No longo prazo tem sido descrito redução da incidência de algumas doenças crônicas, como: alergias, artrite reumatóide, diabetes mellitus tipo 1, doença de Crohn, e linfomas. Entretanto, os resultados no longo prazo não são uniformes, e alguns estudos evidenciaram pouco ou nenhum efeito do aleitamento materno nessas doenças (Turck, 2007, Young et al, 2007; Barclay et al, 2009; Brugman, et al 2009; Simard et al, 2010; Palmer, 2011).

O impacto do aleitamento materno no desenvolvimento do sistema imune é provavelmente o maior benefício para os recém-nascidos com restrição do crescimento fetal (Calder et al, 2006; Palmer, 2011).

3. Leite materno

- Fases da lactação

A lactação é constituída por 3 fases. O primeiro fluido produzido por mães após o parto é o colostro, que é diferente em volume, aparência e composição. O colostro, produzido em pequenas quantidades nos primeiros cinco dias após o parto, é rico em componentes imunológicos, lactoferrina, leucócitos, fatores de crescimento (Castellote et al, 2011), e contém concentrações relativamente baixas de lactose, cálcio e potássio, enquanto que os níveis de sódio, cloro, magnésio são mais elevados, em comparação ao leite maduro (Pang & Hortmamm, 2007).

A segunda fase da lactação, designada fase de transição, ocorre a partir do sexto dia até o final da segunda semana após o parto. Nessa fase, o leite ainda apresenta algumas características do colostro, porém com quantidades crescentes de lactose e diminuição dos níveis de sódio e potássio, adequando-se às necessidades nutricionais do recém-nascido em crescimento. A partir da segunda quinzena após o parto o leite materno é classificado como maduro (Henderson et al, 2008; Nommsen-Rivers et al, 2012).

- Composição do leite materno

O leite materno é composto por uma combinação única de macronutrientes (proteínas, lipídios e carboidratos), bem como de micronutrientes, incluindo minerais, vitaminas e vários componentes bioativos (Nascimento & Isster 2004; Ballard & Morrow, 2013).

Dentre os macronutrientes do leite materno, especial ênfase tem sido dada aos lipídios, pois além de sua contribuição no fornecimento de energia, desempenham importante papel no desenvolvimento do sistema nervoso central (Innis, 2004). A quantidade de lipídios no leite materno difere conforme as condições geográficas, os hábitos alimentares das mães, a idade gestacional e pós-natal, o período do dia, e ainda conforme o tempo de mamada (início versus final) (Iranpour et al, 2013; Innis, 2014). Os ácidos graxos mais importantes no leite materno são os poli-insaturados de cadeia longa como o ácido docosahexanóico e o araquidônico, cujo benefício no desenvolvimento do cérebro e da retina tem sido documentado em estudos que mostram melhor acuidade visual e melhor desempenho cognitivo nas crianças que foram amamentadas (Fleith, 2005; Tinoco et al, 2007).

A lactose é o principal carboidrato do leite materno, correspondendo a 70% dos carboidratos totais e suprimindo cerca de 40% das necessidades energéticas do recém-nascido. A lactose é um dissacarídeo e necessita da lactase para ser hidrolisada em glicose e galactose. A nutrição precoce com o leite materno estimula a produção

de lactase, facilitando dessa forma a digestão da lactose, o que é especialmente importante para os recém-nascidos prematuros que apresentam deficiência dessa enzima, mas quando alimentados com leite materno conseguem absorver mais de 90% da lactose. A glicose é importante fonte de energia, enquanto que a galactose é a base para a síntese dos galactopeptídios, necessários para o desenvolvimento do sistema nervoso central. A lactose participa do mecanismo de absorção de cálcio e fósforo e constitui substrato para a flora intestinal do recém-nascido, produzindo grandes quantidades de ácido láctico, reduzindo o pH intestinal e tornando o ambiente impróprio ao crescimento de bactérias patogênicas (Tackoen, 2012).

As proteínas do leite materno tem importante atividade biológica, e incluem as imunoglobulinas, enzimas, alguns hormônios, fatores de crescimento e componentes anti-inflamatórios (Liao et al, 2011 ; Gao et al, 2012).

Já está bem documentada a diferença na composição do leite de mães de prematuros em comparação às mães de recém-nascidos de termo, com maior conteúdo de proteína, lipídios e conseqüente maior valor energético no leite materno de prematuros (Ballard & Morrow, 2013).

O leite materno é também perfeitamente adequado em sua composição de micronutrientes, incluindo: oligossacarídeos, hormônios, imunoglobulina A secretora, lactoferrina, fatores de crescimento, agentes

inflamatórios/anti-inflamatórios e fatores microbianos. (Nascimento & Isster, 2004; Liao et al, 2011; Gao et al, 2012; Ballard & Morrow, 2013).

Dentre os agentes imuno-inflamatórios do leite materno, destacam-se as citocinas, que participam da imunidade inata e adquirida e são produzidas por diversas células em resposta aos estímulos antigênicos e microbianos (Garofalo, 2010; Agarwal et al, 2011).

- Citocinas

Citocinas são glicoproteínas solúveis, sinalizadoras da comunicação inter-celular, atuam de forma autócrina e parácrina, apresentam pleiotropismo (atuação em diferentes células) e compartilham diversas funções entre si. Sua atuação em rede produz uma cascata de efeitos envolvidos na regulação da resposta inflamatória, no desenvolvimento e função do sistema imune (Garofalo, 2010; Passanha, et al 2010; Agarwal et al, 2011; Dangat et al, 2013; Gregory, 2013; Groer et al, 2014).

O papel das citocinas no leite materno não está totalmente esclarecido, mas a presença de grande quantidade de citocinas no colostro sugere a importância das mesmas para o desenvolvimento do recém-nascido, que apresenta graus variáveis de imaturidade estrutural e fisiológica nessa fase da vida (Ustundag et al, 2005; Ballard & Morrow 2013).

As citocinas mais estudadas no leite materno incluem: as interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) e o TNF α (Passanha, et al 2010; Argawal et al, 2011; Groer et al, 2014).

IL-1 β é um mediador pró-inflamatório, envolvido na proliferação, diferenciação e apoptose celular. A concentração de IL-1 β no colostro é muito variável e sua ação não está bem estabelecida, mas parece estar envolvida nos mecanismos de defesa da glândula mamária, incluindo a produção de Imunoglobulina A e outras citocinas (Rautava et al, 2011).

IL-6 é uma importante citocina pró-inflamatória, produzida por queratinócitos, fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e células T. Essa citocina estimula a resposta de fase aguda, a diferenciação das células B e produção de anticorpos pelas mesmas. Níveis variados de IL-6 no leite materno são descritos na literatura, com menores quantidades em mães de prematuros (Agarwal et al, 2011, Castellote et al, 2011, Ustundag et al, 2005; Ballard & Morron, 2013).

IL-8 é uma quimiocina, ou seja, atua como mediador pró-inflamatório e tem a capacidade de recrutar neutrófilos, é produzida por fagócitos e células epiteliais. Além de ser importante componente da imunidade inata e da resposta inflamatória, a IL-8 pode proteger contra lesão induzida pelo TNF- α , tem função fisiológica no desenvolvimento e maturação intestinal, e parece estar envolvida nos mecanismos de proteção anti-infecciosa do leite materno (Maheshwari et al, 2002; Maheshwari et al, 2004; McClenahan et al, 2006; Mehta & Petrova,

2011). Outro papel da IL-8 no leite materno pode estar relacionado à proteção do recém-nascido contra doenças alérgicas, devido à sua forte atividade quimiotática e ativação das células envolvidas em doenças alérgicas. Entretanto, a participação da IL-8 na alergia ainda é controversa. (Zizka et al, 2007; Hua et al, 2016).

É bastante variável a quantidade de IL-8 detectada no leite materno, sendo descritos níveis decrescentes conforme a fase de lactação, e menores valores em leite materno de prematuros (Agarwal et al, 2011, Castellote et al, 2011). Segundo Castellote e colaboradores a IL-8 possui um papel local na maturação do trato gastrointestinal, sendo que a maior quantidade no leite materno de mães de prematuros e a correlação inversa com o peso de nascimento sugerem que a concentração da IL-8 no leite materno é modulada pela necessidade do recém-nascido (Castellote et al, 2011).

IL-10 é mediador primário da resposta anti-inflamatória, produzida por monócitos, mastócitos, células B e T e encontrada em baixa quantidade no leite materno. Essa citocina inibe a resposta inflamatória, induz a produção de anticorpos e favorece o desenvolvimento da imunotolerância (Zizka et al, 2007; Yilmaz et al, 2007; Garofalo, 2010, Agarwal et al, 2011, Castellote et al, 2011, Mehta & Petrova, 2011). Estudo experimental mostrou aumento da expressão da IL-10 no intestino de ratos alimentados com leite de suas mães, o que pode

significar um mecanismo de proteção do leite materno em relação à enterocolite (Dvorak et al, 2003).

IL-12 é uma citocina pró-inflamatória, que atua na proteção contra doenças alérgicas, na rejeição de enxerto e possui ação anti-tumoral. Sua produção ocorre por células dendríticas, macrófagos, monócitos, e células B, sendo estimulada por micróbios ou Interferon- γ . No leite materno os níveis de IL-12 diminuem com o tempo de lactação (Goriely & Goldman, 2008; Garofalo, 2010; Agarwal et al, 2011).

O TNF- α é secretado pelo epitélio mamário e pelos macrófagos do leite materno, está presente em maior quantidade no colostro do que no leite maduro, e participa do mecanismo de defesa contra trauma e infecção. Embora seja uma citocina pró-inflamatória, encontra-se em grande parte ligada a receptores solúveis que a neutralizam. No leite materno o TNF- α tem correlação positiva com outras citocinas pró-inflamatórias (Garofalo, 2010; Agarwal et al, 2011; Ballard & Morrow, 2013).

4. Justificativa do estudo

Já está bem documentada na literatura a diferença na composição de macronutrientes do leite materno em função da idade gestacional, com maior conteúdo de proteínas, lipídios e consequente maior valor

energético no leite de mães de prematuros em comparação aos de termo (Ballard & Morrow, 2013).

Em relação aos níveis de citocinas do leite materno, a influência da idade gestacional ainda é pouco estudada e os resultados são contraditórios. Em 2005, Ustundag e colaboradores documentaram menores quantidades de interleucinas e de TNF- α no colostro e no leite de transição de mães de prematuros em comparação às mães de termo (Ustundag et al, 2005). Recentemente, Collado e colaboradores, mostraram que a idade gestacional influencia na expressão de citocinas no leite materno, com maiores valores nos prematuros e aumento dos níveis com o progredir da lactação, sugerindo os autores que esse poderia ser um mecanismo de proteção anti-inflamatória e anti-infecciosa nos recém-nascidos prematuros (Collado et al, 2015).

A influência da restrição do crescimento intra-uterino na composição do leite materno é ainda menos conhecida e estudada do que a da idade gestacional.

No leite de mães de recém-nascidos de termo não se evidenciou diferença na composição mineral, representada pelas concentrações de cálcio e fósforo, em função da restrição do crescimento intra-uterino (Mataloun & Leone, 2000). Em colostro de mães de prematuros pequenos para a idade gestacional foi documentada menor concentração do fator de crescimento epidérmico em comparação aos adequados, sugerindo que a restrição do crescimento intra-uterino compromete o mecanismo de crescimento dos prematuros (Oslislo et al, 2007).

Considerando que o aleitamento materno é o padrão ouro na alimentação de recém-nascidos, sejam eles de termo ou prematuros, e que a composição de fatores bioativos no colostro em função da idade gestacional e do padrão de crescimento fetal ainda é pouco conhecida, foi proposta a realização desse estudo visando responder a seguinte questão:

O perfil de citocinas no colostro difere em função da idade gestacional e do crescimento fetal?

A hipótese do estudo é que existe diferença significativa nos níveis de citocinas em função desses 2 aspectos.

5. Referências bibliográficas

Adair LS, Fall CHD, Osmond C, Stein AD, Martorell R, Ramirez-Zea M, et al. Associations of linear growth and relative weight gain during early life with adult health and human capital in countries of low and middle income: findings from five birth cohort studies. *Lancet*. 2013; 382: 525-34.

Agarwal S, Karmaus W, Davis S, Gangur V. Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations. *J Hum Lact*. 2011; 27: 171–86.

Anchieta LM, Xavier CC, Colosimo EA. Velocidade de crescimento de recém-nascidos pré-termo adequados para a idade gestacional. *J Pediatr (Rio J)*. 2004; 80: 417-24.

Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev*. 2015; 91: 629-35.

August A, Mueller C, Weaver V, Polanco TA, Walsh ER, Cantorna MT. Nutrients, nuclear receptors, inflammation, immunity lipids, PPAR, and allergic asthma. *J Nutr*. 2006; 136: 695-9.

Ballard O, Morrow AL, Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin N Am*. 2013; 60: 49–74.

Barclay AR, Russell RK, Wilson ML, Gilmour WH, Satsangi J, Wilson DC. Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr*. 2009; 155: 421–6.

Barone G, Maggio L, Saracino A, Perri A, Romagnoli C, Zecca E. How to feed small for gestational age newborns. *Ital J Pediatr*. 2013; 39: 28. doi: 10.1186/1824-7288-39-28.

Bozzetti V, Tagliabue PE, Visser GH, van Bel F, Gazzolo D. Feeding issues in IUGR preterm infants. *Early Hum Dev.* 2013; 89(Suppl 2): S21-3.

Brugman S, Visser JT, Hillebrands JL, Bos NA, Rozing J. Prolonged exclusive breastfeeding reduces autoimmune diabetes incidence and increases regulatory T-cell frequency in bio-breeding diabetes-prone rats. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009; 25: 380-7.

Calder PC, Krauss-Etschmann S, de Jong EC, Dupont C, Frick JS, Frokiaer H, Heinrich J, Garn H, Koletzko S, Lack G, et al. Early nutrition and immunity: progress and perspectives. *Br J Nutr.* 2006; 96: 774–90.

Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Castell M, Moretones MG, et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr* 2011; 141 :1181-7.

Chapman DJ. Human Milk Dose in the First Month Is Inversely Associated with Sepsis and NICU Costs. *J Hum Lact.* 2013; 29: 339-40.

Collado MC, Santaella M, Mira-Pascual L, Martínez-Arias E, Khodayar-Pardo P, Ros G, Martínez-Costa C. Longitudinal study of cytokine expression, lipid profile and neuronal growth factors in human breast milk from term and preterm deliveries. *Nutrients.* 2015; 7: 8577-91.

Corpeleijn WE, Kouwenhoven SM, Paap MC, van Vliet I, Scheerder I, Muizer Y, et al. Intake of own mother's milk during the first days of life is associated with decreased morbidity and mortality in very low birth weight infants during the first 60 days of life. *Neonatology.* 2012;102: 276-81.

Cordero MJA, López AMS, Villar NM, Rodríguez EH, Garcia JL. Efecto de la nutrición sobre el crecimiento y el neurodesarrollo en el recién nacido

prematuro; revisión sistemática. *Nutr Hosp.* 2015; 31: 716-29.

Dangat K, Kilari A, Mehendale S, Lalwani S, Joshi S. Higher levels of brain derived neurotrophic factor but similar nerve growth factor in human milk in women with preeclampsia. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2013; 31: 209–213.

Dorling J, Kempley S, Leaf A. Feeding growth restricted preterm infants with abnormal antenatal Doppler results. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005; 90: 359-63.

Dutta S, Singh B, Chessell L, Wilson J, Janes M, McDonald K, et al. Guidelines for feeding very low birthweight infants. *Nutrients.* 2015; 7: 423-42.

Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Dvorakova K, Dominguez JA, Williams CS, et al. Maternal milk reduces severity of necrotizing enterocolitis and increases intestinal IL-10 in a neonatal rat model. *Pediatr Res.* 2003; 53: 426-33.

Edmond KM, Kirkwood BR, Tawiah CA, Agyei SO. Impact of early infant feeding practices on mortality in low birth weight infants from rural Ghana. *J Perinatol.* 2008; 28: 438-44.

Ehrenkranz RA. Early nutritional support and outcomes in ELBW infants. *Early Hum Dev.* 2010; 86: S21-5.

ESPGHAN Committee on Nutrition: Aggett PJ, Agostoni C, Axelsson I, De Curtis M, Goulet O, Hernell O, et al. Feeding preterm infants after hospital discharge - A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Ped Gastroenterol Nutr.* 2006; 42: 596-603.

Fenton TR, Kim JH. A systematic review and meta-analysis to revise the

Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatr.* 2013; 13: 59. doi: 10.1186/1471-2431-13-59.

Fleith M, Clandinin MT. Dietary PUFA for preterm and term infants: Review of clinical studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005; 45: 205–29.

Garofalo R. Cytokines in human milk. *J Pediatr.* 2010; 156 (Suppl 2): S36–40.

Gao X, McMahon RJ, Woo JG, Davidson BS, Morrow AL, Zhang Q. Temporal changes in milk proteomes reveal developing milk functions. *J Proteome Res.* 2012; 11: 3897–907.

Gibertoni D, Corvaglia L, Vandini S, Rucci P, Savini S, Alessandrini R, et al. Positive effect of human milk feeding during NICU hospitalization on 24 month neurodevelopment of very low birth weight infants: An Italian cohort study. *PLoS ONE* 2015; 10: e0116552. doi:10.1371.

Goriely S, Goldman M. Interleukin-12 family members and the balance between rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant.* 2008;13: 4-9.

Gregory KE. Immunologic factors in human milk and disease prevention in the preterm infant. *Curr Pediatr Rep.* 2013; 1: doi: 10.1007/s40124-013-0028-2.

Groer, M.; Duffy, A.; Morse, S.; Kane, B.; Zaritt, J.; Roberts, S; Ashmeade, T. Cytokines, Chemokines, and Growth Factors in Banked Human Donor Milk for Preterm Infants. *J Hum Lact.* 2014; 30: 317-23.

Hsiao CC, Tsai ML, Chen CC, Lin HC. Early optimal nutrition improves neurodevelopmental outcomes for very preterm infants. *Nutr Rev.* 2014; 72: 532-40.

Henderson JJ, Hartmann PE, Newnham JP, Simmer K. Effect of preterm birth and antenatal corticosteroid treatment on lactogenesis II in women. *Pediatrics*. 2008;121: e92–100.

Hua MC, Chen CC, Yao TC, Tsai MH, Liao SL, Lai SH, et al. Role of maternal allergy on immune markers in colostrum and secretory immunoglobulin a in stools of breastfed infants. *J Hum Lact*. 2016; 32:160-7.

Innis SM. Polyunsaturated fatty acids in human milk: An essential role in infant development. *Adv Exp Med Biol*. 2004; 554: 27–43.

Innis SM. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *Am J Clin Nutr*. 2014; 99: 734S-41S.

Iranpour R, Kelishadi R, Babaie S, Khosravi-Darani K, Farajian S. Comparison of long chain polyunsaturated fatty acid content in human milk in preterm and term deliveries and its correlation with mothers' diet. *J Res Med Sci*. 2013; 18: 1–5.

Konnikova Y, Zaman MM, Makda M, D'Onofrio D, Freedman SD, Martin CR. Late enteral feedings are associated with intestinal inflammation and adverse neonatal outcomes. *PLoS One*. 2015;10: e0132924. doi: 10.1371.

Lapillonne A, Griffin IJ. Feeding preterm infants today for later metabolic and cardiovascular outcomes. *J Pediatr*. 2013; 162 (3 Suppl): S7-16.

Liao Y, Alvarado R, Phinney R, Lönnerdal B. Proteomic characterization of human milk whey proteins during a twelve-month lactation period. *J Proteome Res*. 2011;10: 1746–54.

Maheshwari A, Lu W, Lacson A, Barleycorn AA, Nolan S, Christensen RD, Calhoun DA. Effects of Interleukin-8 on the developing human

intestine. *Cytokine*. 2002; 20: 256–67.

Maheshwari A, Lacson A, Lu W, Fox SE, Barleycorn AA, Christensen RD, Calhoun DA. Interleukin-8/CXCL8 forms an autocrine loop in fetal intestinal mucosa. *Pediatr Res*. 2004; 56: 240–9.

Mataloun MM, Leone CR. Human milk mineral intake and serum concentrations of calcium and phosphorus in newborn term infants: influence of intrauterine growth restriction. *Acta Paediatr*. 2000; 89: 1093-7.

McClenahan D, Krueger R, Lee H-Y, Thomas C, Kehrl JME, Czuprynski C. Interleukin-8 expression by mammary gland endothelial and epithelial cells following experimental mastitis infection with *E. coli*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2006; 29:127-37.

Mehta R, Petrova A. Very preterm gestation and breastmilk cytokine content during the first month of lactation. *Breastfeeding Med*. 2011; 6: 21–4.

Morgan J, Bombell S, McGuire W. Early trophic feeding versus enteral fasting for very preterm or very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; 28;3: CD000504. doi: 10.1002/14651858.

Nascimento MBR, Issler H. Aleitamento materno em prematuros: manejo clínico hospitalar. *J Pediatr. (Rio J)* 2004; 80 (5 Supl): S163-72.

Nommsen-Rivers LA, Dolan LM, Huang B. Timing of stage II lactogenesis is predicted by antenatal metabolic health in a cohort of primiparas. *Breastfeed Med*. 2012; 7: 43–9.

Ong KK, Kennedy K, Castañeda-Gutiérrez E, Forsyth S, Godfrey KM, Koletzko B, et al. Postnatal growth in preterm infants and later health outcomes: a systematic review. *Acta Paediatr*. 2015; 104: 974-86.

Oslislo A, Czuba Z, Sławska H, Kaźmierczak W, Król W. Decreased human milk concentration of epidermal growth factor after preterm delivery of intrauterine growth-restricted newborns. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007; 44: 464-7.

Owen CG, Whincup PH, Cook DG. Breast-feeding and cardiovascular risk factors and outcomes in later life: evidence from epidemiological studies. *Proc Nutr Soc.* 2011; 70: 478-84.

Palmer AC. Nutritionally mediated programming of the developing immune system. *Adv Nutr.* 2011; 2: 377-95.

Pang WW, Hartmann PE. Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2007;12: 211–21.

Passanha, A; Cervato-Mancuso, AM.; Silva MEMP. Elementos protetores do leite materno na prevenção de doenças gastrintestinais e respiratórias. *Rev Bras Cresc Desenv Hum.* 2010; 20: 351-60.

Patel AL, Johnson TJ, Engstrom JL, Fogg LF, Jegier BJ, Bigger HR, Meier PP. Impact of early human milk on sepsis and health-care costs in very low birth weight infants. *J Perinatol.* 2013; 33: 514-9.

Rautava S, Nanthakumar NN, Dubert-Ferrandon A, Lu L, Rautava J, Walker WA. Breast milk-transforming growth factor- β_2 specifically attenuates IL-1 β -induced inflammatory responses in the immature human intestine via an SMAD6- and ERK-dependent mechanism. *Neonatology.* 2011; 99: 192-201.

Ribas-Fitó N, Júlvez J, Torrent M, Grimalt JO, Sunyer J. Beneficial effects of breastfeeding on cognition regardless of DDT concentrations at birth. *Am J Epidemiol.* 2007;166:1198-202.

Rugolo LM. Crescimento e desenvolvimento a longo prazo do prematuro extremo. *J Pediatr. (Rio J)* 2005; 81: S101-10.

Simard JF, Costenbader KH, Hernan MA, Liang MH, Mittleman MA, Karlson EW. Early life factors and adult-onset rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2010; 37: 32–7.

Tackoen M. Breast milk: its nutritional composition and functional properties. *Rev Med Brux.* 2012; 33: 309-17.

Tinoco SM, Sichieri R, Moura AS, Santos F da S, Carmo MD. The importance of essential fatty acids and the effect of trans fatty acids in human milk on fetal and neonatal development. *Cad Saude Publica.* 2007; 23: 525-34.

Turck D. Later effects of breastfeeding practice: the evidence. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.* 2007; 60: 31-9; discussion 39-42.

Underwood MA. Human milk for the premature infant. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60: 189–207.

Ustundag B, Yilmaz E, Dogan Y, Akarsu S, Canatan H, Halifeoglu I, et al. Levels of cytokines (IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. *Mediators Inflamm.* 2005; 6: 331–6.

Vohr BR, Poindexter BB, Dusick AM, McKinley LT, Wright LL, Langer JC, Poole WK; NICHD Neonatal Research Network. Beneficial effects of breast milk in the neonatal intensive care unit on the developmental outcome of extremely low birth weight infants at 18 months of age. *Pediatrics.* 2006; 118: e115-23.

Vohr BR, Poindexter BB, Dusick AM, McKinley LT, Higgins RD, Langer JC, Poole WK; National Institute of Child Health and Human Development

National Research Network. Persistent beneficial effects of breast milk ingested in the neonatal intensive care unit on outcomes of extremely low birth weight infants at 30 months of age. *Pediatrics*. 2007; 120: e953-9.

World Health Organization. WHO – guideline - Optimal feeding of low birthweight infants in low-and middle-income countries. Geneva: World Health Organization; 2011. ISBN-13: 978-92-4-154836-6.

Yilmaz HL, Saygili-Yilmaz ES, Gunesacar R. Interleukin-10 and -12 in human milk at 3 stages of lactation: a longitudinal study. *Adv Ther*. 2007; 24: 603-610.

Young KA, Parrish LA, Zerbe GO, Rewers M, Deane KD, Holers MV, Norris JM. Perinatal and early childhood risk factors associated with rheumatoid factor positivity in a healthy paediatric population. *Ann Rheum Dis*. 2007; 66:179–83.

Zizka JKM, Kverka M, Novotná O, Stanková I, Lodinová-Zádníková R, Kocourková I, et al. Perinatal period cytokines related to increased risk of future allergy development. *Folia Microbiol (Praha)*. 2007; 52: 549-55.

Capítulo 2

Artigo Científico

**Perfil de citocinas no colostro em função da
idade gestacional e do crescimento fetal**

1. Introdução

O aleitamento materno tem sido fortemente recomendado para prematuros devido às propriedades imunológicas do leite materno, seu papel na maturação gastrintestinal, na formação do vínculo mãe-filho^(1,2,3), bem como na menor morbidade^(4,5), melhor prognóstico de crescimento e desenvolvimento⁽⁶⁾ e menor risco de síndrome metabólica na vida adulta⁽⁷⁾ em prematuros que foram amamentados.

O colostro é rico em agentes imuno-inflamatórios incluindo as citocinas, que atuam na regulação da resposta inflamatória, no desenvolvimento e função do sistema imune^(8,9,10). O papel das citocinas no leite materno ainda não está totalmente esclarecido, mas a presença de grande variedade delas no colostro sugere sua importância para o desenvolvimento do recém-nascido^(9,10,11,12).

A idade gestacional influencia na composição de macronutrientes do leite materno⁽¹²⁾, porém seu efeito na quantidade das citocinas ainda é pouco estudado e os resultados são contraditórios^(11,13). A influência do crescimento fetal na composição do leite materno é ainda menos conhecida e estudada do que a da idade gestacional.

Considerando que o aleitamento materno é o padrão ouro na alimentação de todos os recém-nascidos e que o efeito da idade gestacional e do crescimento fetal na composição do leite materno ainda é pouco conhecido, o objetivo deste estudo foi determinar a quantidade

de citocinas no colostro em função da idade gestacional e do crescimento fetal.

2. MÉTODO

Estudo observacional de corte transversal, com mães de recém-nascidos prematuros e de termo, com pesos adequados e pequenos para a idade gestacional, nascidos na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, no período de agosto de 2014 a agosto de 2015.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição e as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram estudadas as mães dos nascidos vivos da Maternidade do serviço que preencheram os seguintes critérios de inclusão: gestação única; sorologias negativas; sem uso de medicamentos ou drogas ilícitas na gestação; ausência de diabetes melitus; recém-nascido com peso adequado ou pequeno para a idade gestacional e sem malformação congênita.

A presença mastite e/ou necessidade de uso contínuo de medicamento pela mãe, bem como a impossibilidade de obtenção de colostro foram critérios de exclusão.

A amostra estudada correspondeu ao número máximo de mães que preencheram os critérios de inclusão no período de estudo. No total 147

mães foram estudadas e distribuídas nos grupos de estudo, obtendo-se com essa amostra um poder do teste maior que 80%.

Foram constituídos 4 grupos de mães, com base na idade gestacional e no crescimento fetal: I- Prematuros pequenos para a idade gestacional (PT-PIG); II- Prematuros adequados para a idade gestacional (PT-AIG); III- Termos pequenos para a idade gestacional (T-PIG); IV- Grupo controle de termos adequados para a idade gestacional (T-AIG).

A idade gestacional foi calculada com base na melhor estimativa obstétrica, sendo considerados prematuros os recém-nascidos com menos que 37 semanas de gestação e de termo aqueles com idade gestacional entre 37 e 41 semanas. Com base na curva de crescimento intra-uterino de Fenton & Kim ⁽¹⁴⁾ os recém-nascidos foram classificados em adequados para a idade gestacional (peso entre os percentís 10-90) e pequenos para a idade gestacional (peso menor que percentil 10).. A restrição do crescimento intra-uterino foi estimada pela razão do crescimento fetal ($RCF = \text{Peso de nascimento} / \text{Peso no percentil 50 para a mesma idade gestacional, na curva de crescimento intra-uterino}^{(14)}$), conforme proposto por Kramer et al ⁽¹⁵⁾. Considerou-se que o recém-nascido teve restrição do crescimento intra-uterino quando $RCF < 0,8$ ⁽¹⁶⁾.

As variáveis independentes do estudo incluíram: dados maternos (idade, escolaridade, medidas antropométricas pré-gestacionais, tabagismo, paridade, intercorrências gestacionais e tipo de parto) e dados do recém-nascido (idade gestacional, sexo, necessidade de reanimação ao nascimento, Apgar de 1º minuto de vida, peso de

nascimento, classificação do peso para a idade gestacional, local de internação, morbidade neonatal e padrão de aleitamento materno).

O desfecho de interesse foi a quantidade de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, e TNF α) no colostro dos 4 grupos de estudo.

Amostras de 3 mL de colostro foram coletadas por ordenha manual entre 24 e 72 horas após o parto, no período da manhã e no intervalo das mamadas. As amostras foram imediatamente congeladas e estocadas a menos 80°C até o momento das dosagens.

As concentrações das interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12) e do TNF α foram determinadas por citometria de fluxo, utilizando o Cytometric Bead Array (CBA) *Human Inflammation kit*, que quantifica as citocinas pelo método de ELISA modificado.

Na análise descritiva da amostra as variáveis contínuas foram apresentadas em tabelas com cálculo de média e desvio padrão, mínimo e máximo; e as variáveis categóricas foram expressas pelo número e proporção de eventos. No estudo das associações entre as variáveis categóricas foi empregado o teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher e na análise das variáveis contínuas o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey. A distribuição Gama foi empregada para controlar a variabilidade dos valores das citocinas.

A força das associações entre as diversas citocinas em cada grupo de estudo foi investigada pela correlação de Pearson.

Em todas as análises o nível de significância foi de 5%.

3. RESULTADOS

Dentre as 259 mães selecionadas no período de agosto de 2014 a agosto de 2015, 201 preencheram os critérios de inclusão, e destas 54 foram excluídas devido à não obtenção do volume necessário de colostro. Assim, foram estudadas amostras de colostro de 147 mães, estratificadas nos 4 grupos: 18 prematuros pequenos para a idade gestacional (PT-PIG); 42 prematuros adequados para a idade gestacional (PT-AIG); 45 termos pequenos para a idade gestacional (T-PIG); e 42 controles (T-AIG).

A idade média materna variou entre 24 e 28 anos. Todas as mães desse estudo realizaram pré-natal, 96% delas tiveram 4 a 11 anos de estudo, 86% tinham relacionamento conjugal estável, 39% eram primigestas, 22% fumantes e rotura prematura de membranas maior que 18 horas ocorreu em apenas 7%. Nenhuma dessas variáveis diferiu entre os grupos.

Os recém-nascidos não diferiram quanto ao gênero. A morbidade neonatal foi baixa e representada basicamente pela Síndrome do Desconforto Respiratório nos prematuros (18%). O aleitamento materno exclusivo predominou nos recém-nascidos de termo (94%) versus 52% nos prematuros. Nos grupos de pequenos para a idade gestacional, 72% dos prematuros e 49% dos termos foram considerados com restrição do crescimento intra-uterino.

A Tabela 1 mostra os principais dados gestacionais, de nascimento

e neonatais dos 4 grupos de estudo.

TABELA 1. Dados maternos, gestacionais, de nascimento e neonatais nos 4 grupos de recém-nascidos (médias e desvio-padrão, mínimo e máximo; número e proporção de eventos)

Variáveis	PT PIG (n=18)	PT AIG (n=42)	T PIG (n=45)	T AIG (n=42)	p
Pré-eclampsia (%)	7 (41)	5 (12)	2 (4)	14 (34)	<0,001
Cesariana (%)	12 (67)	13 (31)	5 (11)	16 (38)	<0,001
Idade gestacional (semanas)	34,2 ± 1,9 30-36	34,0 ± 2,7 25-36	39,3 ± 1,2 37-41	38,9 ± 1,3 37-41	<0,001
Peso nascimento (g)	1775 ± 373 1060-2345	2399 ± 590 800-3520	2667 ± 237 2150-3070	3393 ± 375 2595-3920	<0,001
APGAR 1º minute	7 ± 1 4-9	8 ± 2 1-10	8 ± 1 4-10	8 ± 0,8 6-10	0,030
Reanimação ao nascer (%)	6 (33)	8 (19)	3 (7)	2 (5)	0,009
Seio materno 1ª hora de vida (%)	6 (33)	23 (55)	42 (93)	33 (86)	<0,001
Alojamento conjunto (%)	6 (36)	26 (62)	43 (96)	39 (93)	<0,001
Unidade de cuidados especiais(%)	4 (22)	5 (12)	0 (-)	2 (5)	0,012
Unidade de terapia intensiva (%)	8 (44)	11 (26)	2 (4)	1 (2)	<0,001

PT= Prematuro; T=Termo; PIG= Pequenos para idade gestacional; AIG= Adequado para idade gestacional

A comparação entre os níveis de citocinas no colostro dos 4 grupos de estudo está apresentada na Tabela 2. Destaca-se nessa tabela que o grupo de termos pequenos para a idade gestacional apresentou maiores níveis de IL-1 β e TNF α e menores níveis de IL-6, em comparação aos demais. Não houve diferença significativa nos níveis de citocinas dos grupos de prematuros em comparação aos de termo (Tabela 2).

TABELA 2. Níveis de citocinas no colostro: comparação entre os 4 grupos de recém-nascidos (médias e desvio-padrão; mínimo e máximo)

Variáveis	PT PIG (n=18)	PT AIG (n=42)	T PIG (n=45)	T AIG (n=42)	P
IL-1 β (pg/mL)	36,3 \pm 61,5 9 – 250	26,5 \pm 38,6 9 – 236	50 \pm 143,6 8,5 – 918	25,2 \pm 24,8 4 – 129	0,004
IL-6 (pg/mL)	80,9 \pm 76 9 – 247	83,2 \pm 156,8 16,8 - 897,4	54,9 \pm 55,7 1- 245	75,3 \pm 83,2 7,2 – 350	0,040
IL-8 (ng/mL)	11,6 \pm 11,3 0,08 – 34,2	11,1 \pm 11,1 1,3 – 47,6	9,7 \pm 12,5 2,3 – 45,3	13,5 \pm 12,0 0,09 – 37,0	0,688
IL-10 (pg/mL)	13,9 \pm 8,6 6,5 - 38,4	12 \pm 4,6 6,6 - 30,5	14,8 \pm 12,4 7,3 - 71,8	13,9 \pm 8,5 6,4 - 44,4	0,057
IL-12 (pg/mL)	9,5 \pm 4,4 4,9 - 24,2	8,9 \pm 2,6 6 - 19,2	9,5 \pm 2,7 6,5 - 16,5	8,4 \pm 2 4,4 - 17,5	0,050
TNF- α (pg/mL)	16 \pm 8,3 6,7 - 37,6	15,7 \pm 6,8 7, 1- 36	22,2 \pm 23,6 5,5 - 113,8	15,5 \pm 8,6 5,1 - 41,2	0,005

PT= Prematuro; T=Termo; PIG= Pequenos para idade gestacional; AIG= Adequado para idade gestacional
IL= Interleucina TNF= *Tumour necrosis factor*

A restrição do crescimento intra-uterino (RCIU) teve efeito nas citocinas do colostro apenas nos recém-nascidos de termo, com maiores valores de IL-1 β e IL-12, conforme mostra a Tabela 3.

TABELA 3. Efeito da restrição do crescimento intra-uterino nos níveis de citocinas do colostro das mães de prematuros e de recém-nascidos de termo (médias e desvio-padrão).

Variáveis	PT - RCIU (n= 12)	PT não RCIU (n= 48)	T - RCIU (n= 24)	T não RCIU (n= 63)
IL-1β (pg/mL)	43,3 \pm 71,9 ^a	25,7 \pm 36,7 ^a	71,3 \pm 203,4 ^a	26,6 \pm 27,6 ^b
Valor de p *	<i>p</i> = 0,053		<i>p</i> < 0,001	
IL-6 (pg/mL)	71,2 \pm 75,4 ^a	85,5 \pm 149,7 ^a	55,6 \pm 53,11 ^a	68,1 \pm 76,2 ^a
Valor de p	<i>p</i> =0,553		<i>p</i> = 0,398	
IL-8 (ng/mL)	13,8 \pm 11,7 ^a	10,6 \pm 10,9 ^a	8,3 \pm 9,8 ^a	12,7 \pm 13 ^a
Valor de p	<i>p</i> =0,467		<i>p</i> = 0,237	
IL-10 (pg/mL)	13,7 \pm 8,5 ^a	12,3 \pm 5,3 ^a	15,3 \pm 13,5 ^a	13,9 \pm 9,5 ^a
Valor de p	<i>p</i> =0,491		<i>p</i> = 0,447	
IL-12 (pg/mL)	9,8 \pm 5,1 ^a	8,9 \pm 2,5 ^a	10,4 \pm 2,64 ^a	8,5 \pm 2,2 ^b
Valor de p	<i>p</i> =0,255		<i>p</i>= 0,002	
TNF-α (pg/mL)	17,7 \pm 9,3 ^a	15,3 \pm 6,6 ^a	23,1 \pm 23,45 ^a	17,8 \pm 15,9 ^a
Valor de p	<i>p</i> =0,402		<i>p</i> = 0,058	

PT= Prematuro; T=Termo; RCIU= Restrição de crescimento intra-uterino

IL= Interleucina TNF= *Tumour necrosis factor*

* ANOVA para comparação entre RCIU x não RCIU. Letras diferentes indicam diferença significativa.

Tabela 4 apresenta as correlações entre as citocinas do colostro em cada grupo de estudo. Em mães de prematuros pequenos para a idade gestacional a IL-8 foi a citocina que mais se correlacionou com as demais; enquanto que no grupo dos prematuros adequados para a idade gestacional, foi a IL-10. Nos recém-nascidos de termo pequenos para a idade gestacional todas as citocinas do colostro tiveram correlação entre si, exceto a IL-12 que se correlacionou apenas com o TNF α e a IL-10. Também houve várias correlações entre as citocinas no grupo controle, especialmente a IL-1 β , IL-8 e o TNF α (Tabela 4).

TABELA 4. Correlação entre as citocinas no colostro das mães de recém-nascidos do 4 grupos.

	Grupos	IL – 1 β	IL - 6	IL – 8	IL – 10	IL – 12	TNF α
IL – 1 β	PT-PIG		0,48	0,66*	0,41	0,05	0,39
	PT-AIG		0,48*	0,28	0,76*	0,21	0,46*
	T-PIG		0,63*	0,44*	0,80*	0,30	0,75*
	T-AIG		0,34*	0,59*	0,59*	-0,06	0,44*
IL – 6	PT-PIG			0,50*	-0,003	-0,23	-0,08
	PT-AIG			0,55*	0,33*	0,03	0,09
	T-PIG			0,59*	0,74*	0,04	0,78*
	T-AIG			0,49*	0,27	0,04	0,15
IL – 8	PT-PIG				0,53*	0,27	0,61*
	PT-AIG				0,39*	-0,19	-0,01
	T-PIG				0,64*	0,19	0,78*
	T-AIG				0,51*	-0,15	0,36*
IL – 10	PT-PIG					0,23	0,51*
	PT-AIG					0,30	0,56*
	T-PIG					0,34*	0,80*
	T-AIG					0,22	0,63*
IL-12	PT-PIG						0,79*
	PT-AIG						0,79*
	T-PIG						0,38*
	T-AIG						0,53*

* $p < 0,005$

PT= Prematuro; T=Termo; PIG= Pequenos para idade gestacional;

AIG= Adequado para idade gestacional

IL= Interleucina TNF= *Tumour necrosis factor*

4. DISCUSSÃO

A quantidade de citocinas no leite materno varia conforme a fase da lactação ^(5,9). No presente estudo foi avaliado o colostro, por ser este o alimento mais seguro e recomendado no início da nutrição dos recém-nascidos, especialmente os doentes e os prematuros.

O principal achado desse estudo foi a variabilidade do perfil das citocinas no colostro em função do crescimento fetal e não da idade gestacional, o que ainda é pouco documentado na literatura. Detectamos níveis mais elevados de IL-1 β e TNF α e menor concentração de IL-6 no colostro de mães de recém-nascidos de termo pequenos para a idade gestacional, enquanto que nos prematuros os níveis de citocinas não diferiram em comparação ao grupo controle.

Na interpretação desses achados, duas hipóteses podem ser consideradas para explicar a diferença na quantidade de citocinas no colostro de mães de recém-nascidos de termo pequenos para a idade gestacional: aumento passivo ou mecanismo ativo de imuno proteção do leite materno. Na primeira hipótese os maiores níveis estariam relacionados à causa e/ou fatores de alteração do crescimento fetal, refletindo uma condição adversa intra-utero. Entretanto essa hipótese fica enfraquecida pelo fato de não ter sido detectada diferença na morbidade materna e gestacional entre os grupos estudados. Um mecanismo ativo parece ser o mais provável, no qual o aumento das citocinas no colostro

seria uma adaptação fisiológica frente à vulnerabilidade do trato gastrointestinal desses recém-nascidos, visando protegê-los e compensar suas limitações. Por outro lado, se os níveis de citocinas no colostro refletem um mecanismo ativo e compensatório, é difícil entender porque nos prematuros esse aumento não ocorreu. Uma possibilidade seria que esses mecanismos de proteção desenvolvam-se progressivamente no decorrer da gestação. Novos estudos precisam ser feitos para confirmar essas hipóteses e aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos que modulam a quantidade de citocinas, bem como o significado das mesmas no leite materno.

Tem sido crescente o número de estudos que avaliam citocinas no leite materno, tendo como principal foco a comparação entre as diferentes fases da lactação ⁽¹⁷⁾. Também tem sido estudado o efeito de situações específicas, como a pré-eclampsia, que está associada a maiores níveis de IL-8 e TNF- α no leite maduro ⁽¹⁸⁾. O tabagismo tem influência negativa no sistema imunológico materno e está associado a menores níveis de IL-1b e IL-8 no colostro e de IL-6 no leite maduro ⁽¹⁹⁾. Especial interesse tem se concentrado no efeito da doença alérgica materna sobre os componentes imunológicos do leite materno, bem como no potencial benefício do aleitamento na prevenção de alergia em filhos de mães alérgicas. Níveis aumentados de IL-8 e de IL-10 no colostro de mães alérgicas podem estar relacionados à proteção do recém-nascido, uma vez que a IL-8 tem forte atividade quimiotática e

participa da ativação de células envolvidas em doenças alérgicas ^(20,21) e o aumento da IL-10 pode ser um mecanismo fisiológico de proteção contra asma, uma vez que nessa doença ocorre menor expressão de IL-10 em vias aéreas propiciando resposta inflamatória exacerbada ⁽²²⁾.

O efeito da idade gestacional na composição do leite materno já está bem estabelecido em relação aos macronutrientes, caracterizando maior adequação do leite da própria mãe para o recém-nascido prematuro ⁽¹²⁾, entretanto poucos estudos investigaram a influencia da idade gestacional na quantidade de fatores imunoativos no leite materno. No presente estudo não houve diferença nos valores de citocinas em colostro de mães de prematuros comparados aos termos, enquanto que Castellote e colaboradores encontraram níveis de IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α maiores no colostro de mães de prematuros tardios e menores nos prematuros extremos, comparados aos recém-nascidos de termo ⁽¹⁷⁾. Os autores sugerem que o colostro de mães de prematuros é mais rico em fatores imunes para compensar as limitações desses recém-nascidos e favorecer o desenvolvimento do sistema imune, porém esse mecanismo de defesa parece estar presente somente após 30 semanas de gestação ⁽¹⁷⁾. A grande variabilidade na idade gestacional dos prematuros (25 a 36 semanas) no presente estudo pode ter colaborado para a diferença entre nossos resultados e a literatura.

Não está estabelecido o efeito da idade gestacional nos níveis de IL-1b e IL-12 no colostro, mas os valores encontrados nos prematuros do presente estudo são semelhantes aos da literatura ⁽²³⁾.

A citocina anti-inflamatória IL-10 tem sido descrita em concentrações extremamente divergentes, desde não detectável até valores bastante elevados, o que dificulta a interpretação do seu papel no leite materno, e neste estudo não houve efeito da idade gestacional e do crescimento fetal nessa citocina ^(17,23).

Um aspecto inédito deste estudo foi mostrar a correlação entre as citocinas do colostro nos 4 grupos estudados. Nos recém-nascidos de termo pequenos para a idade gestacional as correlações foram mais fortes e frequentes, sugerindo que as citocinas no colostro tenham um papel fisiológico importante nesse grupo. Interessante que o TNF-a foi a citocina que mais se correlacionou com as demais em todos os grupos estudados. Esses são aspectos que merecem mais investigação em futuros estudos.

Esse estudo tem algumas limitações, como o pequeno número de sujeitos no grupo de prematuros pequenos para a idade gestacional; o delineamento transversal que não permite avaliar a evolução dos recém-nascidos e interpretar o significado clínico dos resultados encontrados. Embora as puérperas estudadas não tivessem diagnóstico de doenças alérgicas, nem causas identificadas para a restrição do crescimento fetal,

não foi realizada investigação mais aprofundada sobre esses aspectos. Entretanto o estudo traz novos conhecimentos, pois focalizou aspectos ainda não investigados e mostrou o efeito do crescimento fetal nas citocinas do colostro, bem como a correlação entre as mesmas; sugerindo que os mecanismos de proteção do leite materno dependem não apenas da quantidade de substâncias imuno-ativas, mas também da interação entre as mesmas.

Frente à escassa literatura disponível sobre esse tema, nossos resultados acrescentam novos dados que motivam a realização de mais estudos para melhor entender os mecanismos fisiológicos envolvidos na imuno proteção do leite materno.

Concluindo, a quantidade de citocinas no colostro variou em função do crescimento fetal, com maiores valores nos recém-nascidos de termos pequenos para a idade gestacional; enquanto que a correlação entre as citocinas foi influenciada pela idade gestacional e crescimento fetal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Gregory KE. Immunologic factors in human milk and disease prevention in the preterm infant. *Curr Pediatr Rep.* 2013; 1(4): doi: 10.1007/s40124-013-0028-2.
- 2- Underwood MA. Human milk for the premature infant. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60: 189–207.
- 3- Gibertoni D, Corvaglia L, Vandini S, Rucci P, Savini S, Alessandrini R, et al. Positive effect of human milk feeding during NICU hospitalization on 24 month neurodevelopment of very low birth weight infants: An Italian cohort study. *PLoS ONE* 2015; 10: e0116552. doi:10.1371.
- 4- Corpeleijn WE, Kouwenhoven SM, Paap MC, van Vliet I, Scheerder I, Muizer Y, et al. Intake of own mother's milk during the first days of life is associated with decreased morbidity and mortality in very low birth weight infants during the first 60 days of life. *Neonatology.* 2012;102: 276-81.
- 5- Patel AL, Johnson TJ, Engstrom JL, Fogg LF, Jegier BJ, Bigger HR, Meier PP. Impact of early human milk on sepsis and health-care costs in very low birth weight infants. *J Perinatol.* 2013; 33: 514-9.
- 6- Vohr BR, Poindexter BB, Dusick AM, McKinley LT, Higgins RD, Langer JC, Poole WK; National Institute of Child Health and Human Development National Research Network. Persistent beneficial effects of breast milk ingested in the neonatal intensive care unit on outcomes of extremely low birth weight infants at 30 months of age. *Pediatrics.* 2007; 120: e953-9.
- 7- Owen CG, Whincup PH, Cook DG. Breast-feeding and cardiovascular risk factors and outcomes in later life: evidence from epidemiological studies. *Proc Nutr Soc.* 2011; 70: 478-84.
- 8- Garofalo R. Cytokines in human milk. *J Pediatr.* 2010; 156 (Suppl 2): S36–40.
- 9- Agarwal S, Karmaus W, Davis S, Gangur V. Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations. *J Hum Lact.* 2011; 27: 171–86.

- 10- Groer, M.; Duffy, A.; Morse, S.; Kane, B.; Zaritt, J.; Roberts, S; Ashmeade, T. Cytokines, Chemokines, and Growth Factors in Banked Human Donor Milk for Preterm Infants. *J Hum Lact.* 2014; 30: 317-23.
- 11- Ustundag B, Yilmaz E, Dogan Y, Akarsu S, Canatan H, Halifeoglu I, et al. Levels of cytokines (IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. *Mediators Inflamm.* 2005; 6: 331–6.
- 12- Ballard O, Morrow AL, Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin N Am.* 2013; 60: 49–74.
- 13- Collado MC, Santaella M, Mira-Pascual L, Martínez-Arias E, Khodayar-Pardo P, Ros G, Martínez-Costa C. Longitudinal study of cytokine expression, lipid profile and neuronal growth factors in human breast milk from term and preterm deliveries. *Nutrients.* 2015; 7: 8577-91.
- 14- Fenton TR, Kim JH. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatr.* 2013; 13: 59. doi: 10.1186/1471-2431-13-59.
- 15- Kramer MS, McLean FH, Olivier M, Willis D, Usher RH. Body proportionality and head and length sparing in growth-retarded neonates: a critical reappraisal. *Pediatrics.* 1989; 84: 717-23.
- 16- Grandi C, Tapia JL, Marshall G; Grupo Colaborativo NEOCOSUR. An assessment of the severity, proportionality and risk of mortality of very low birth weight infants with fetal growth restriction. A multicenter South American analysis. *J Pediatr (Rio J).* 2005; 813:198-204.
- 17- Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Castell M, Moretones MG, et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr* 2011; 141 :1181-7.
- 18- Erbağci AB, Cekmen MB, Balat O, Balat A, Aksoy F, Tarakçioğlu M. Persistency of high proinflammatory cytokine levels from colostrum to mature milk in preeclampsia. *Clin Biochem.* 2005; 38: 712-6.
- 19- Piskin IE, Karavar HN, Araslı M, Ermis B. Effect of maternal smoking on colostrum and breast milk cytokines. *Eur Cytokine Netw.* 2012; 23: 187-90.

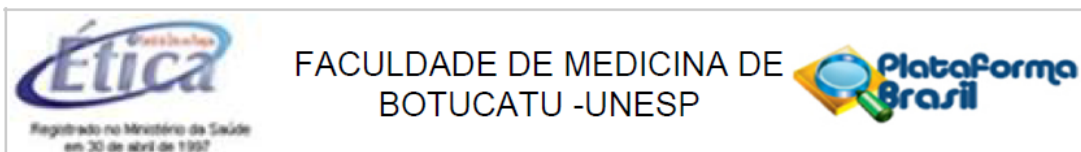
20- Böttcher MF, Jenmalm MC, Garofalo RP, Björkstén B. Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers. *Pediatr Res.* 2000; 47: 157-62.

21- Hua MC, Chen CC, Yao TC, Tsai MH, Liao SL, Lai SH, et al. Role of maternal allergy on immune markers in colostrum and secretory immunoglobulin a in stools of breastfed infants. *J Hum Lact.* 2016; 32:160-7.

22- Rigotti E, Piacentini GL, Ressa M, Pigozzi R, Boner AL, Peroni DG. Transforming growth factor-beta and interleukin-10 in breast milk and development of atopic diseases in infants. *Clin Exp Allergy.* 2006; 36: 614-8.

23- Moles L, Manzano S, Fernández L, Montilla A, Corzo N, Ares S, et al. Bacteriological, biochemical, and immunological properties of colostrum and mature milk from mothers of extremely preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 60:120-6.

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Nutrição e crescimento de recém-nascidos de baixo peso no primeiro ano de vida: Composição do leite materno, perfil nutricional e medidas antropométricas.

Pesquisador: LUIZA TAVARES CARNEIRO SANTIAGO

Área Temática:

Versão:

CAAE: 30989814.0.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 670.629

Data da Relatoria: 02/06/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de mestrado de Luiza Tavares Carneiro Santiago, nutricionista, sob orientação da Profa. Lígia Rúgolo. As autoras pretendem investigar a relação entre a composição do leite materno e a nutrição dos neonatos nascidos prematuros no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. As pesquisadoras informam que ainda se conhece pouco sobre a composição do leite materno em mães de recém-nascidos (RN) prematuros. A questão de pesquisa é se há diferença entre a composição do colostro e do leite maduro entre mães de RN prematuros com peso adequado "versus" baixo para a idade gestacional. Propõe-se um estudo de coorte. Serão incluídas 60 mães e seus respectivos filhos, em casos de parto com 30-36 semanas de gestação e peso do RN entre 1.000 e 2.499g. Serão excluídas gestações gemelares, mães usuárias de drogas e casos de RN com malformações. Os binômios (mãe-RN) serão divididos em dois grupos, de acordo com o peso do RN: adequado à idade gestacional (AIG) e baixo para a idade gestacional. Serão colhidas da mãe amostras do colostro (1o dia após o parto) e leite maduro (4a semana após o parto). Nestas amostras serão aferidas a presença de nutrientes, citocinas, mediadores de stress oxidativo e antioxidantes. Ao mesmo tempo, serão coletados os dados de desenvolvimento e medidas antropométricas usualmente aferidos nos retornos de avaliação do RN no ambulatório de baixo peso. As análises serão descritivas e de associação entre composição do

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

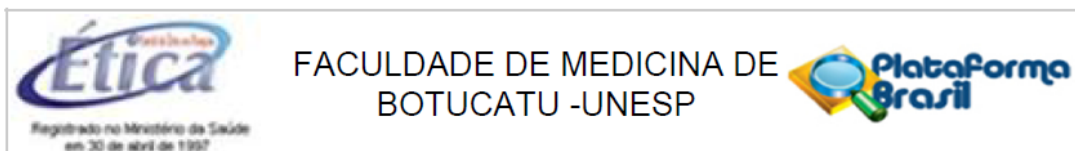
UF: SP

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

Município: BOTUCATU

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP

Continuação do Parecer: 670.629

colostro/leite maduro e desenvolvimento dos recém nascidos.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar diferenças na composição do colostro e do leite materno entre mães de RN prematuros de peso adequado ou baixo para a idade gestacional. Correlacionar essas características com o desenvolvimento antropométrico do RN.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo traz poucos riscos, pois se baseia no seguimento padrão de RN e envolve somente aplicação de questionário e coleta por ordenha de leite e colostro da mãe. Há benefício direto ao RN, caso se identifique déficit nutricional (que poderá ser corrigido). Benefícios indiretos advirão do conhecimento obtido com o estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa bem delineada, sobre tema relevante. Os riscos são pequenos e o benefício potencial importante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos e autorizações necessárias são apresentados. O TCLE está bem redigido, de forma clara, e apesar de conter alguns termos técnicos é, ao meu ver, bastante compreensível pelos sujeitos. Prevê-se o TCLE aplicado para a mãe, com autorização de envolver mãe e RN na pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendo aprovação, sem necessidade de envio a CONEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião do CEP de 02 de Junho de 2.014, sem necessidade de envio à CONEP. O CEP solicita aos pesquisadores que ao final da execução deste projeto seja enviado o Relatório Final de Atividades.

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

ANEXO II – Termo de Outorga FAPESP



Para uso exclusivo da FAPESP Processo: 2014/12784-9 Data impressão: 02/03/2015 08:59:03 Folha: _____ Volume: _____ Rubrica: _____
--

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS

PROCESSO 2014/12784-9

<p>Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, concede ao OUTORGADO, a seguir qualificado, Auxílio para a realização do Projeto de Pesquisa a seguir especificado, nas instalações e com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passam a ser parte integrante deste Termo.</p>	
1.OUTORGADO:	Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo CPF: 925.127.988-87 RG: 5420990-SSP/SP
2.Correspondência:	r. Dr. Cardoso de Almeida - 1000 Ap.62, Centro, Botucatu/SP, CEP 18600-005 ligiasr@fmb.unesp.br
3.Instituição Sede:	Faculdade de Medicina de Botucatu/FMB Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/UNESP
4.Projeto de Pesquisa:	Nutrição e crescimento de recém-nascidos de baixo peso no primeiro mês de vida: Composição do leite materno, perfil nutricional e medidas antropométricas
5.Linha de Fomento:	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
6.Área/Subárea:	Medicina Saúde Materno-Infantil
7.Coordenação:	Saúde I
8.Período da Vigência:	01/03/2015 a 28/02/2017
9.Relatórios Científicos:	28/02/2016, 30/03/2017
10.Prestações de Contas:	28/02/2016, 30/03/2017