



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

Natália Alves de Freitas

**Efeito da pré-eclâmpsia nos níveis de citocinas
do leite materno**

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

Botucatu
2017

Natália Alves de Freitas

Efeito da pré-eclâmpsia nos níveis de citocinas
do leite materno

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
2017

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

Freitas, Natália Alves.

Efeito da pré-eclâmpsia nos níveis de citocinas do leite materno / Natália Alves Freitas. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo

Capes: 40500004

1. Pré-eclâmpsia. 2. Citocinas. 3. Coloostro. 4. Leite humano. 5. Inflamação.

Palavras-chave: Citocinas; Coloostro; Inflamação; Leite materno; Pré-eclâmpsia.

Dedicatória

Aos meus pais Walter e Claudete, por permitir que todos os meus sonhos se tornassem realidade. Muito obrigada pelo seu constante apoio!

À minha irmã Rafaela pela amizade, carinho, companherismo de sempre; por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas e me incentivando. Obrigada!

Ao meu namorado Filipe, por todo o amor, permanecendo ao meu lado, me apoiando e me incentivando a percorrer este caminho. Sem você nenhuma conquista valeria a pena!

Agradecimentos especiais

Primeiramente à Deus, meu porto seguro, por tudo que me proporciona, me fortalecendo e dando forças para não desistiri. Obrigada Senhor!

À minha querida orientadora Dra. Ligia Maria S. S. Rugolo, todo o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transborda sabedoria: meu respeito e admiração pela sua serenidade, por todo carinho e apoio. Muito obrigada pelos ensinamentos compartilhados e por me auxiliar em cada etapa deste trabalho.

Ao Dr. Nilton Carlos Machado e Dr^a. Mary de Assis Carvalho, pelo incentivo e ensinamentos desde o início da minha carreira da pós-graduação na Universidade. Minha eterna gratidão à vocês.

À minha amiga e colega de profissão Luiza Tavares Carneiro Santiago, pelo total apoio e parceria durante todos esses anos e por toda contribuição para realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Cilmerly Suemy Kurokawa, e ao Dr. Leonardo Teixeira Lopes Medeiros e a toda a equipe do laboratório de pediatria experimental pela realização das análises e por todo o apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desta pesquisa. Processo número 2014/12784-9.

Outros agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente, pela análise estatística dos resultados obtidos.

À toda a equipe da Neonatologia, docentes à residentes pela convivência e colaboração em cada etapa da coleta de dados desse trabalho.

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

À toda equipe de Enfermagem do Ambulatório de Pediatria (Natália, Rosa, Silvia, Lurdinha e Aninha) que auxiliaram durante esse 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. Meu muito obrigada, vocês foram fundamentais para a realização deste estudo!

À 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. Pré-eclâmpsia	14
2. Leite materno	17
2.1. Benefícios	17
2.2. Fases da lactação	18
2.3. Imunonutrientes do leite materno	19
2.4. Composição do leite materno na pré-eclâmpsia	19
2.5. Citocinas no leite materno X pré-eclâmpsia	20
3. Justificativa do estudo	21
4. Referências bibliográficas	23

Capítulo 2 – Artigo científico

1. Introdução.....	29
2. Método	31
3. Resultados	34
4. Discussão	43
5. Referências bibliográficas	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados maternos e gestacionais nos grupos: pré-eclâmpsia e normotensas 35
- Tabela 2** - Dados de nascimento nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas 36
- Tabela 3** - Dados neonatais, local de internação e evolução neonatal nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas 37
- Tabela 4** - Valores médios das citocinas no colostro, nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas 38
- Tabela 5** - Valores médios das citocinas no leite maduro, nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas 39
- Tabela 6** - Valores médios das citocinas no colostro, na pré-eclâmpsia precoce e tardia 40
- Tabela 7** - Valores médios das citocinas no leite maduro, na pré-eclâmpsia precoce e tardia 41
- Tabela 8** - Valores médios das citocinas no colostro e no leite maduro, dos grupos pré-eclâmpsia e normotensas 42

RESUMO

INTRODUÇÃO: Na fisiopatologia da pré-eclâmpsia (PE) há importante participação de mediadores inflamatórios, cujas concentrações encontram-se alteradas tanto na placenta como no sangue materno. Entretanto, o efeito da pré-eclâmpsia nos imunocomponentes do leite materno ainda é pouco conhecido. **OBJETIVO:** Investigar se a PE altera os níveis de citocinas no leite materno. **MÉTODO:** Estudo prospectivo longitudinal de corte transversal, envolvendo puérperas cujo parto foi realizado na Maternidade da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em 2014-2016. Critério de inclusão: diagnóstico de PE, gestação única, sorologias negativas, ausência de diabetes e de corioamnionite, sem uso de drogas ilícitas e/ou álcool, recém-nascido sem malformação congênita múltipla. Critério de exclusão: não obtenção da quantidade necessária de colostro, diagnóstico de mastite, uso contínuo de medicamento pela puérpera. Foram estudadas 228 puérperas, divididas em 2 grupos: PE (n=114) e Normotensas (controle, n=114), pareados pela idade gestacional, o grupo PE foi subdividido em PE de início precoce e tardia. O colostro foi coletado entre 24-72 horas pós-nascimento e o leite maduro no final do primeiro mês. Foram dosadas as citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α) por citometria de fluxo. Teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher, teste t Student ou Mann-Whitney, bem como um modelo linear generalizado com distribuição gama foram utilizados para analisar as diferenças entre grupos e as alterações dependentes do tempo. **RESULTADOS:** A maioria das puérperas teve PE tardia (\geq 34 semanas) e a idade gestacional média foi de 36 semanas. No colostro de mães com PE foram detectados níveis aumentados de IL-1 e IL-6, e menores níveis de IL-12 em comparação ao grupo controle. Alterações ocorreram durante a lactação e menores níveis de IL-6 e IL-8 foram encontrados no leite maduro de mães com PE. A PE de início precoce associou-se a valores aumentados de IL-6 no colostro e no leite maduro. **CONCLUSÃO:** A pré-

eclâmpsia está associada com aumento dos níveis de citocinas inflamatórias no colostro e menores níveis de IL-6 e IL-8 no leite maduro. Os níveis de IL-6 no leite materno são maiores na pré-eclâmpsia precoce em comparação à tardia.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia, inflamação, citocinas, leite materno, colostro.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Inflammatory mediators have an important role in the pathophysiology of preeclampsia (PE), and increased levels of these mediators have been found in the placenta and maternal circulation. However, the effect of preeclampsia on immune-components of breast milk is still unknown. **OBJECTIVE:** To investigate whether PE affects breast milk cytokines levels. **METHOD:** Prospective longitudinal cross-sectional study involving nursing mothers with childbirth at Maternity of the Botucatu Medical School - UNESP, during 2014-2016. Inclusion criteria: diagnosis of PE, single gestation, negative serologies, no history of diabetes, chorioamnionitis, drug use or alcohol consumption, and newborn without multiple congenital anomalies. Exclusion criteria: Insufficient volume of colostrum, mastitis, continuous use of medication by the mother. A total of 228 mothers were included and divided into 2 groups: PE (n = 114) and Normotensive (control, n = 114). Groups were matched by gestational age and PE was further divided into early and late PE. Colostrum was collected between 24-72 hours postpartum and mature milk at the end of the first month. 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, Student t-test or Mann-Whitney, and a general linear model with Gamma distribution were used to analyse differences between groups and changes dependent on time. **RESULTS:** Most preeclamptic women had late onset PE (\geq 34 weeks) and the mean gestational age was 36 weeks. In colostrum of PE mothers the levels of IL-1 and IL-6 were significantly increased, whereas IL-12 was decreased, compared to control group. Changes occurred during lactation and lower concentrations of IL-6 and IL-8 were found in mature milk of PE mothers. Early-onset PE was associated with increased IL-6 values in colostrum and mature milk. **CONCLUSION:** Preeclampsia was associated with higher levels of pro-inflammatory cytokines in colostrum and lower

levels of IL-6 and IL-8 in mature milk. The levels of IL-6 in breast milk are increased in early onset PE.

Key-words: Preeclampsia, inflammation, cytokines, breast milk, colostrum.

Capítulo 1

Revisão da Literatura

1. Pré-eclâmpsia

A síndrome hipertensiva da gestação (SHG) é a principal complicação médica da gestação e importante causa de morbidade materna, fetal e neonatal (Ananth e Vintzelios, 2006; Rugolo et al, 2012).

De acordo com National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (2001), a SHG é definida pelos valores de pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg obtidos em 2 aferições com intervalo de pelo menos 4 horas e é classificada em quatro categorias: hipertensão arterial crônica (diagnosticada antes ou durante as primeiras 20 semanas de gestação, ou persistente por 12 semanas após o parto); hipertensão gestacional (detectada após 20 semanas de gestação, sem proteinúria); pré-eclâmpsia (PE) quando a hipertensão arterial é diagnosticada após 20 semanas de gestação e associada com proteinúria (> 300 mg em urina de 24 horas) em mulheres previamente normotensas; e PE sobreposta à hipertensão arterial crônica (quando a proteinúria é diagnosticada em mulheres previamente hipertensas).

Especial atenção tem sido dada à pré-eclâmpsia, por ser a manifestação mais frequente da SHG e também por se associar aos piores resultados maternos e perinatais. Entretanto, Ferrazzani e colaboradores (2011), avaliaram os resultados neonatais nas 4 categorias da SHG em comparação a um grupo controle (normotensas) e documentaram maiores taxas de prematuridade, baixo peso ao nascer e recém-nascidos pequenos para a idade gestacional, bem como piores condições de vitalidade ao nascer e maior tempo de internação nos recém-nascidos de mães hipertensas, independente da classificação da síndrome hipertensiva materna.

Estudo recente no Japão, com uma ampla coorte de base populacional, mostrou que a pré-eclâmpsia teve maior impacto na

mortalidade neonatal de prematuros de muito baixo peso do que a corioamnionite clínica (Tokumasu et al, 2016). Entretanto, ainda precisa ser melhor elucidado qual o papel da doença hipertensiva materna e da prematuridade no prognóstico fetal (Daglar et al, 2016).

Dada a variabilidade nos resultados da literatura sobre as repercussões da pré-eclâmpsia na mãe e no conceito, em 2013, visando uniformizar a terminologia e facilitar a comparação dos resultados entre os estudos a Sociedade Internacional para Estudo da Hipertensão na Gravidez propôs um Consenso com novas definições da pré-eclâmpsia, sendo considerada pré-eclâmpsia grave quando a pressão sistólica for > 160 ou a diastólica > 110 mmHg, independente do valor da proteinúria. A presença de Síndrome HELLP é critério de gravidade e a pré-eclâmpsia deve ser definida como de início precoce quando manifesta antes de 34 semanas de gestação (Tranquilli, 2013). Assim, nos últimos anos, tanto na prática clínica como nas pesquisas, a pré-eclâmpsia tem sido classificada conforme o tempo de início da doença: precoce (< 34 semanas de gestação) e tardia (a partir de 34 semanas), sendo essas formas da doença consideradas como duas entidades distintas, com diferentes mecanismos fisiopatológicos e manifestações heterogêneas (Daglar et al, 2016; Khodzhaeva et al, 2016; Liang et al, 2016).

Em estudo com placentas de gestantes com pré-eclâmpsia foram comparadas as alterações histológicas, as concentrações de citocinas e de fatores angiogênicos na pré-eclâmpsia precoce, tardia e em gestantes normotensas. Alterações mais intensas foram detectadas na pré-eclâmpsia precoce, sugerindo maior comprometimento placentário nessa forma da doença e piores repercussões fetais, com maior grau de restrição do crescimento fetal e maior morbimortalidade fetal e neonatal (Ni et al, 2016; Weel et al, 2016).

A etiologia da pré-eclâmpsia não é conhecida e sua fisiopatologia ainda não está totalmente esclarecida, sendo sugerido que fatores genéticos, imunológicos, inflamatórios e ambientais estejam envolvidos (Shah & Khalil, 2015). Polimorfismos genéticos e resposta imune materna alterada podem comprometer o remodelamento das arteríolas espiraladas e prejudicar a invasão do citotrofoblasto na decídua, causando inadequada perfusão uteroplacentária com áreas de isquemia/hipóxia na placenta. A isquemia/hipóxia placentária associa-se com a liberação de vários fatores vasoativos, em especial as citocinas pró-inflamatórias, mas também fatores anti-angiogênicos e espécies reativas de oxigênio que culminam na lesão e disfunção endotelial, com aumento da resistência vascular, hipertensão e manifestações sistêmicas maternas. Assim, a inadequada placentação é considerada o evento desencadeante da pré-eclâmpsia (Raghupathy, 2013; Shah e Khalil, 2015).

Há que se considerar que a placentação normal envolve mecanismos imune/inflamatórios que causam uma leve resposta inflamatória decidual e promovem a infiltração das arteríolas espiraladas; enquanto que na pré-eclâmpsia essa resposta inflamatória é exacerbada propiciando intensa resposta inflamatória sistêmica materna associada à disfunção endotelial e ativação leucocitária (Shah e Khalil, 2015). Assim, a pré-eclâmpsia pode ser considerada uma doença de dois estágios: inicia-se com os eventos placentários que são silenciosos, seguindo-se excessiva resposta inflamatória e desequilíbrio angiogênico que promovem disfunção endotelial generalizada, responsável pelas manifestações sistêmicas (Ramma e Ahmed, 2011; Verdonk et al, 2015; Saleh et al, 2016).

Estudos recentes têm enfatizado a importância do desbalanço imune na pré-eclâmpsia, caracterizado como predomínio do perfil Th1, com aumento das células T pró-inflamatórias e diminuição das células T

regulatórias, propiciando uma condição de inflamação crônica na gestante (Ferguson et al, 2016; Harmon et al, 2016).

O aumento de citocinas pró-inflamatórias na pré-eclâmpsia tem sido documentado não apenas na circulação materna, mas também em sangue de cordão umbilical, embora o significado dessas alterações na morbidade neonatal dos recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia ainda não esteja estabelecido (Tosun et al, 2010; Catarino et al, 2012).

2. Leite materno

2.1. Benefícios

Já está bem documentado na literatura que a nutrição no início da vida tem importantes repercussões no longo prazo, e que o leite materno é o alimento ideal para todos os recém-nascidos (WHO, 2011), com base em suas propriedades imunológicas; seu papel na maturação gastrointestinal, na formação do vínculo mãe-filho, no melhor prognóstico de crescimento e desenvolvimento, bem como pelos benefícios maternos, incluindo prevenção de câncer e de diabetes (Gregory, 2013; Underwood, 2013; Gibertoni et al, 2015; Victora et al, 2016).

Além de propiciar imunoproteção passiva, o leite materno fornece vários imunonutrientes e fatores de crescimento, que melhoram a barreira intestinal e a função imune do recém-nascido, com a diminuição da permeabilidade a macromoléculas, redução da translocação bacteriana e da captação de endotoxinas (Tackoen, 2012). Vários estudos mostram menor incidência de doenças neonatais graves como enterocolite necrosante e infecção/sepsis (Chapman, 2013; Patel et al, 2013), bem como benefícios no médio e longo prazo, incluindo 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).

Estudos recentes permitem aprofundar a interpretação dos benefícios do leite materno, sugerindo a existência de um eixo entero-mamário, no qual células dendríticas intestinais captam bactérias do lúmen e transportam para os folículos linfóides intestinais estimulando as células T e B. A seguir, as células dendríticas e os linfócitos entram na circulação materna e através da interação com receptores são captadas pela glândula mamária e fazem parte da composição do leite materno. Desse modo, o leite materno estimula o desenvolvimento imune do recém-nascido de forma específica, conforme o microbioma materno (Victoria et al, 2016).

2.2. Fases da lactação

A lactação é constituída por três 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).

2.3. Imunonutrientes no leite materno

Dentre os agentes imunonutrientes do leite materno, destacam-se as citocinas, glicoproteínas solúveis, sinalizadoras da comunicação intercelular, que 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)

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 . A maioria delas é sintetizada na glândula mamária e reflete a experiência imune materna (Passanha, et al 2010; Argawal et al, 2011; Groer et al, 2014).

2.4. Composição do leite materno na pré-eclâmpsia

Alguns componentes do leite materno são provenientes da dieta e outros são sintetizados na glândula mamária. Dessa forma, a nutrição materna e o desenvolvimento da glândula mamária influenciam na lactogênese.

O desenvolvimento da glândula mamária ocorre predominantemente durante a gestação, sendo esse o período de maior desenvolvimento do epitélio mamário. A proliferação e diferenciação epitelial são estimuladas por hormônios e por citocinas durante a gestação, propiciando o desenvolvimento de uma nova linhagem epitelial: as células alveolares, que estão envolvidas na produção do leite (Watson et al, 2011).

Na pré-eclâmpsia, um importante mecanismo fisiopatológico é a alteração da angiogênese no organismo materno e essa alteração pode comprometer o desenvolvimento da glândula mamária. Assim, é possível que a composição do leite materno seja alterada em função da pré-eclâmpsia (Molvarec et al, 2010).

Na pré-eclâmpsia foram documentadas maiores concentrações do ácido graxo poliinsaturado docosahexaenóico no colostro e no leite materno (Dangat et al, 2014). Estudo recente, *in vitro*, avaliou a composição metabólica do leite materno na pré-eclâmpsia e não mostrou diferença nos teores de açúcares, aminoácidos, lipídios e outros metabólitos no colostro, entretanto, aos 6 meses de lactação foram detectados menores valores desses componentes (Dangat et al, 2016).

2.5. Citocinas no leite materno X Pré-eclâmpsia

Citocinas são glicoproteínas solúveis, sinalizadoras da comunicação intercelular, 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 (Passanha, et al 2010;

Garofalo, 2010; Agarwal et al, 2011; Dangat et al, 2013; Gregory, 2013; Groer et al, 2014).

Um aspecto pouco elucidado na pré-eclâmpsia e que desperta interesse é o possível efeito da inflamação sistêmica exacerbada em nível de glândula mamária e conseqüentemente na composição do leite materno.

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

Apenas um estudo pequeno, investigou as concentrações de citocinas no colostro e no leite maduro de 15 mulheres com pré-eclâmpsia e 15 controles. Não foram encontradas diferenças no colostro, porém a quantidade de citocinas pró-inflamatórias diminuiu no leite maduro do grupo controle e permaneceu inalterada no grupo pré-eclâmpsia sugerindo os autores que isso possa traduzir a persistência da resposta inflamatória materna (Erbagci et al, 2005).

3. Justificativa do estudo

Até o momento, os estudos sobre a composição do leite materno de mães com pré-eclâmpsia ainda são escassos, com casuística pequena e resultados inconclusivos.

Assim, considerando que o aleitamento materno é o padrão ouro na alimentação de recém-nascidos, que a composição do leite materno

de mães com pré-eclâmpsia ainda é pouco conhecida, foi proposta a realização deste estudo visando responder as seguintes questões:

- A pré-eclâmpsia altera a quantidade de citocinas do leite materno?

- Há diferença entre a pré-eclâmpsia precoce e a tardia?

A hipótese do estudo é que existe diferença significativa nas quantidades de citocinas do colostro e leite maduro de puérperas com pré-eclâmpsia *versus* as normotensas, e as maiores alterações provavelmente ocorrem na pré-eclâmpsia precoce.

4. Referências bibliográficas

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.

Ananth CV, Vintzileos AM. Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2006 Dec;19(12):773-82.

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

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

Catarino C, Silva AS, Belo L, Pereira PR, Rocha S, Patrício B, Quintanilha A, Rebelo I. Inflammatory Disturbances in Preeclampsia: Relationship between Maternal and Umbilical Cord Blood. *J Pregnancy.* 2012; 2012: 684384. Published online 2012 May 23. doi: 10.1155/2012/684384.

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

Daglar K, Kirbas A, Timur H, Ozturk Inal Z, Danisman N. Placental levels of total oxidative and anti-oxidative status, ADAMTS-12 and decorin in early- and late-onset severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016; 29: 4059-64.

Dangat K, Kilari A, Mehendale S, Lalwani S, Joshi S. Preeclampsia alters milk neurotrophins and long chain polyunsaturated fatty acids. *Int J Dev Neurosci.* 2014; 33: 115-21.

Dangat K, Upadhyay D, Kilari A, Sharma U, Kemse N, Mehendale S, Lalwani S, Wagh G, Joshi S, Jagannathan N. Altered breast milk components in preeclampsia: An in-vitro proton NMR spectroscopy study. *Clinica Chimica Acta.* 2016; 463: 75-83.

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.

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.

Erbagci AB, Cekmen MB, Balat O, Balat A, Aksoy F, Tarakçioğlu. Persistency of high proinflammatory cytokine levels from colostrums to mature milk in preeclampsia. *Clin Biochem*. 2005; 38: 712-16.

Ferrazzani S, Luciano R, Garofalo S, et al. Neonatal outcome in hypertensive disorders of pregnancy. *Early Hum Dev*. 2011; 87: 445–9.

Ferguson KK, Meeker JD, McElrath TF, Mukherjee B, Cantonwine DE. Repeated measures of inflammation and oxidative stress biomarkers in preeclamptic and normotensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Dec 30. pii: S0002-9378(16)46465-3. doi: 10.1016/j.ajog. 2016.12.174.

Garofalo R. Cytokines in Human Milk. *Pediatr*. 2010; 156 (2Suppl): S36-40

Gibertoni D, Corvaglia L, Vandini S, Rucci P, Savini S, Alessandroni R, Sansavini S, Fantini MP, Faldella G. 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* | DOI:10.1371/journal.pone.0116552 January 15, 2015.

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* published online 24 March 2014.

Harmon AC, Cornelius DC, Amaral LM, Faulkner JL, Cunningham MW Jr, Wallace K, LaMarca B. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin Sci (Lond)*. 2016 Mar;130(6):409-19. doi: 10.1042/CS20150702.

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

Khodzhaeva ZS, Kogan YA, Shmakov RG, Klimenchenko NI, Akatyeva AS, Vavina OV, Kholin AM, Muminova KT, Sukhikh GT. Clinical and pathogenetic features of early- and late-onset pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016 ; 29: 2980-6.

Liang M, Niu J, Zhang L, Deng H, Ma J, Zhou W, Duan D, Zhou Y, Xu H, Chen L. Gene expression profiling reveals different molecular patterns in G-protein coupled receptor signaling pathways between early- and late-onset preeclampsia. *Placenta*. 2016; 40: 52-9.

Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Szucs E, Nagy B, Rigó J Jr. Circulating angiogenic factors determined by electrochemiluminescence immunoassay in relation to the clinical features and laboratory parameters in women with pre-eclampsia. *Hypertens Res*. 2010; 33: 892-8.

National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program working group on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183 (suppl 1): S1–S22.

Ni Y, Cheng W. Comparison of indications of pregnancy termination and prognosis of mothers and neonates in early- and late-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2016; 35: 315-22.

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.

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.

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: 514-19.

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

Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract*. 2013; 22 (Suppl 1): 8-19.

Ramma W, Ahmed A. Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans*. 2011 Dec;39(6):1619-27. doi: 10.1042/BST20110672.

Rugolo LMSS, Bentlin MR, Trindade CEP. Preeclampsia: Early and Late Neonatal Outcomes. *Neoreviews*. 2012; 13: e532-41.

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.

Saleh L, Verdonk K, Visser W, van den Meiracker AH, Danser AH. The emerging role of endothelin-1 in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Thromb Haemostasis*. 2016 Oct;10(5):282-93. doi: 10.1177/1753944715624853. Epub 2016 Jan 10.

Shah DA, Khalil RA. Bioactive factors in uteroplacental and systemic circulation link placental ischemia to generalized vascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. *Biochem Pharmacol*. 2015; 95: 211-26.

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

Tokumasu H, Tokumasu S, Kawakami K. Impact of pre-eclampsia in extremely premature infants: Population-based study. *Pediatr Int*. 2016; 58: 578-83.

Tosun M, Celik H, Avci B, Yavuz E, Alper T, Malatyalioglu E. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010 Aug;23(8):880-6. doi: 10.3109/14767051003774942.

Tranquilli AL. Introduction to ISSHP new classification of preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2013; 3: 58-9.

Underwood MA. Human Milk for the Premature Infant. *Pediatr Clin N Am* 2013; 60: 189–207.

Ustundag B, Yilmaz E, Dogan Y, Akarsu S, Canatan H, Halifeoglu I, Cikim G, 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: 331–36.

Victora CG, Bahl R, Barros AJD, França GVA, Horton S, Krasevec J, Murch S, Sankar MJ, Walker N, Rollins NC. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Breastfeeding 1, for The Lancet Breastfeeding Series Group**. *Lancet* 2016; 387: 475–90.

Verdonk K, Saleh L, Lankhorst S, Smilde JE, van Ingen MM, Garrelds IM,

Friesema EC, Russcher H, van den Meiracker AH, Visser W, Danser AH. Association studies suggest a key role for endothelin-1 in the pathogenesis of preeclampsia and the accompanying renin-angiotensin-aldosterone system suppression. *Hypertension*. 2015 Jun;65(6):1316-23. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05267. Epub 2015 Apr 13.

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: e953-59.

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.

Watson CJ and Kreuzaler PA. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int. J Dev Biol.*2011; 55: 757-62

Weel IC, Baergen RN, Veiga MR, Borges VT, Ribeiro VR, Witkin SS, Castro CB, Peraçoli JC, Oliveira L, Peraçoli MT. Association between Placental Lesions, Cytokines and Angiogenic Factors in Pregnant Women with Preeclampsia. *PLOS ONE* 2016; 11:e0157584. doi: 0.1371.

World Health Organization. WHO – Guideline on optimal feeding of low birthweight infants in low-and middle-income countries. Number of pages: 60, Publication date: 2011, Languages: English, ISBN: 978 92 4 154836 6.

Capítulo 2

Artigo Científico

**Efeito da pré-eclâmpsia nos níveis de
citocinas do leite materno**

1. Introdução

Os distúrbios hipertensivos incidem em 5-10% das gestações, constituem a principal complicação médica gestacional e uma causa importante de morbidade materna, fetal e neonatal ⁽¹⁾.

A pré-eclâmpsia é a manifestação mais frequente da síndrome hipertensiva gestacional, correspondendo a cerca de 50% dos casos ⁽²⁾. Essa é uma doença complexa, de manifestação variável e atualmente definida como de início precoce quando se manifesta antes de 34 semanas e tardia a partir a 34^a semana de gestação ⁽³⁾.

A fisiopatologia da pré-eclâmpsia não está totalmente esclarecida. Sabe-se que sua origem envolve mecanismos imunológicos e o evento fundamental é a inadequada placentação entre 8-18 semanas de gestação, com diminuição do fluxo sanguíneo uteroplacentário e isquemia/hipoxia placentária. Essa condição de isquemia/hipóxia propicia a ocorrência de estresse oxidativo, liberação de citocinas inflamatórias e fatores anti-angiogênicos resultando em disfunção endotelial e resposta inflamatória sistêmica na gestante, eventos esses responsáveis pelas manifestações clínicas da doença materna ^(4,5,6).

Estudos recentes têm enfatizado a importância do desbalanço imune na pré-eclâmpsia, caracterizado como redomínio do perfil Th1, com aumento das células T pró-inflamatórias e diminuição das células T regulatórias, propiciando uma condição de inflamação crônica na gestante ^(7,8).

O aumento de citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia tem sido documentado não apenas na circulação materna, mas também em sangue de cordão umbilical, embora o significado dessas alterações na

morbidade neonatal dos recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia ainda não esteja estabelecido ^(9,10).

Um aspecto pouco elucidado na pré-eclâmpsia e que desperta interesse é o possível efeito da inflamação sistêmica exacerbada em nível de glândula mamária e conseqüentemente na composição do leite materno. Dentre os diversos imunocomponentes do leite materno encontram-se os leucócitos e várias citocinas, muitas das quais são sintetizadas na glândula mamária e outras produzidas pelas células presentes no leite ⁽¹¹⁾.

Em algumas doenças maternas foram documentadas diferenças no perfil de citocinas do leite materno, seja em mulheres asmáticas ⁽¹²⁾, bem como nas diabéticas ⁽¹³⁾. Especificamente em relação à pré-eclâmpsia, apenas um estudo pequeno, investigou as concentrações no colostro e no leite maduro e não encontrou diferenças no colostro, porém a quantidade de citocinas inflamatórias diminuiu no leite maduro do grupo controle e permaneceu inalterada no grupo pré-eclâmpsia ⁽²²⁾.

Considerando que o aleitamento materno é o padrão ouro na nutrição de todos os recém-nascidos e que estudos sobre a composição do leite materno na pré-eclâmpsia são escassos, com casuística pequena e resultados inconclusivos, foi proposta a realização deste estudo para responder as seguintes questões:

- 1) A pré-eclâmpsia altera os níveis de citocinas do leite materno?
- 2) Há diferença entre a pré-eclâmpsia de início precoce e tardio?

O objetivo deste estudo foi investigar se a pré-eclâmpsia altera os níveis de citocinas no colostro e no leite maduro.

2. MÉTODO

Estudo prospectivo longitudinal de corte transversal, envolvendo puérperas cujo parto foi realizado na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, no período de julho de 2014 a junho de 2016.

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

A pesquisa teve apoio financeiro da FAPESP (Proc. 2014/12784-9).

Foram estudadas as puérperas dos recém-nascidos vivos da Maternidade do serviço que preencheram os seguintes critérios de inclusão: diagnóstico de pré-eclâmpsia realizado no serviço; gestação única; sorologias negativas; ausência de diabetes mellitus e de corioamnionite; sem uso de medicamentos ou drogas ilícitas na gestação; recém-nascido sem malformação congênita múltipla.

O grupo controle foi constituído por puérperas normotensas que preencheram os mesmos critérios de inclusão e foram rigorosamente pareadas pela idade gestacional.

Foram excluídos os casos em que não foi possível obter a quantidade mínima necessária de colostro; presença de mastite; necessidade de uso contínuo de medicamento pela puérpera.

A amostra estudada correspondeu ao número máximo de puérperas que preencheram os critérios de inclusão e concordaram em participar da pesquisa.

As variáveis independentes do estudo incluíram: dados maternos

(idade, escolaridade, medidas antropométricas pré-gestacionais, tabagismo, paridade, intercorrências gestacionais, uso de corticóide antenatal, gravidade da pré-eclâmpsia e tipo de parto). Dados neonatais: idade gestacional (calculada pela melhor estimativa obstétrica, preferencialmente o ultrassom precoce, seguido pela data precisa da última menstruação); sexo; reanimação ao nascimento (necessidade de ventilação com pressão positiva); Apgar de 1º e 5º minuto de vida; medidas antropométricas ao nascimento; adequação do peso para a idade gestacional conforme a curva de crescimento intrauterino de Fenton ⁽¹⁵⁾, sendo considerado adequado quando peso entre os percentis 10 e 90; local e tempo de internação; perda de peso nos primeiros dias e morbidade neonatal.

A pré-eclâmpsia foi definida pela presença de hipertensão (pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg) associada à proteinúria (> 300 mg/urina de 24 horas), detectada após a 20ª semana em mulher previamente normotensa ⁽¹⁶⁾ e foi classificada em precoce quando sua manifestação ocorreu antes de 34 semanas e tardia a partir de 34 semanas de gestação ⁽³⁾.

O desfecho de interesse foi a concentração de interleucinas: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, e TNF α no leite materno dos grupos: pré-eclâmpsia versus normotensas, bem como nos sub-grupos de pré-eclâmpsia: Precoce versus Tardia.

A concentração de citocinas no leite materno foi avaliada em dois momentos após o nascimento: primeiras 72 horas (coloostro) e ao final do primeiro mês (leite maduro). A coleta foi realizada no período da manhã, no intervalo das mamadas, de acordo com as técnicas preconizadas pela Rede Nacional de Banco de Leite Humano (<http://www.redeblh.fiocruz.br/>).

As amostras foram aliquotadas em criotubos de 1 mL cada, e congeladas em temperatura de menos 80°C até o momento das dosagens, que foram realizadas no laboratório de Pesquisa Experimental (UNIPEX) do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, pela pesquisadora junto com técnicos da UNIPEX.

As concentrações de 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. A captura da proteína recombinante – citocinas, contida nas amostras do colostro ocorre por anticorpos monoclonais aderidos às partículas (*beads*), ou seja, a reação de ELISA ocorre sobre partículas sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina. Esse método tem boa sensibilidade, precisão e reprodutibilidade, com coeficientes de variação intra-ensaio de 2 a 10% e inter-ensaio de 4 a 13%.

Na análise descritiva da amostra as variáveis contínuas foram apresentadas em tabelas com cálculo de média e desvio padrão ou mediana e percentís. Média foi utilizada para variáveis com distribuição simétrica e a mediana para variáveis com distribuição assimétrica; as variáveis categóricas foram expressas pelo número e proporção de eventos. O teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher foi empregado para avaliar as associações entre variáveis categorias e na análise das variáveis contínuas, utilizou-se o teste t de Student ou Mann-Whitney. A distribuição Gama foi empregada para controlar a variabilidade dos valores das citocinas.

Na comparação entre os valores das citocinas no colostro e no leite maduro foi usado o teste t pareado.

Para avaliar o efeito de grupo (pré-eclâmpsia X normotensas) e a interação com o tempo (coloostro X leite maduro), foi construído um modelo linear generalizado com distribuição Gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald e ajustado para possíveis variáveis confundidoras detectadas na análise univariada.

As análises foram realizadas com o Programa SAS 9.3 e nível de significância em 5%.

3. RESULTADOS

No período de julho de 2014 a junho de 2016, 305 puérperas foram selecionadas, porém 35 não foram incluídas porque não concordaram em participar, e 42 foram excluídas devido à não obtenção do volume mínimo necessário de coloostro (um mL). Assim, foram estudadas amostras de leite materno de 228 puérperas, sendo 114 com pré-eclâmpsia (19% de início precoce e 81% tardia) e 114 normotensas (controle), pareadas pela idade gestacional.

O coloostro foi obtido das 228 puérperas, entretanto 50% das puérperas não retornaram ao final do primeiro mês, motivo pelo qual foi possível obter apenas 117 amostras de leite maduro (49 no grupo pré-eclâmpsia e 68 no grupo controle).

Dentre as 228 puérperas estudadas 99% realizaram o controle pré-natal, 88,5% tinham relacionamento conjugal estável e 34% eram primigestas, sem diferenças entre os grupos.

Os principais dados maternos e gestacionais estão apresentados na tabela 1, onde se destaca a maior adiposidade materna e maior frequência de cesariana no grupo pré-eclâmpsia, enquanto que o

percentual de bolsa rota maior que 18 horas e de tabagismo foi mais elevado nas normotensas.

Tabela 1. Dados maternos e gestacionais nos grupos: pré-eclâmpsia e normotensas

Variáveis		Pré-eclâmpsia	Normotensas	P
		n=114	n=114	Valor
Idade (anos)*	X ± DP	26,4 ± 7	24,4 ± 5,8	0,019
Peso prévio (kg)*	X ± DP	75,1 ± 18,8	63,2 ± 14,2	<0,001
Estatutura (m)*	X ± DP	1,60 ± 0,06	1,60 ± 0,07	0,439
IMC (kg/m ²)*	X ± DP	29,4 ± 6,7	24,8 ± 5,3	<0,001
Primigesta**	n (%)	39 (34%)	38 (33%)	0,888
União estável**	n (%)	99 (87%)	103 (91%)	0,395
Escolaridade > 8 anos**	n (%)	77 (67%)	67 (58%)	0,217
Procedência – Botucatu**	n (%)	42 (37%)	78 (68,5%)	<0,001
Tabagismo**	n (%)	8 (7%)	21 (18,5%)	0,017
Bolsa rota > 18h**	n (%)	7 (6%)	21 (19%)	0,009
Corticóide antenatal**	n (%)	15 (14%)	14 (13%)	1,000
Restrição crescimento fetal**	n (%)	21 (18%)	15 (13%)	0,364
Sofrimento fetal**	n (%)	7 (6%)	7 (6%)	0,783
Parto cesáreo**	n (%)	68 (60%)	30 (26%)	0,001

*Teste t **Qui-quadrado

IMC = Índice de massa corporal

A tabela 2 apresenta as principais características do nascimento, onde se observa que não houve diferença significativa entre os 2 grupos de estudo. A idade gestacional variou de 26 a 41 semanas, destacando-se que 64% dos recém-nascidos foram de termo.

Tabela 2. Dados de nascimento nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas

Variáveis		Pré-eclâmpsia	Normotensas	P
		n=114	n=114	Valor
Idade gestacional (semanas)*	X ± DP	36 ± 3	36 ± 3	0,686
Peso nascimento (g)*	X ± DP	2801 ± 912	2782 ± 710	0,865
Comprimento (cm)*	X ± DP	46,0 ± 4,6	46,5 ± 3,6	0,525
Perímetro cefálico (cm) *	X ± DP	33,0 ± 3,0	33,0 ± 2,5	0,972
IMC ao nascimento*	X ± DP	12,2 ± 2,9	12,0 ± 1,7	0,570
Pequeno para idade gestacional**	n (%)	22 (19%)	26 (23%)	0,626
Sexo feminino**	n (%)	51 (45%)	53 (46%)	0,894
VPP ao nascer***	n (%)	18 (16%)	12 (10%)	0,327
Apgar 1º minuto ≤ 3***	n (%)	4 (3,5%)	2 (2%)	0,679
Apgar 1º minuto ≥ 7***	n (%)	95 (83%)	100 (88%)	0,451
BSA ≥ 4***	n (%)	22 (19%)	13 (11%)	0,142
CPAP em sala de parto***	n (%)	22 (19%)	14(12%)	0,202

*Teste t **Qui-quadrado ***Exato de Fisher

CPAP = Continuous positive airway pressure via nasal – pressão contínua positiva de vias aéreas

VPP = Ventilação com pressão positiva

A Tabela 3 mostra os principais dados da evolução e da assistência neonatal. Verifica-se nessa tabela que nos 2 grupos de estudo a morbidade neonatal foi baixa, e a maioria dos recém-nascidos permaneceu em alojamento conjunto por um período menor ou igual a 72 horas. A única diferença significativa entre os grupos foi o maior percentual de perda de peso nas primeiras 72 horas de vida nos filhos de mãe com pré-eclâmpsia (Tabela 3).

Tabela 3. Dados neonatais, local de internação e evolução neonatal nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas

Variáveis		Pré-eclâmpsia	Normotensas	P
		n=114	n=114	Valor
Seio materno (1 ^a hora de vida)**	n (%)	73 (65%)	86 (75%)	0,102
Alojamento conjunto**	n (%)	76 (68%)	90 (79%)	0,082
Unidade de Terapia Intensiva neonatal**	n (%)	19 (17%)	16 (14%)	0,713
Síndrome Desconforto Respiratório**	n (%)	13 (11%)	7 (6%)	0,242
Síndrome do Pulmão Úmido**	n (%)	6 (5%)	3 (3%)	0,496
Ventilação Mecânica**	n (%)	8 (7%)	4 (3,5%)	0,374
CPAP nasal**	n (%)	15 (13%)	12 (10%)	0,682
Fototerapia**	n (%)	42 (38%)	36 (31%)	0,372
Internação ≤ 72h**	n (%)	69 (60%)	78 (68%)	0,268
% perda peso/dia nas 1 ^{as} 72h***	(X ± DP)	3 ± 1	2 ± 1	< 0,001

*Teste t **Qui-quadrado ***Exato de Fisher

Os principais resultados desse estudo estão apresentados nas tabelas a seguir.

A tabela 4 mostra a comparação entre os níveis de citocinas no colostro nos dois grupos, destacando-se que na pré-eclâmpsia foram detectados valores significativamente mais elevados de IL-1 β e IL-6 e menores valores de IL-12.

Tabela 4. Valores médios das citocinas no colostro, nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas

Citocinas	Pré-eclâmpsia n=114	Normotensas n=114	P valor
IL-1β (pg/mL)	42,7 \pm 103,7	29,3 \pm 40,2	0,037
IL-6 (pg/mL)	120,4 \pm 203,9	71,4 \pm 90,2	0,006
IL-8 (pg/mL)	8742 \pm 10668	11052 \pm 11225	0,265
IL-10 (pg/mL)	11,0 \pm 14,6	13,5 \pm 8,0	0,152
IL-12 (pg/mL)	5,5 \pm 5,6	8,7 \pm 3,7	0,001
TNF-α (pg/mL)	16,4 \pm 20,5	18,4 \pm 15,1	0,459

IL= Interleucina TNF= *Tumour necrosis factor*

No leite maduro foram detectadas menores concentrações de IL-6 e IL-8 no grupo pré-eclâmpsia comparado ao grupo de normotensas, conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Valores médios das citocinas no leite maduro, nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas

	Pré-eclâmpsia	Normotensas	P
	n= 49	n= 68	valor
IL-1β (pg/mL)	18,7 \pm 29,1	30,7 \pm 49,5	0,1100
IL-6 (pg/mL)	51,4 \pm 129,3	220,3 \pm 336,2	0,0003
IL-8 (pg/mL)	1617 \pm 3123	3832 \pm 4243	0,0170
IL-10 (pg/mL)	5,4 \pm 13,3	5,9 \pm 8,4	0,7481
IL-12 (pg/mL)	3,9 \pm 6,9	1,6 \pm 3,0	0,0275
TNF-α (pg/mL)	9,6 \pm 16,0	11,9 \pm 22,4	0,5473

IL= Interleucina TNF= *Tumour necrosis factor*

A comparação das citocinas do leite materno em função da pré-eclâmpsia de início precoce versus tardio está apresentada nas tabelas 6 e 7. Valores significativamente maiores de IL-6 tanto no colostro como no leite maduro foram detectados na pré-eclâmpsia de início precoce (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Valores médios das citocinas no colostro, na pré-eclâmpsia precoce e tardia

	Precoce n= 22	Tardia n= 92	P valor
IL-1β (pg/mL)	28,8 \pm 35	46,5 \pm 115	0,524
IL-6 (pg/mL)	236 \pm 375	89 \pm 110	0,006
IL-8 (pg/mL)	9561 \pm 12385	8522 \pm 10253	0,716
IL-10 (pg/mL)	12,7 \pm 209	10,6 \pm 12,5	0,593
IL-12 (pg/mL)	6,0 \pm 7,2	5,4 \pm 5,1	0,653
TNF-α (pg/mL)	19,7 \pm 27,2	15,5 \pm 18,4	0,440

IL= Interleucina TNF= *Tumour necrosis factor*

Tabela 7. Valores médios das citocinas no leite maduro, na pré-eclâmpsia precoce e tardia

	Precoce n= 22	Tardia n= 92	P valor
IL-1β (pg/mL)	5,9 \pm 6,9	21,6 \pm 31,4	0,144
IL-6 (pg/mL)	144 \pm 281	31 \pm 43	0,016
IL-8 (pg/mL)	892 \pm 1434	1780 \pm 3381	0,447
IL-10 (pg/mL)	1,8 \pm 2,4	6,2 \pm 14,5	0,378
IL-12 (pg/mL)	1,9 \pm 4	4,4 \pm 7,3	0,326
TNF-α (pg/mL)	1,0 \pm 2,1	11,6 \pm 17,1	0,074

IL= Interleucina TNF= *Tumour necrosis factor*

A Tabela 8 mostra a análise dos níveis de citocinas no leite materno considerando não apenas o efeito do grupo (pré-eclâmpsia X normotensa), mas também a interação com o tempo (coloostro X leite maduro), sendo as diferenças entre grupos identificadas por letras maiúsculas e o efeito do tempo caracterizado por letras minúsculas. Verifica-se nessa tabela que no grupo de puérperas normotensas os níveis de IL-8, IL-10 e IL-12 foram menores no leite maduro em relação ao colostro, enquanto que a concentração de IL-6 aumentou no leite maduro. Já no grupo pré-eclâmpsia os níveis da maioria das citocinas mantiveram-se estáveis e sem diferenças entre o colostro e leite maduro, apenas a IL-1 β e IL-8 diminuíram com a progressão da lactação.

Tabela 8. Valores médios das citocinas no colostro e no leite maduro dos grupos pré-eclâmpsia (PE) e normotensas (Normo)

	Grupo	Colostro	AE*	Leite maduro	AE*
IL-1β (pg/mL)	Normo	29,3 \pm 40,2	aA	30,7 \pm 49,5	aA
	PE	42,7 \pm 103,7	aA	18,7 \pm 29,1	bA
IL-6 (pg/mL)	Normo	71,45 \pm 90,24	aA	220,3 \pm 336,2	bA
	PE	120,45 \pm 203,90	aB	51,4 \pm 129,3	aB
IL-8 (pg/mL)	Normo	11052 \pm 11224	aA	3832 \pm 4243	bA
	PE	8742 \pm 10668	aA	1617 \pm 3123	bB
IL-10 (pg/mL)	Normo	13,5 \pm 8,0	aA	5,9 \pm 8,4	bA
	PE	11,0 \pm 14,6	aA	5,4 \pm 13,3	aA
IL-12 (pg/mL)	Normo	8,7 \pm 3,7	aA	1,6 \pm 3,0	bA
	PE	5,5 \pm 5,6	aB	3,9 \pm 6,9	aA
TNF-α (pg/mL)	Normo	18,4 \pm 15,1	aA	11,9 \pm 22,4	aA
	PE	16,4 \pm 20,5	aA	9,6 \pm 16,0	aA

AE* = análise estatística: Letras diferentes indicam diferença significativa

4. DISCUSSÃO

Esse estudo mostrou que a pré-eclâmpsia altera os níveis de citocinas pró-inflamatórias no leite materno, bem como o perfil evolutivo das citocinas em função da fase de lactação. No colostro verificou-se aumento dos níveis de IL-1 β e IL-6 foram aumentados e da IL-12 diminuídos, enquanto que no leite maduro foram encontrados menores valores de IL-6 e IL-8 em comparação ao grupo controle. Ainda, na pré-eclâmpsia os níveis de citocinas não diminuíram do colostro para o leite maduro, o que ocorreu no grupo de normotensas.

Outro achado importante foi a diferença no efeito da pré-eclâmpsia precoce em comparação à tardia, especificamente em relação à IL-6.

Citocinas são importantes componentes do leite materno, envolvidas na imunoproteção passiva, no desenvolvimento do sistema imune do recém-nascido, e na proteção local do trato gastrointestinal imaturo. Esses imunonutrientes contribuem para o crescimento e diferenciação de células B e produção de imunoglobulinas⁽¹⁷⁾.

Os níveis de citocinas no leite materno são bastante variáveis em função da idade gestacional, da fase de lactação e dos métodos de dosagem^(19,20,21,22). Na literatura as concentrações das citocinas são, no geral, mais elevadas no colostro do que no leite maduro^(18,17), o que foi também evidenciado no presente estudo no grupo de puérperas normotensas, porém na pré-eclâmpsia a maioria das citocinas não apresentou diminuição significativa de seus níveis com a progressão da lactação, o que pode refletir a persistência da resposta inflamatória sistêmica exacerbada ou alteração no sistema imune da glândula mamária em mulheres com pré-eclâmpsia.

Resultado semelhante com persistência de níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias no leite maduro foi obtido no único estudo

encontrado na literatura que investigou o efeito da pré-eclâmpsia nos níveis de citocinas do leite materno. Nesse estudo foram avaliados os níveis de citocinas no colostro e no leite maduro de 15 puérperas que tiveram pré-eclâmpsia e 15 normotensas. A idade gestacional média foi de 34,5 semanas na pré-eclâmpsia e 39 semanas nas normotensas. Os valores encontrados para IL-1 β , IL-8 e TNF α foram próximos aos do presente estudo, enquanto que os níveis de IL-6 foram menores. Os autores não encontraram diferenças nos níveis de citocinas do colostro em função da presença de pré-eclâmpsia, mas no leite maduro os níveis de IL-8 e TNF α foram maiores na pré-eclâmpsia ⁽²³⁾.

Considerando que a pré-eclâmpsia é uma doença inflamatória sistêmica, é possível que a resposta inflamatória ocorra também na glândula mamária, com aumento dos níveis de citocinas inflamatórias no leite materno, o que pode justificar os níveis aumentados de IL-1 β e IL-6 no colostro, detectados no presente estudo. Por outro lado, a produção de citocinas na glândula mamária é um processo ativo ⁽²⁴⁾, e assim, a diminuição de IL-12 no leite de mães com pré-eclâmpsia pode traduzir um mecanismo de defesa para o concepto que foi exposto durante a vida fetal a uma condição inflamatória crônica.

A gestação normal acarreta alterações inflamatórias no organismo materno com predomínio do perfil Th2 da resposta imune (imunidade humoral), o que é importante para a manutenção da gestação, evitando a rejeição do feto. Na pré-eclâmpsia os mecanismos imunes estão alterados e predomina o perfil Th1, sendo que as células Th1 induzem a imunidade celular e propiciam uma condição inflamatória crônica com níveis aumentados de diversas citocinas pró-inflamatórias na circulação materna ^(25,26,27).

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória envolvida na proteção contra doenças alérgicas e no balanço entre o perfil Th1/Th2 da resposta imune.

Sua origem no leite materno não está totalmente estabelecida, mas parece ser secretada por neutrófilos, linfócitos e macrófagos presentes no leite. Essa citocina estimula a diferenciação de linfócitos T, de células natural Killer e do perfil Th1, o que é importante para o equilíbrio da resposta imune do recém-nascido, uma vez que na vida fetal o padrão predominante é Th2 ⁽²⁸⁾.

Considerando que na pré-eclâmpsia o feto foi exposto ao perfil Th1, os níveis diminuídos de IL-12 no colostro podem ser interpretados como um mecanismo adaptativo no balanço Th1/Th2, uma vez que a IL-12 induz o perfil Th 1.

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 do leite materno, incluindo a produção de Imunoglobulina A e de outras citocinas ⁽²⁹⁾. Assim, seus níveis aumentados no colostro, evidenciados no presente estudo podem ser benéficos ao recém-nascido.

A IL – 6 é uma importante citocina pró-inflamatória, que estimula a resposta de fase aguda, a diferenciação das células B e produção de anticorpos pelas mesmas, induzindo ao perfil Th2 da resposta imune. Como na pré-eclâmpsia o feto foi exposto ao perfil Th1, seus níveis aumentados no colostro evidenciados neste estudo podem ser benéficos ao recém-nascido.

Os níveis de IL-6 no leite materno diminuem com o progredir da lactação ⁽²²⁾, o que foi evidenciado neste estudo.

Outro achado interessante deste estudo foi a detecção de menores níveis de IL-6 e IL-8 no leite maduro de puérperas que tiveram pré-eclâmpsia.

Como a IL-6 e IL-8 são produzidas na glândula mamária e têm importante papel na cascata inflamatória, pode-se supor que os menores níveis detectados no leite maduro de puérperas que tiveram pré-eclâmpsia possam traduzir adaptações persistentes no organismo materno visando a proteção do recém-nascido, de modo a minimizar exposição a mediadores inflamatórios. Por outro lado, sabe-se que a IL-8 tem papel trófico na mucosa intestinal do recém-nascido e nesse sentido os menores valores no leite de mães com pré-eclâmpsia poderiam traduzir menor proteção ao trato gastrointestinal desses recém-nascidos ⁽²⁴⁾.

Na literatura são descritos menores níveis de IL-6 no leite de mães de prematuros em comparação ao termo ^(18,30,20,31) e diminuição dos valores de IL-6 com o progredir da lactação ⁽²²⁾. Quanto à IL-8, os níveis no leite materno são muito variáveis, com maiores valores em mães de prematuros, e diminuição com a progressão da lactação ⁽²⁴⁾. A presença de mastite associa-se com aumento da IL-8 no leite materno ⁽³²⁾.

Ao interpretar os resultados do presente estudo há que se considerar que a amostra foi constituída predominantemente de puérperas com pré-eclâmpsia tardia, na qual as alterações são menos intensas, o que pode ter possibilitado as adaptações no organismo materno no sentido de “adequar o leite ao recém-nascido”. Tanto que ao comparar a pré-eclâmpsia precoce com a tardia verificou-se que na primeira os níveis de IL-6 foram significativamente maiores no colostro e leite maduro, o que sugere que nessa forma da doença não foi possível a adaptação da glândula mamária.

Este estudo tem algumas limitações, pois não foram avaliados os níveis séricos de citocinas nas puérperas para aprofundar a interpretação dos resultados; a taxa de absenteísmo na avaliação do final do primeiro mês foi elevada, reduzindo o número de amostras de leite maduro, o que

limita a interpretação dos resultados da comparação entre grupos e momentos; e ainda, houve baixo percentual de pré-eclâmpsia precoce nessa amostra. Entretanto o tamanho amostral, especialmente para o colostro, pode ser considerado satisfatório em comparação aos estudos da literatura, o que aliado ao rigoroso pareamento dos grupos permitiu obter resultados significantes e trazer novos conhecimentos sobre os níveis de citocinas no leite materno.

Neste estudo a hipótese aventada foi que as diferenças nos níveis de citocinas no colostro e no leite maduro de mães com pré-eclâmpsia representam um mecanismo ativo compensatório da glândula mamária, visando a imuno proteção do recém-nascido através do leite materno. Essa hipótese tem como base o conhecimento do importante desenvolvimento do epitélio da glândula mamária durante a gestação, controlado por hormônios e por uma sequência de citocinas sinalizadoras que promovem a diferenciação das células T helper para o perfil Th2 induzindo a proliferação e diferenciação desse epitélio ⁽³³⁾. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para corroborar esses resultados e essa hipótese, e para aprofundar a investigação da composição do leite materno na pré-eclâmpsia, bem como dos mecanismos envolvidos na imuno-proteção do recém-nascido pelo leite materno nessa doença.

Os resultados deste estudo permitem concluir que a pré-eclâmpsia está associada com aumento dos níveis de citocinas inflamatórias no colostro e menores níveis de IL-6 e IL-8 no leite maduro. Os níveis de IL-6 no leite materno são maiores na pré-eclâmpsia precoce em comparação à tardia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rugolo LMSS, Bentlin MR, Trindade CEP. Preeclampsia: Early and Late Neonatal Outcomes. *Neoreviews*. 2012; 13; e532-41.
2. Organização Mundial da Saúde, OMS – Recomendação da OMS para a prevenção e tratamento da pré-eclâmpsia e eclâmpsia – 2014.
3. Tranquilli AL. Introduction to ISSHP new classification of preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2013; 3: 58-9.
4. Rugolo LMSS, Bentlin MR and Trindade CEP. Preeclampsia: Effect on the Fetus and Newborn. *NeoReviews* 2011; 12;e198-e2006.
5. Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract*. 2013; 22 (Suppl 1): 8-19.
6. Redman CW, Sargent IL, Staff AC, Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia – two placental causes of preeclampsia?, *Placenta* 35 (Suppl) S20–S25 (2014).
7. Ferguson KK, Meeker JD, McElrath TF, Mukherjee B, Cantonwine DE. Repeated measures of inflammation and oxidative stress biomarkers in preeclamptic and normotensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Dec 30. pii: S0002-9378(16)46465-3. doi: 10.1016/j.ajog.2016.12.174.
8. Harmon AC, Cornelius DC, Amaral LM, Faulkner JL, Cunningham MW Jr, Wallace K, LaMarca B. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin Sci (Lond)*. 2016 Mar;130(6):409-19. doi: 10.1042/CS20150702.
9. Tosun M, Celik H, Avci B, Yavuz E, Alper T, Malatyalioglu E. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010 Aug;23(8):880-6. doi: 10.3109/14767051003774942.
10. Catarino C, Santos-Silva A, Belo L, Rocha-Pereira P, Rocha S, Patrício B, Quintanilha A, Rebelo I. Inflammatory disturbances in preeclampsia: relationship between maternal and umbilical cord blood. *J Pregnancy*. 2012;2012:684384. doi: 10.1155/2012/684384. Epub 2012 May 23.
11. Jakaitis BM, Denning PW. Human breast milk and the gastrointestinal innate immune system. *Clin Perinatol*. 2014 Jun;41(2):423-35. doi: 10.1016/j.clp.2014.02.011.

12. Dixon DL, Forsyth KD. Leukocytes in expressed breast milk of asthmatic mothers. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2016 Nov 23. pii: S0301-0546(16)30150-1. doi: 10.1016/j.aller.2016.08.015.
13. Gomes Fagundes DL, França EL, da Silva Fernandes RT, Hara Cde C, Morceli G, Honorio-França AC, Calderon Ide M. Changes in T-cell phenotype and cytokines profile in maternal blood, cord blood and colostrum of diabetic mothers. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016 Mar;29(6):998-1004. doi: 10.3109/14767058.2015.1031739. Epub 2015 Apr 7.
14. Erbagci AB, Cekmen MB, Balat O, Balat A, Aksoy F, Tarakçioğlu. Persistency of high proinflammatory cytokine levels from colostrums to mature milk in preeclampsia. *Clin Biochem*. 2005; 38: 712-16.
15. 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.
16. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program working group on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183 (suppl 1): S1–S22.
17. Piskin IE, Karavar HN, Araslı M, Ermis B. Effect of maternal smoking on colostrum and breast milk cytokines *Eur. Cytokine Netw*. Vol. 23 n° 4, October-November-December 2012, 187-90 RESEARCH ARTICLE.
18. 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.
19. 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.
20. Lau SY, Guild SJ, Barrett CJ, Chen Q, McCowan L, Jordan V, Chamley LW. Tumor Necrosis Factor-Alpha, Interleukin-6, and Interleukin-10 Levels are Altered in Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Reproductive Immunology* 70 (2013) 412–427 412^a 2013.
21. Trend S, Strunk T, Lloyd ML, Kok CH, Metcalfe J, Geddes DT, Lai CT, Richmond P, Doherty DA, Simmer K, Currie A. Levels of innate immune factors in preterm and term mothers' breast milk during the 1st month postpartum. *Br J Nutr*. 2016 Apr 14;115(7):1178-93. doi: 10.1017/S0007114516000234. Epub 2016 Feb 19.

22. Erbagci AB, Cekmen MB, Balat O, Balat A, Aksoy F, Tarakçioğlu. Persistency of high proinflammatory cytokine levels from colostrums to mature milk in preeclampsia. *Clin Biochem.* 2005; 38: 712-16.
23. 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.
24. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Immunol* 1999;117:550– 5.
25. Jonsson Y, Ruber M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C: Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol* 2006; 70:83–91.
26. Szarka A, Rigo J, Lazar L, Beko G, Molvarec A: Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol* 2010; 11: doi: 10.1186/1471- 2172-11-59.
27. Bryan DL, Hawkes JS, Gibson RA. Interleukin-12 in human milk. *Pediatr Res.* 1999 Jun;45(6):858-9.
28. 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.
29. Ballard O, Morrow AL, Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin N Am* 2013; 60: 49–74.
30. Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr* 2011;141:1181–7.
31. Ustundag B, Yilmaz E, Dogan Y, Akarsu S, Canatan H, Halifeoglu I, Cikim G, et al. Levels of cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. *Mediators Inflamm.* 2005; 6: 331–36.
32. Barber MR, Yang TJ (1998) Chemotactic activities in nonmastitic and mastitic mammary secretions: presence of interleukin-8 in mastitic but not nonmastitic secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* 5:82–86.

33. Watson CJ and Kreuzaler PA. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int. J. Dev. Biol.* 55: 757 - 762 (2011) doi: 10.1387/ijdb.113414cw.