



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

Natália Alves de Freitas

**Componentes oxidantes e antioxidantes no
colostró e leite materno maduro de mães de
recém-nascidos prematuros e de termo:
Efeito da pré-eclâmpsia**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em
Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo

**Botucatu
2021**

Natália Alves de Freitas

Componentes oxidantes e antioxidantes no
colostro e leite materno maduro de mães de recém-
nascidos prematuros e de termo: Efeito da pré-
eclâmpsia

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em
Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo

Botucatu

2021

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.

Componentes oxidantes e antioxidantes no colostro e leite materno maduro de mães de recém-nascidos prematuros e de termo : efeito da pré-eclâmpsia / Natália Alves Freitas. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo
Capes: 40101150

1. Leite humano. 2. Colostro. 3. Antioxidantes.
4. Oxidantes. 5. Pré-eclâmpsia.

Palavras-chave: Antioxidantes; Colostro; Leite materno; Oxidantes; Pré-eclâmpsia.

Dedicatória

À Deus, é a Ele que dirijo minha maior gratidão. Vem d'Ele tudo o que sou, o que tenho e o que espero. Obrigada por mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus Pais, Claudete e Walter, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. E a minha irmã Rafaela, pelo apoio incondicional e exemplo de força. Obrigada por serem a minha referência e estarem sempre presentes na minha vida. Amo vocês!

Ao meu marido, Filipe, pelo incentivo, amor, cumplicidade, dedicação, paciência e por compreender todos os momentos e dificuldades. Seu valioso e incansável apoio foi definitivo em todos os momentos deste trabalho.

Agradecimento Especial

À minha querida orientadora, Dra. Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo, a quem admiro por ser exemplo de pessoa e profissional, sempre galgando o caminho do bem, sendo realmente apaixonada por aquilo que faz. Não tenho palavras para agradecer sua dedicação a este trabalho e por seus preciosos ensinamentos. Muito obrigada!

Outros Agradecimentos

À minha amiga e colega de profissão, Luiza Tavares Carneiro Santiago, pela parceria durante todos esses anos e por sua contribuição neste trabalho.

À Profª Dra. Cilmary Suemy Kurokawa e a toda a equipe do laboratório de pediatria experimental e pela realização das análises e por todo o apoio.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente, pelas análises estatísticas 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 equipe de Enfermagem do Ambulatório de Pediatria pelo auxílio durante esse trabalho.

À todos os colegas, professores e funcionários do departamento da pós-graduação em Tocoginecologia pelo convívio, competência e disposição em compartilhar experiências.

As Mães e seus recém-nascidos, que participaram desta tese. Meu muito obrigada, vocês foram fundamentais para a realização deste estudo!

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº 2014/12784-9) pelo financiamento e apoio a pesquisa.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre sistema oxidante e antioxidante (<i>Adaptado de Vazquez et al., 2004</i>).	16
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados maternos e gestacionais nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas	28
Tabela 2. Dados de nascimento nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas	29
Tabela 3. Concentrações médias de malondialdeído e de enzimas antioxidantes no colostro e leite maduro nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas	30
Tabela 4. Comparação entre colostro e leite maduro quanto às concentrações médias de malondialdeído e enzimas antioxidantes, nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas	31
Tabela 5. Concentrações médias de malondialdeído e de enzimas antioxidantes no colostro dos grupos pré-eclâmpsia e normotensas, com ajuste dos fatores de confusão	32
Tabela 6. Concentrações médias de malondialdeído e de enzimas antioxidantes no leite maduro dos grupos pré-eclâmpsia e normotensas, com ajuste dos fatores de confusão.....	33
Tabela 7. Comparação entre colostro e leite maduro quanto às concentrações médias de malondialdeído e das enzimas antioxidantes em cada grupo, com ajuste dos fatores de confusão	34
Tabela 8. Comparação das concentrações médias de malondialdeído e das enzimas antioxidantes no colostro dos sub-grupos prematuros e termos, na pré-eclâmpsia e grupo controle	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Pré-eclâmpsia	13
1.2 Estresse Oxidativo	14
1.3 Situações que aumentam o estresse oxidativo	16
1.3.1 Na gestação	16
1.3.2 No nascimento	17
1.3.3 No período neonatal	17
1.4 Leite materno	18
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	21
3. OBJETIVO	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4. MÉTODO	23
4.1 Desenho do estudo	23
4.2 Financiamento	23
4.3 Tamanho da amostra	23
4.4 Seleção e inclusão dos sujeitos:	23
4.5 Grupos de estudo	24
4.6 Definições utilizadas no estudo	24
4.7 Variáveis de estudo	25
4.8 Coleta do leite materno e momentos de avaliação	25
4.9 Dosagens bioquímicas no leite materno	26
4.10 Desfechos	26
4.11 Análise estatística	26
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	40

RESUMO

INTRODUÇÃO: Estresse oxidativo participa na patogênese da pré-eclâmpsia (PE). A composição oxidante e antioxidante do leite materno na PE é pouco conhecida. **OBJETIVO:** Investigar o efeito da PE na composição oxidante e antioxidante do colostro e leite maduro. **MÉTODO:** Estudo longitudinal de corte transversal, com puérperas da Maternidade da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, no período de 2015-2017. Foram estudadas 300 puérperas, divididas em 2 grupos, pareados pela idade gestacional: PE (n=150) e normotensas (n=150). Colostro foi coletado entre 24-72 horas pós-parto e o leite maduro no final do primeiro mês. Foram dosadas enzimas antioxidantes: Glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT) e Superóxido dismutase (SOD) e o marcador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA). Os grupos foram comparados pelo Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher, ANOVA seguida pelo teste de Wald com controle de confundidores. **RESULTADOS:** No grupo PE, comparado ao controle, foram detectadas maiores concentrações das enzimas antioxidantes SOD(U/mL) ($0,05 \pm 0,04$ vs $0,04 \pm 0,03$) e CAT(nmol/min/mL) (560 ± 677 vs 317 ± 359) no colostro, e menores concentrações de MDA(nmol/mg) tanto no colostro (12 ± 11 vs 17 ± 15) como no leite maduro (22 ± 27 vs 38 ± 68). Com a progressão da lactação houve aumento do MDA e diminuição da enzima CAT em ambos os grupos. Na PE o efeito protetor antioxidante do colostro foi maior tanto em prematuros como nos termos, em comparação às normotensas. **CONCLUSÃO:** Na pré-eclâmpsia a composição oxidante/antioxidante do leite materno modifica-se, principalmente no colostro, com menor conteúdo oxidante e maior concentração de antioxidantes, o que pode beneficiar os recém-nascidos, especialmente os prematuros.

Palavras-chave: pré-eclâmpsia, leite materno, colostro, oxidantes, antioxidantes.

ABSTRACT

BACKGROUND: Oxidative stress contributes to the pathogenesis of preeclampsia (PE). The oxidant and antioxidant composition of breast milk in PE is not widely known. **OBJECTIVE:** To investigate the effect of PE on the oxidant and antioxidant composition of colostrum and mature milk. **METHOD:** Longitudinal cross-sectional study, with puerperal women from the Maternity Hospital of Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, in the period 2015-2017. Were studied 300 puerperal women, divided into 2 groups, matched by gestational age: PE (n=150) and normotensive (n=150). The colostrum was obtained between 24-72 hours postpartum and mature milk at the end of the first month. Antioxidant enzymes: Glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD), and the lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA) were assessed. The groups were compared using the Chi-square or Fisher's Exact test, ANOVA followed by the Wald test with confounding control. **RESULTS:** PE group, compared to the control group, showed higher concentrations of antioxidant enzymes SOD (U/mL) (0.05 ± 0.04 vs 0.04 ± 0.03) and CAT (nmol/min/mL) (560 ± 677 vs 317 ± 359) in the colostrum, and lower concentrations of MDA (nmol/mg) both in colostrum (12 ± 11 vs 17 ± 15) and mature milk (22 ± 27 vs 38 ± 68). As lactation progressed, there was an increase in MDA and a decrease in the CAT concentration in both groups. In PE, the antioxidant protective effect of colostrum was greater in premature and term gestation, compared to normotensive women. **CONCLUSION:** In pre-eclampsia, the oxidant/antioxidant composition of breast milk is modified, especially in colostrum, with a lower oxidant content and a higher concentration of antioxidants enzymes, which can benefit newborns, especially premature infants.

Keywords: pre-eclampsia, breast milk, colostrum, oxidants, antioxidants.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pré-eclâmpsia

Os distúrbios hipertensivos acometem 5% a 7% de todas as gestações, com cifras crescentes nos países em desenvolvimento (Ferrão et al., 2006; Nash, 2007; Moura et al., 2010; Novo & Gianini, 2010; Souza et al., 2010; Poon et al, 2019).

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença multissistêmica, manifestação mais frequente dos distúrbios hipertensivos da gestação. Afeta 2 a 5% das gestantes e é uma das principais causas de morbidade e mortalidade materna e perinatal, especialmente quando a doença é de manifestação precoce (< 34 semanas de gestação) (Coelho et al., 2004; Burton et al, 2019).

A pré-eclâmpsia associa-se com repercussões imediatas para o conceito representadas por prematuridade, restrição do crescimento fetal, sofrimento fetal, risco aumentado de doenças pulmonares agudas e crônicas e morte perinatal. No longo prazo existe preocupação com as crianças nascidas de baixo peso, pois essas apresentam maior risco de desenvolver hipertensão e dislipidemia na idade adulta (Ferrão et al., 2006; Souza et al., 2010; Rugolo et al., 2011; Rugolo et al., 2012; Taysi et al., 2018).

A fisiopatologia e a etiologia dessa doença não estão esclarecidas. Estudos sugerem que fatores genéticos, imunológicos e o estresse oxidativo estão envolvidos no desenvolvimento da pré-eclâmpsia (Peraçoli & Parpinelli, 2005; Nash, 2007; Peres, 2007; Raijmakers et al., 2008; Souza et al., 2010; Rugolo et al., 2015; 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 condição hipóxico-isquêmica placentária associa-se com a liberação de vários fatores vasoativos, incluindo as citocinas pró-inflamatórias, 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 e a participação do estresse oxidativo na fisiopatologia dessa doença tem sido cada vez mais destacada (Raghupathy, 2013; Shah e Khalil, 2015; Aouache et al, 2018; Ferreira et al, 2020; Guerby et al, 2021).

1.2. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo decorre do desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. Dentre os compostos oxidantes destacam-se as espécies reativas de oxigênio, encontradas predominantemente na forma de radicais livres de oxigênio derivados do metabolismo mitocondrial. Pela sua instabilidade, os radicais livres agregam-se facilmente a outras moléculas tentando capturar elétrons para se tornarem estáveis, entretanto esse processo pode causar danos em proteínas, lipídios e DNA (Figura 1). Espécies reativas de oxigênio são produzidas por diversos mecanismos, incluindo o metabolismo de prostaglandinas e de ácidos graxos, isquemia-reperfusão, hipoxia e hiperoxia, inflamação e degradação de ATP. Dentre as substâncias oxidantes, os radicais livres de oxigênio (ROS), apresentam a maior importância biológica. Como os radicais livres são altamente instáveis, seus efeitos oxidantes são avaliados indiretamente pela diminuição dos antioxidantes ou pelos produtos finais do estresse oxidativo, sendo um dos mais estudados o malondialdeído (MDA), produto secundário da peroxidação lipídica das membranas celulares. O MDA possui ação citotóxica e genotóxica, e encontra-se em níveis elevados em diversas situações associadas ao estresse oxidativo (Trindade & Rugolo, 2007, Cippierre et al, 2013; Perrone et al, 2019).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e ou reduzir os danos causados pelos radicais livres e ou espécies reativas de oxigênio. Esse sistema compreende substâncias enzimáticas e não enzimáticas. Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Dentre os antioxidantes não enzimáticos destacam-se: vitamina A (retinol e carotenóides), selênio, zinco, cobre, ceruloplasmina, bilirrubina e as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol). Dentre estas substâncias, ênfase tem sido dada às enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GPx). Essas

enzimas juntamente com a vitamina E, desempenham importante papel protetor na peroxidação lipídica (Trindade & Rugolo, 2007; Nogueira et al, 2010).

Glutationa, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em duas formas: reduzida e oxidada, atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. A atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx) é um dos meios de controle dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos no organismo, fazendo parte do sistema de defesa antioxidante enzimático celular. Uma característica dessa enzima é apresentar um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima. Sua atividade depende da oxidação da glutathione reduzida, que se transforma em glutathione oxidada (Meister et al., 1983).

Outra enzima que age conjuntamente com a glutathione peroxidase é a glutathione reductase (GR). Esta não age diretamente na remoção de radicais livres, porém é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), visando impedir a interrupção do ciclo metabólico da glutathione (Meister et al., 1983).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da produção excessiva de radicais livres ou da insuficiente capacidade de remoção dos mesmos. Tal processo propicia a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções e ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo de estruturas celulares em vários tecidos e órgãos, com alteração de suas funções vitais (Vancini et al., 2005; Trindade & Rugolo, 2007).

Na presença do estresse oxidativo são produzidos metabólitos específicos, os marcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados.

A membrana celular é a estrutura mais suscetível à ação das espécies reativas de oxigênio que causam peroxidação lipídica, podendo esta peroxidação ser catalisada por íons ferro ou iniciada pelo radical hidroxila (Trindade & Rugolo, 2007). Os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) podem ser utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo, assim a quantificação de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular (Andrade Jr et al, 2005; Del Rio et al., 2005). A Figura 1 apresenta

esquemáticamente o desequilíbrio nos sistemas oxidante/antioxidante e suas consequências.

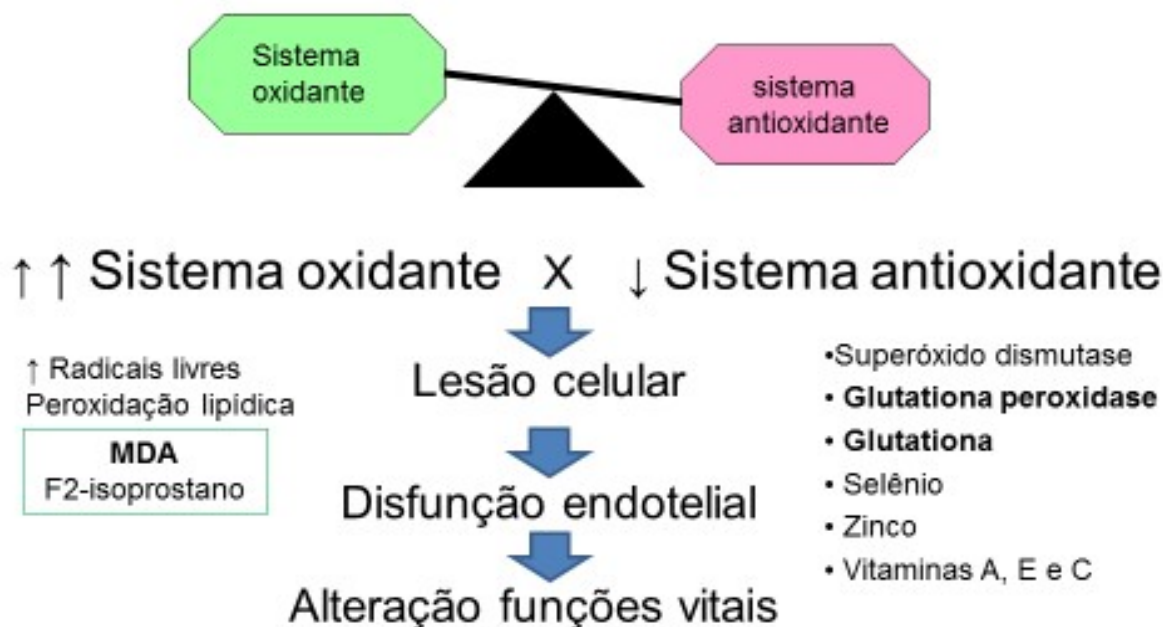


Figura 1. Relação entre sistema oxidante e antioxidante (*Adaptado de Vazquez et al., 2004*).

1.3. Situações que aumentam o estresse oxidativo

Várias situações no período perinatal estão associadas com aumento na produção de radicais livres, incluindo: doenças maternas e gestacionais, o nascimento, o uso de altas concentrações de oxigênio na reanimação neonatal e na ventilação mecânica, a fase de reperfusão da lesão hipóxico-isquêmica cerebral, a infecção/inflamação, o uso de nutrição parenteral (Trindade e Rugolo, 2007; Weber et al, 2014).

1.3.1. Na gestação

O estresse oxidativo aumenta na gestação normal, por haver maior consumo de oxigênio, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio.

Porém, esse aumento é compensado pela ativação dos mecanismos de defesa antioxidante da gestante (Sharma et al., 2006; Marseglia et al., 2014; Chiarello et al., 2020).

Na pré-eclâmpsia, a perfusão sanguínea placentária é inadequada, propiciando a ocorrência de áreas de isquemia e reperfusão com aumento na formação de radicais livres e, paralelamente, o sistema de defesa antioxidante torna-se deficitário. Estudos em placenta de gestantes com pré-eclâmpsia mostram aumento de peroxidação lipídica e oxidação proteica, bem como diminuição das enzimas antioxidantes. Assim, o estresse oxidativo placentário é considerado importante evento na patogênese da pré-eclâmpsia, e encontra-se aumentado na mãe e no recém-nascido (Vanderlelie et al., 2005; Chamy et al., 2006; Sharma et al., 2006; Kaur et al., 2008; Rugolo et al., 2011; Hilali et al., 2013; Negi et al., 2014; Shah & khalil, 2015; Shruti et al, 2017).

1.3.2. No nascimento

O nascimento associa-se à produção de radicais livres, devido ao aumento agudo da oxigenação na transição do ambiente hipóxico intra-utero para o extra-utero. Os recém-nascidos de termo possuem sistema de defesa antioxidante capaz de evitar o aumento supra fisiológico desses radicais, o que não ocorre nos prematuros, uma vez que as concentrações de antioxidantes só aumentam no final da gestação, de modo que os recém-nascidos prematuros são mais vulneráveis ao estresse oxidativo desde o nascimento e durante todo o período neonatal (Perrone et al., 2019).

1.3.3. No período neonatal

A assistência neonatal ao prematuro envolve, com frequência, situações que aumentam o risco de estresse oxidativo, incluindo o uso de altas concentrações de oxigênio na reanimação em sala de parto e/ou na ventilação mecânica; o uso de nutrição parenteral na qual os lipídios, aminoácidos e vitaminas são fontes de radicais livres; as transfusões sanguíneas que propiciam sobrecarga de ferro; uso de fototerapia que pode desencadear dano fotodinâmico aos tecidos e ainda a ocorrência frequente de infecção/inflamação (Aycicek & Erel, 2007; Trindade & Rugolo, 2007; Kapadia et al., 2013; Marseglia et al., 2014; Mohamed et al., 2015; Aversa et al., 2016). Além da maior

exposição a situações de risco para estresse oxidativo, a imaturidade e deficiência do sistema antioxidante dos recém-nascidos prematuros aumenta o risco de lesão celular por radicais livres. Assim, o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia de várias doenças da prematuridade como displasia broncopulmonar, hemorragia peri-intraventricular, lesão de substância branca, retinopatia da prematuridade e enterocolite necrosante (Tsukahara et al., 2004; Trindade & Rugolo, 2007; Namdev et al, 2014; Yzydorczyk et al., 2015).

1.4. Leite Materno

Já está bem estabelecido 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 o recém-nascido. Assim, a OMS recomenda que todos os recém-nascidos, incluindo os de baixo peso sejam alimentados com leite materno exclusivo nos primeiros seis meses de vida (WHO, 2011; Cordero et al, 2012).

Para o RN pré-termo, a recomendação do aleitamento materno tem sido enfatizada 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. O leite materno contém vários imunonutrientes e fatores de crescimento, que melhoram a barreira intestinal e a função imune, propiciando benefícios imediatos como 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/seps (Nascimento & Issler, 2004; Corpeleijn et al, 2012; 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).

O leite materno difere conforme a fase da lactação. 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 & Hartmann, 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 da concentração 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).

Além da fase da lactação, existem outros fatores que influenciam a composição do leite materno, como alguns componentes provenientes da dieta materna e outros 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 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).

Considerando que os mecanismos de defesa antioxidante são imaturos e limitados no período neonatal (Shekeeb Shahab et al, 2008), o leite materno pode contribuir para proteção do recém-nascido, uma vez que contém várias substâncias com capacidade antioxidante, incluindo as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase; bem como substâncias não-enzimáticas, como vitaminas (α -tocoferol, carotenóides, ácido ascórbico), proteínas (lactoferrina) e minerais (selênio) (Ochoa et.al., 2003). Entretanto, o papel do aleitamento materno na proteção contra o estresse oxidativo, ainda é pouco estudado.

Sabe-se que o leite humano tem maior concentração de varredores de radicais livres em comparação ao leite de vaca e que a capacidade antioxidante

do leite humano é reduzida pelo processo de estocagem (Hanna et al, 2004). Em recém-nascidos e lactentes amamentados foram detectadas menores concentrações plasmáticas de marcadores de estresse oxidativo e maiores valores de antioxidantes (Koletzko et al, 2003).

Há controvérsia se a proteção antioxidante do leite materno difere em função da idade gestacional e do tempo de lactação, e os resultados dos estudos não são uniformes.

Friel e colaboradores (2002) analisaram a atividade oxidante e antioxidante do leite materno de puérperas de termo e de pré-termo nas primeiras semanas de lactação, em comparação à fórmula láctea. O leite materno teve maior capacidade de proteção antioxidante do que a fórmula. Não houve diferença entre leite de termo e de pré-termo quanto ao conteúdo de oxidantes (MDA) e das enzimas antioxidantes (SOD, GPx e CAT).

Em outro estudo que investigou a capacidade antioxidante do colostro, leite de transição e leite maduro, foi verificado que as concentrações de antioxidantes diminuíram com a progressão da lactação, e a capacidade antioxidante do leite materno foi menor em mães de prematuros em comparação aos termos (Quiles et al, 2006). Já no estudo de Păduraru et al (2018) a capacidade antioxidante aumentou com o progredir da lactação, sem diferença no colostro de termo e pré-termo, porém no leite maduro a capacidade antioxidante foi menor nas mães de prematuros do que nas de termo.

Estudos recentes mostraram que o equilíbrio oxidante-antioxidante no leite materno é preservado em todas as fases da lactação, e ainda, documentam no leite de mães de prematuros menor índice de estresse oxidativo, sugerindo que o leite materno protege o prematuro contra o estresse oxidativo (Chen et al, 2018; Deniz et al, 2019).

Um importante mecanismo fisiopatológico na pré-eclâmpsia 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 (Derzsy et al, 2010).

Na pré-eclâmpsia foram documentadas alterações nos macronutrientes do leite materno, incluindo maiores concentrações do ácido graxo poliinsaturado

docosaheptaenóico no colostro e no leite maduro (Dangat et al, 2014). Estudo do colostro in vitro, não mostrou diferença nos teores de carboidratos, aminoácidos, lipídios e outros metabólitos, entretanto, aos 6 meses de lactação foram detectados menores concentrações desses componentes no leite de mulheres que tiveram pré-eclâmpsia (Dangat et al, 2016).

Níveis aumentados de citocinas inflamatórias foram detectados no colostro de mulheres com pré-eclâmpsia (PE); e os níveis de IL-6 no leite materno foram maiores na pré-eclâmpsia precoce em comparação à tardia (Dangat et al, 2016; Freitas et al, 2018).

Dados interessantes foram obtidos por Erdem e col. (2012) que investigaram parâmetros de estresse oxidativo e a capacidade antioxidante em sangue materno, sangue de cordão umbilical e também no colostro de mulheres com PE comparadas às normotensas. Na PE foram detectados valores significativamente aumentados dos marcadores oxidantes e diminuição da capacidade antioxidante no sangue materno e do cordão umbilical, bem como no colostro. Destaca-se nesse estudo que a capacidade antioxidante total do colostro foi quase 10 vezes maior do que a detectada em sangue de cordão e na circulação materna, tanto na PE como no grupo controle, sugerindo que o leite materno tem importante papel na proteção antioxidante do recém-nascido, especialmente o filho de mãe com PE (Erdem et al, 2012).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os estudos sobre a composição oxidante/antioxidante do leite materno na pré-eclâmpsia ainda são escassos e os resultados até então obtidos são inconclusivos, o que motivou a realização dessa pesquisa para responder as seguintes questões:

- a. Qual o efeito da PE na composição oxidante e antioxidante do leite materno?
- b. Existe diferença na composição oxidante/antioxidante do leite de mães com PE em função da fase da lactação?

A hipótese do estudo é que existem diferenças significativas no leite de mães com pré-eclâmpsia, principalmente no colostro.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito da pré-eclâmpsia (PE) na composição oxidante e antioxidante do colostro e do leite maduro.

3.2 Objetivos Específicos

I- Analisar no colostro e no leite maduro de mães com PE, comparadas a um grupo controle de normotensas, as concentrações de:

- Biomarcador oxidante: malondialdeído (MDA)

- Enzimas antioxidantes: glutathione-peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxidodismutase (SOD)

II- Avaliar o efeito da progressão da lactação na composição oxidante/antioxidante do leite materno, comparando o colostro com leite maduro nos 2 grupos (PE e normotensas).

III- Investigar se a composição oxidante/antioxidante do colostro e do leite maduro difere entre mães de prematuros e mães de recém-nascidos de termo, nos 2 grupos (PE e normotensas)

4. MÉTODO

4.1 Desenho do estudo

Estudo longitudinal de corte transversal, envolvendo as mães com pré-eclâmpsia e seus recém-nascidos de termo e pré-termo, nascidos na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, no período de 2015 até 2017.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (Parecer 1.011.745) (ANEXO 1).

4.2 Financiamento

A pesquisa contou com apoio financeiro obtido da FAPESP, outorgado em 14/03/2015 (Proc. 2014/12784-9) (ANEXO 2).

4.3 Tamanho da amostra

A amostra estudada correspondeu ao número máximo de puérperas que preencheram os critérios de inclusão e concordaram em participar do estudo, em um período de 3 anos, perfazendo um total de 300 puérperas. Nesta amostra o poder do teste para os biomarcadores oxidantes e antioxidantes foi maior que 90%.

4.4 Seleção e inclusão dos sujeitos:

A partir do livro de registro de nascimentos da Unidade Neonatal foram selecionados os nascidos vivos, filhos de mães com pré-eclâmpsia diagnosticada no Serviço. As pacientes que concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido foram incluídas no estudo, desde que preenchessem os seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- Gestação única
- Sorologias para sífilis e HIV negativas durante a gestação
- Gestante não usuária de drogas ilícitas
- Ausência de diabetes mellitus e de corioamnionite clínica

- Nascimento na Maternidade do serviço
- Ausência de malformação múltipla no recém-nascido

Critérios de exclusão:

- Impossibilidade de obtenção do colostro
- Necessidade de uso contínuo de qualquer medicamento pela puérpera.

4.5 Grupos de estudo

As puérperas foram distribuídas em dois grupos conforme a condição pressórica materna: Pré-eclâmpsia e Normotensa (controle). O grupo controle foi recrutado concomitantemente ao grupo Pré-eclâmpsia, na proporção 1:1, com pareamento pela mesma semana de idade gestacional.

4.6 Definições utilizadas no estudo

Pré-eclâmpsia foi definida conforme a proposta da International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP) em 2018:

Hipertensão detectada após a 20ª semana de gestação, caracterizada por pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão diastólica ≥ 90 mmHg, aferidas em pelo menos 2 ocasiões com intervalo de 4 horas em mulheres previamente normotensas e acompanhada por uma ou mais das seguintes condições:

- i. Presença de proteinúria; *E/OU*
- ii. Outras disfunções orgânicas maternas, incluindo: Lesão renal aguda, alteração da função hepática, complicações neurológicas e hematológicas; *E/OU*
- iii. Disfunção uteroplacentária (como restrição de crescimento fetal, anormalidade da artéria umbilical ou natimorto)

A pré-eclâmpsia foi sub-classificada conforme a resolução da gestação (Poon et al, 2019):

- PE de pré-termo (nascimento antes de 37 semanas de gestação)
- PE a termo (nascimento ≥ 37 semanas de gestação).

A idade gestacional foi calculada pela melhor estimativa obstétrica (ultrassom precoce, antes de 20 semanas de gestação, ou data precisa da última menstruação), sendo considerado recém-nascido prematuro aquele < 37 semanas, e termo de 37 a 41 semanas de gestação.

A adequação do peso de nascimento para a idade gestacional foi avaliada conforme a curva de crescimento intra-uterino de Fenton (2013), sendo considerado Pequeno para a Idade Gestacional (PIG) quando o peso for inferior ao percentil 10 e Adequado para a Idade Gestacional (AIG) se peso ao nascer entre percentil 10 e 90 da referida curva (Fenton, 2013)

4.7 Variáveis de estudo

As variáveis independentes do estudo incluíram: dados maternos (idade, paridade, escolaridade, tabagismo, medidas antropométricas pré-gestacionais, intercorrências gestacionais e tipo de parto) e dados do recém-nascido (idade gestacional, gênero, necessidade de reanimação ao nascimento, Apgar, peso de nascimento, classificação do peso para a idade gestacional e tempo de internação).

4.8 Coleta do leite materno e momentos de avaliação

A coleta do leite materno foi realizada por meio de extração manual nas primeiras 72 horas após o nascimento (colostro) e na 4ª semana de vida (leite maduro), de acordo com as técnicas preconizadas pela Rede Nacional de Banco de Leite Humano (<http://www.redeblh.fiocruz.br/>). Amostras de 3mL de leite materno foram coletadas pela pesquisadora, no período da manhã no intervalo das mamadas.

As amostras foram aliquotadas em 3 criotubos (um mL em cada) e congeladas em temperatura de menos 80°C até o momento das dosagens, que foram realizadas nos laboratórios da UNIPEX da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

4.9 Dosagens bioquímicas no leite materno

O marcador de peroxidação lipídica, malondialdeído (MDA), foi dosado por absorvância espectrofotométrica das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), que reagem com o malondialdeído produzindo uma substância rósea. Dessa forma, a quantidade de TBARS é proporcional a quantidade de MDA. A concentração de TBARS foi calculada usando a curva padrão de MDA e foi expressa em nmol/mg de proteína.

Como marcadores da capacidade antioxidante foram dosadas as 3 principais enzimas antioxidantes: Glutathione peroxidase (GPX), Catalase (CAT) e Superóxido dismutase (SOD). Essas dosagens foram realizadas por Ensaio Colorimétrico utilizando Kits específicos: Glutathione Peroxidase Assay Kit, Catalase Assay Kit, Superoxide Dismutase Assay Kit, da Cayman Chemical ®.

4.10 Desfechos

Concentrações de malondialdeído e das enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, catalase, superóxido dismutase) no colostro e leite maduro das púerperas que tiveram pré-eclâmpsia e nas normotensas.

4.11 Análise estatística

Na análise descritiva da amostra as variáveis contínuas foram apresentadas em tabelas com cálculo de média e desvio padrão ou mediana e percentis para as variáveis quantitativas; e as variáveis categóricas foram expressas pelo número e proporção de eventos, considerando os grupos: PE e normotensas.

As comparações de médias entre os grupos foram efetuadas pelo teste t-Student para as variáveis com distribuição simétrica. Em caso de assimetria, as comparações foram feitas ajustando um modelo em distribuição gama. Para as variáveis categorizadas, a associação entre grupos foi feita utilizando o teste do Qui-quadrado.

Para a avaliação do efeito do grupo (PE e normotensas) e do tempo (colostro e leite maduro) nos marcadores oxidante/antioxidantes, foi utilizado um modelo em

medidas repetidas, já que as observações foram obtidas do mesmo indivíduo. Para as comparações de médias neste caso, foi utilizado ANOVA-RM seguido do teste de comparação múltipla de Tukey em caso de distribuição simétrica, ou um ajuste em distribuição gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald no caso de distribuição assimétrica. O mesmo procedimento foi feito considerando apenas os grupos (PE e normotensas) e apenas o tipo de leite (coloostro e maduro) ajustando para possíveis variáveis confundidoras.

Em todos os testes foi fixado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. As análises foram feitas utilizando o programa SAS for Windows, v.9.4.

5. RESULTADOS

No período de 2015 a 2017 foram selecionadas 379 puérperas. Destas, 35 não foram incluídas porque não concordaram em participar, 42 foram excluídas devido à não obtenção do volume mínimo necessário de coloostro (um mL) e 2 puérperas com pré-eclâmpsia foram excluídas por não se conseguir o pareamento. Assim, foram estudadas amostras de leite materno de 300 puérperas, sendo 150 com pré-eclâmpsia e 150 normotensas (controle), pareadas pela mesma semana de idade gestacional.

O coloostro foi obtido das 300 participantes, entretanto 38% das puérperas suspenderam a amamentação ou não retornaram ao final do primeiro mês, motivo pelo qual foi possível obter amostras de leite maduro em 90 puérperas do grupo pré-eclâmpsia e 95 no grupo controle.

Dentre as puérperas estudadas, a grande maioria (84%) tinha ≥ 8 anos de estudo, 99% realizaram controle pré-natal, e o corticóide antenatal foi usado em 75% das gestações abaixo de 34 semanas, sem diferenças entre os grupos. Entretanto apenas 38% do grupo PE em comparação com 67% das normotensas eram procedentes de Botucatu ($p < 0,001$).

Em relação aos recém-nascidos, em ambos os grupos a condição de vitalidade ao nascer foi boa e a média do escore de Apgar foi 8 no primeiro

minuto e 9 no quinto minuto de vida. A idade gestacional variou de 27 a 41 semanas, e o percentual de prematuridade na amostra estudada foi de 35% (n=104). A mediana do tempo de internação foi de 3 dias (Q1=2; Q3=5).

Os principais dados maternos, gestacionais e de nascimento estão apresentados na tabela 1, onde se verifica que algumas características maternas e gestacionais diferiram entre os grupos (Tabela 1).

TABELA 1. Dados maternos, gestacionais e de nascimento nos grupos: pré-eclâmpsia e normotensas

Variáveis	Pré-eclâmpsia n= 150	Normotensas n= 150	P Valor
Idade (anos)*	26 ± 6	24 ± 6	0,004
IMC (kg/m ²)*	29 ± 6	25 ± 5	<0,001
Primigesta (%)	54 (36)	57 (38)	0,719
Tabagismo (%)	15 (10)	32 (21)	0,007
Bolsa rota > 18h (%)	3 (2)	12 (8)	0,017
Cesárea (%)	85 (57)	30 (20)	< 0,001
Idade gestacional (sem)*	37 ± 2,7	37 ± 2,7	1,000
Peso de nascimento (g)*	2920 ± 810	2800 ± 650	0,136
PIG	24 (16)	34 (23)	0,143
VPP ao nascimento (%)	19 (13)	17 (11)	0,754

* $\bar{x} \pm DP$ *IMC = Índice de massa corporal*

VPP = Ventilação com pressão positiva PIG = Pequeno para a idade gestacional

A Tabela 2 apresenta a comparação entre os dois grupos quanto às concentrações de malondialdeído e das enzimas antioxidantes, no colostro e leite maduro. Verifica-se nessa tabela que na pré-eclâmpsia foram detectados valores significativamente maiores da enzima catalase (CAT) no colostro, e menores concentrações de MDA tanto no colostro como no leite maduro.

TABELA 2. Concentrações médias de malondialdeído e de enzimas antioxidantes no colostro e leite maduro dos grupos pré-eclâmpsia e normotensas

Variáveis		Pré-eclâmpsia (n= 150)	Normotensas (n= 150)	<i>P valor*</i>
MDA	Colostro	12 ± 10	17 ± 15	<0,001
	Maduro	22 ± 27	38 ± 68	0,003
SOD	Colostro	0,05 ± 0,04	0,04 ± 0,03	0,068
	Maduro	0,04 ± 0,04	0,05 ± 0,04	0,476
CAT	Colostro	560 ± 677	317 ± 359	<0,001
	Maduro	132 ± 151	129 ± 166	0,915
GPx	Colostro	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,282
	Maduro	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,586

MDA = Malondialdeído SOD = Superóxido dismutase CAT = Catalase

GPx = Glutathione Peroxidase

A Tabela 3 mostra a análise dos marcadores oxidantes/antioxidantes no leite materno considerando não apenas o efeito do grupo (pré-eclâmpsia X normotensa), mas também a interação com o tempo (colostro X leite maduro), sendo as diferenças entre grupos identificadas por letras minúsculas e o efeito do tempo caracterizado por letras maiúsculas. Como se observa nessa tabela não houve interação entre grupo e tempo. Em ambos os grupos a concentração de MDA aumentou e a de CAT diminuiu com a progressão da lactação, enquanto a SOD aumentou nas normotensas e a GPx permaneceu estável (Tabela 3).

TABELA 3. Concentrações médias de malondialdeído e enzimas antioxidantes, nos grupos pré-eclâmpsia e normotensas considerando a interação grupo-tempo de lactação

Variáveis*	Tempo lactação	Pré-eclâmpsia (n= 150)	Normotensas (n= 150)	P valor (interação grupo-tempo)
MDA (nmol/mg proteína)	Colostro	12 ± 11 aA	17 ± 15 bA	0,593
	Maduro	22 ± 27 aB	38 ± 68 bB	
SOD (U/mL)	Colostro	0,05 ± 0,04 aA	0,04 ± 0,03 bA	0,073
	Maduro	0,04 ± 0,04 aA	0,05 ± 0,04 aB	
CAT (nmol/min/mL)	Colostro	560 ± 677 aA	317 ± 359 bA	0,473
	Maduro	132 ± 151 aB	130 ± 166 aB	
GPx (nmol/min/mL)	Colostro	0,008 ± 0,005	0,008 ± 0,007	0,406
	Maduro	0,009 ± 0,081	0,010 ± 0,010	

Letra minúscula = comparação entre grupos: Pré-eclâmpsia X Normotensas

Letra maiúscula = comparação entre Colostro X Leite maduro

Médias seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5%

*MDA= Malondialdeído SOD= Superóxido dismutase CAT= Catalase GPx= Glutathione Peroxidase

Como algumas características maternas diferiram entre os grupos, foi realizada análise multivariada com controle dos potenciais fatores de confusão: IMC materno, tabagismo, bolsa rota > 18 horas, cesárea e pequeno para a idade gestacional.

A Tabela 4 mostra que, mesmo com ajuste dos fatores confundidores, o colostro das puérperas com pré-eclâmpsia apresentou concentração significativamente menor de oxidante (MDA) e maior quantidade de catalase.

TABELA 4. Concentrações médias de malondialdeído e enzimas antioxidantes no colostro dos grupos pré-eclâmpsia (PE) e normotensas (Normo), com ajuste dos fatores de confusão*

Variáveis X±DP	Pré-eclâmpsia (n=150)	Normotensas (n=150)	P valor*
MDA (nmol/mg proteína)	12 ± 17	17 ± 31	0,001
SOD (U/mL)	0,06 ± 0,08	0,05 ± 0,05	0,136
CAT (nmol/min/mL)	474 ± 1334	319 ± 578	0,008
GPx (nmol/min/mL)	0,007 ± 0,010	0,007 ± 0,010	0,685

*Ajustado para IMC e tabagismo materno, bolsa rota > 18 horas, cesárea e pequeno para idade gestacional

No leite maduro, com ajuste dos fatores de confusão, as concentrações de oxidante/antioxidantes não diferiram entre os grupos, como mostra a Tabela 5.

TABELA 5. Concentrações médias de malondialdeído e enzimas antioxidantes no leite maduro dos grupos pré-eclâmpsia (PE) e normotensas (Normo), com ajuste dos fatores de confusão*

Variáveis X±DP	Pré-eclâmpsia (n=90)	Normotensas (n=95)	P valor*
MDA (nmol/mg proteína)	29 ± 74	31 ± 70	0,753
SOD (U/mL)	0,04 ± 0,07	0,05 ± 0,08	0,443
CAT (nmol/min/mL)	83 ± 183	88 ± 193	0,707
GPx (nmol/min/mL)	0,007 ± 0,008	0,008 ± 0,010	0,436

*Ajustado para IMC e tabagismo materno, bolsa rota > 18 horas, cesárea e pequeno para idade gestacional

A tabela 6 mostra o efeito da progressão da lactação nas concentrações de oxidante/antioxidantes, com ajuste dos fatores de confusão. Observa-se nessa tabela que, ao comparar o colostro com o leite maduro, a concentração de MDA aumentou e a de CAT diminuiu nos 2 grupos, e nas normotensas a SOD aumentou.

TABELA 6. Comparação entre colostro e leite maduro quanto às concentrações médias de malondialdeído e das enzimas antioxidantes em cada grupo, com ajuste dos fatores de confusão*

Variáveis		Pré-eclâmpsia	Normotensas
X ± DP		(n=150)	(n=150)
MDA (nmol/mg proteína)	Colostro	15 ± 35	17 ± 27
	Maduro	36 ± 170	33 ± 67
P valor*		<0,001	<0,001
SOD (U/mL)	Colostro	0,03 ± 0,16	0,05 ± 0,04
	Maduro	0,03 ± 0,09	0,06 ± 0,06
P valor*		0,489	0,031
CAT (nmol/min/mL)	Colostro	512 ± 1565	282 ± 800
	Maduro	127 ± 156	124 ± 175
P valor*		<0,001	<0,001
GPx (nmol/min/mL)	Colostro	0,005 ± 0,010	0,007 ± 0,010
	Maduro	0,005 ± 0,010	0,008 ± 0,010
P valor*		0,330	0,054

*Ajustado para IMC e tabagismo materno, bolsa rota > 18 horas, cesárea e pequeno para idade gestacional

Como a PE é condição de risco para nascimento prematuro foram comparadas as concentrações de MDA e enzimas antioxidantes em 2 sub-grupos: prematuros e termos.

No colostro essa comparação mostrou que na PE, em relação ao grupo controle, o leite materno apresenta maior efeito protetor antioxidante tanto em prematuros como nos termos (Tabela 7).

TABELA 7. Comparação das concentrações médias de malondialdeído e das enzimas antioxidantes no colostro dos sub-grupos prematuros e termos, na pré-eclâmpsia e normotensas

Variáveis		Pré-eclâmpsia	Normotensas	<i>P</i> valor (PE x Normo)
MDA (nmol/mg proteína)	PT*	10 ± 7	14 ± 8	0,010
	T**	13 ± 12	19 ± 19	0,010
	<i>P</i> valor (PT x T)	0,124	0,067	
SOD (U/mL)	PT	0,065 ± 0,043	0,047 ± 0,036	0,031
	T	0,036 ± 0,004	0,030 ± 0,025	0,165
	<i>P</i> valor (PT x T)	<0,001	0,002	
CAT (nmol/min/mL)	PT	764 ± 1029	263 ± 340	<0,001
	T	487 ± 480	333 ± 335	0,013
	<i>P</i> valor (PT x T)	0,032	0,226	
GPx (nmol/min/mL)	PT	0,007 ± 0,005	0,008 ± 0,010	0,794
	T	0,009 ± 0,006	0,007 ± 0,004	0,156
	<i>P</i> valor (PT x T)	0,196	0,856	

*PT= Prematuros (n= 104) **T= Termos (n= 196)

No leite maduro não houve diferença nas concentrações de oxidante/antioxidantes entre prematuros e termos, exceto pela maior concentração de MDA nas mães de termo normotensas (Tabela 8).

TABELA 8. Concentrações médias de malondialdeído e de enzimas antioxidantes no leite maduro dos sub-grupos prematuros e termos, na pré-eclâmpsia e normotensas.

Variáveis		Pré-eclâmpsia	Normotensas	<i>P</i> valor (PE x Normo)
MDA (nmol/mg proteína)	PT*	19 ± 20	13 ± 9	0,144
	T**	23 ± 29	57 ± 86	0,009
	<i>P</i> valor (PT x T)	0,594	0,005	
SOD (U/mL)	PT	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,03	0,968
	T	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,04	0,575
	<i>P</i> valor (PT x T)	0,197	0,171	
CAT (nmol/min/mL)	PT	105 ± 71	103 ± 118	0,965
	T	140 ± 167	147 ± 192	0,855
	<i>P</i> valor (PT x T)	0,446	0,275	
GPx (nmol/min/mL)	PT	0,009 ± 0,008	0,011 ± 0,012	0,523
	T	0,010 ± 0,096	0,009 ± 0,009	0,944
	<i>P</i> valor (PT x T)	0,809	0,517	

*PT= Pré-termo (n=44) **T= Termo (n=141)

6. DISCUSSÃO

Está bem estabelecido que a hipoperfusão placentária na pré-eclâmpsia aumenta o estresse oxidativo na placenta, na circulação materna e fetal (Bharadwaj et al, 2017; Aouache et al, 2018). Entretanto a repercussão funcional dessa condição na glândula mamária e consequentemente na composição oxidante/antioxidante do leite materno ainda é pouco estudada e os dados disponíveis não são uniformes.

O principal resultado de nosso estudo foi documentar a menor concentração de MDA e maior concentração de enzimas antioxidantes no colostro de mães com pré-eclâmpsia em comparação às normotensas, sugerindo que a composição do leite materno se modifica na pré-eclâmpsia, no sentido de proteger o recém-nascido. Esse achado é importante pois reforça a adequação do leite materno para todos os recém-nascidos, independentemente da idade gestacional e das doenças maternas.

Resultados semelhantes ao nosso foram relatados em um estudo que avaliou a concentração de polifenóis e de MDA no colostro de 40 mulheres (18 pré-eclâmpsia e 22 normotensas) e mostrou menores valores de MDA e maior concentração de polifenóis no colostro das puérperas com pré-eclâmpsia, sugerindo os autores que o maior conteúdo fenólico confere maior resistência ao estresse oxidativo no colostro, o que justificaria a menor concentração de MDA (Silberstein et al, 2019).

Diferente resultado foi obtido por Erdem e col (2012) que avaliaram 46 mulheres hipertensas (31 pré-eclâmpsia e 15 hipertensão crônica) e 60 normotensas e encontraram no sangue materno e de cordão umbilical, bem como no colostro das hipertensas menor capacidade antioxidante total e maior índice de estresse oxidativo, sugerindo os autores que a condição de estresse oxidativo pode persistir no pós-parto e ser transmitida ao recém-nascido pelo leite materno. Entretanto os autores não avaliaram possíveis fatores de confusão como idade gestacional, IMC e tabagismo materno (Erdem et al, 2012).

No presente estudo mostramos que na pré-eclâmpsia a proteção antioxidante do colostro é maior que no grupo controle tanto nas gestações de termo como de pré-termo, sendo mais evidente nos prematuros. Esse é um achado importante, uma vez que a pré-eclâmpsia é uma causa frequente de

nascimentos prematuros (Rugolo et al., 2011; Rugolo et al., 2012; Taysi et al., 2018).

Estudo recente mostrou que a concentração de antioxidantes do leite materno é inversamente proporcional à idade gestacional, sugerindo que a composição antioxidante do leite materno é adaptada para favorecer os recém-nascidos, ou seja quanto menor a idade gestacional maior proteção antioxidante no leite materno. Esse estudo também mostrou que a concentração de antioxidantes diminui durante o primeiro mês de lactação, semelhante ao observado em nosso estudo (Gila-Diaz et al, 2020).

Um achado interessante em nosso estudo foi a modificação na composição oxidante/antioxidante com o progredir da lactação, caracterizada pela diminuição de antioxidantes e aumento do biomarcador de peroxidação lipídica (MDA), semelhante ao descrito por Yuksel e col (2015). Esse aumento na concentração de componentes oxidantes pode ser explicado pelo aumento no conteúdo lipídico do leite materno, principalmente ácidos graxos poliinsaturados que são propensos à oxidação (Sahin et al, 2020). Sabe-se que a quantidade e a composição do leite materno se modificam no decorrer da lactação, e a dieta materna exerce forte influência, principalmente sobre a concentração de gorduras e de micronutrientes no leite materno (Gopalakrishma & Hand, 2020). Além da dieta, o estado nutricional materno é outro fator que pode estar associado à composição do leite humano (Bzikowska-Jura et al, 2018).

A divergência nos dados da literatura sobre a condição oxidante/antioxidante do leite materno pode ser devida ao pequeno número amostral dos estudos, bem como às diferenças na casuística estudada e nos métodos de avaliação da condição oxidante/antioxidante. Entretanto, a maioria dos estudos, inclusive o nosso, sugere que o leite materno oferece proteção antioxidante para os recém-nascidos, especialmente aqueles de mães com pré-eclâmpsia, que são mais susceptíveis e expostos ao estresse oxidativo.

Sabe-se que a glândula mamária é um dos poucos órgãos que passam por ciclos de crescimento, diferenciação e involução durante a vida pós-natal. Nela ocorrem grandes alterações no período de lactação, que são essenciais para a secreção de gordura e proteína do leite materno (Pepper et al, 2000; Andres e Djonov, 2010; Bao et al, 2016).

Algumas doenças e complicações da gestação, como o diabetes, hipertensão arterial, pré-eclâmpsia e a prematuridade podem alterar a composição do leite materno (Chapman, 2013; Dermirci et al, 2018) e exercer influência negativa no aleitamento materno, incluindo o atraso no início da lactogênese e a redução no tempo de aleitamento materno exclusivo (Dangat et al, 2020).

Estudos em animais mostram que a insuficiência útero-placentária, compromete gravemente o desenvolvimento da glândula mamária e altera a produção do leite (Briffa et al, 2017). Considerando que na pré-eclâmpsia ocorre insuficiência placentária, esse poderia ser um mecanismo para explicar as alterações na composição do leite materno encontradas no presente estudo. Segundo Bardanzellu et al (2020) o desenvolvimento anormal da placenta na pré-eclâmpsia desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica que, por sua vez, causa vasoconstrição multiorgânica e lesão endotelial, presumivelmente incluindo a glândula mamária. No estudo de Dangat et al (2020) puérperas que tiveram insuficiência placentária em decorrência de alguma complicação da gestação, como a pré-eclâmpsia, apresentaram alterações no desenvolvimento da glândula mamária e quantidade de leite humano comprometida.

Em estudo prévio, observamos que lactantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia apresentaram níveis aumentados de citocinas inflamatórias no leite materno, especificamente no colostro e menores níveis no leite maduro, em comparação às lactantes normotensas, podendo ser este um mecanismo compensatório da glândula mamária, visando a imuno-proteção do recém-nascido através do leite materno (Freitas et al, 2019).

Nosso estudo tem algumas limitações: não investigamos a condição oxidante/antioxidante na circulação materna e do recém-nascido, o que permitiria melhor interpretar os mecanismos fisiológicos envolvidos na modificação da composição do leite materno na pré-eclâmpsia. Também não avaliamos o impacto das alterações do leite materno na evolução clínica dos recém-nascidos, e tivemos predomínio de gestações de termo. Entretanto, nosso estudo teve rigoroso critério metodológico e pareamento entre grupos. Assim, frente à escassa literatura disponível sobre esse tema, nossos resultados acrescentam novos dados que reforçam a importância do aleitamento materno

para todos os recém-nascidos, e a adequação do leite materno, especialmente o colostro, nas situações em que o recém-nascido é exposto às repercussões de doenças maternas/gestacionais como a pré-eclâmpsia.

Nossos resultados reforçam a importância do aleitamento materno para todos os recém-nascidos. Em gestações complicadas por doenças como a pré-eclâmpsia, parece haver adaptações na glândula mamária, que resultam em alteração na composição do leite materno, visando otimizar seu efeito protetor.

7. CONCLUSÃO

Na pré-eclâmpsia a condição oxidante/antioxidante do leite materno, principalmente do colostro modifica-se, com menor conteúdo oxidante e maior proteção antioxidante, o que pode beneficiar os recém-nascidos, especialmente os prematuros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade Jr DR, Souza RB, Santos AS, Andrade DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol* 2005;31:60-8.

Andres AC, Djonov V. The mammary gland vasculature revisited. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15(3):319-28. doi: 10.1007/s10911-010-9186-9.

Aouache R, Biquard L, Vaiman D, Miralles F. Oxidative stress in preeclampsia and placental diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: 1496; doi:10.3390/ijms19051496.

Aversa S, Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Cuppari C, David A, et al. Ventilation strategies for preventing oxidative stress-induced injury in preterm infants with respiratory disease: an update. *Pediatr Respir Rev*. 2016; 17: 71-9.

Aycicek A, Erel O. Total oxidant/antioxidant status in jaundiced newborns before and after phototherapy. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(4):319-22.

Bardanzellu F, Puddu M, Fanos V. The human breast milk metabolome in preeclampsia, gestational diabetes, and intrauterine growth restriction: Implications for child growth and development. *J Pediatr*. 2020;221:S20-S28. doi: 10.1016/j.jpeds.2020.01.049.

Bao Z, Lin J, Ye L, Zhang Q, Chen J, Yang Q, Yu Q. Modulation of mammary gland development and milk production by growth hormone expression in GH transgenic goats. *Front Physiol*. 2016;7:278. doi: 10.3389/fphys.2016.00278.

Bharadwaj S, Bhat BV, Vickneswaran V, Adhisivam B, Bobby Z, Habeebullah S. Oxidative stress in preeclamptic mother – newborn dyads and its correlation with

early neonatal outcome – a case control study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017; 31(12):1548-553.

Briffa JF, O'Dowd R, Moritz KM, Romano T, Jedwab LR, McAinch AJ, Hryciw DH, Wlodek ME. Uteroplacental insufficiency reduces rat plasma leptin concentrations and alters placental leptin transporters: ameliorated with enhanced milk intake and nutrition. *J Physiol.* 2017;595(11):3389-407. doi: 10.1113/JP273825.

Brown MA, Magge LA, Kenny LC, Karumanchi AS, McCarthy FP, Saito S, et al. on behalf of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens.* 2018;13:291-310. doi: 10.1016/j.preghy.2018.05.004.

Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, Moffett A. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. *BMJ.* 2019;366:l2381. doi: 10.1136/bmj.l2381.

Bzikowska-Jura A, Czerwonogrodzka-Senczyna A, Olędzka G, Szostak-Węgierek D, Weker H, Wesołowska A. Maternal nutrition and body composition during breastfeeding: association with human milk composition. *Nutrients.* 2018;10(10):1379. doi: 10.3390/nu10101379.

Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JA, Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of preeclampsia. *Biol Res.* 2006; 39:229-36.

Chapman DJ. Human milk dose in the first month is inversely associated with sepsis and NICU costs. *J Hum Lact.* 2013; 29:339-40.

Castellote C, Casillas R, Ramírez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Castell M, Moretones MG. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr.* 2011;141:1181–187.

Chiarello DI, Abad C, Rojas D, Toledo F, Vázquez CM, Mate A, et al. Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(2):165354. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.12.005.

Chen Y, Fantuzzi G, Schoeny M, Meier P, Patel A. High-dose human milk feedings decrease oxidative stress in premature infant. *J Parenter Enteral Nutr.* 2018; 43(1): 126-32.

Cipierre C, Haÿs S, Maucort-Boulch D, Steghens JP, Picaud JC. Malondialdehyde adduct to hemoglobin: a new marker of oxidative stress suitable for full-term and preterm neonates. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:694014. doi: 10.1155/2013/694014.

Coelho TM, Martins MG, Viana E, Mesquita MRS, Camano L, Sass N. Proteinúria nas síndromes hipertensivas da gestação: prognóstico materno e perinatal. *Rev Assoc Med Bras.* 2004; 50: 207-13.

Cordero L, Valentine CJ, Samuels P, Giannone PJ, Nankervis CA. Breastfeeding in women with severe preeclampsia. *Breastfeed Med.* 2012; 7(6): 457-63.

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.

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, Deepti U, Kilari A, Sharma U, Kemse N, Mehendale S, et al. Altered breast milk components in preeclampsia; An in-vitro próton NMR spectroscopy study. *Clin Chim Acta.* 2016; 463: 75-83.

Dangat K, Khaire A, Joshi S. Cross talk of vascular endothelial growth factor and neurotrophins in mammary gland development. *Growth Factors*. 2020;38(1):16-24. doi: 10.1080/08977194.2020.1792469.

Derzsy Z, Prohászka Z, Rigó Jr J, Füst G, Molvarec A. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol*. 2010; 47(7-8): 1500-506.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005; 15: 316-28.

Deniz A, Aydemir O, Saglik AC, Sekili Z, Kiraz ZK, Kar E, Tekin N, Evaluation of total antioxidant capacity and total oxidant status of preterm and term breast milk during the course of lactation and within a nursing session. *Am J Perinatol*. 2021;38(3):258-264. doi: 10.1055/s-0039-1696715.

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.

Erdem M, Harna M, Harna IM, Arikan I, Barut A. Comparative study of oxidative stress in maternal blood with that of cord blood and maternal milk. *Arch Gynecol Obstet*. 2012; 285 :371-75.

Fenton TR, Kim JH. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatr*. 2013; 20;13:59. doi: 10.1186/1471-2431-13-59.

Ferreira RC, Fragoso MBT, Bueno NB, Goulart MOF, de Oliveira ACM. Oxidative stress markers in preeclamptic placentas: A systematic review with meta-analysis. *Placenta*. 2020; 99:89-100. doi: 10.1016/j.placenta.2020.07.023.

Ferrão MHL, Pereira ACL, Gersgorin HCTS, Paula TAA, Correa RRM, Castro ECC. Efetividade do tratamento de gestantes hipertensas. Rev Assoc Med Bras. 2006; 52: 390-94.

Freitas NA, Santiago LTC, Kurokawa CS, Meira Junior JD, Corrente JE, Rugolo LMSS. Effect of preeclampsia on human milk cytokine levels. J Matern Fetal Neonatal Med. 2019;32(13):2209-2213. doi: 10.1080/14767058.2018.1429395.

Friel JK, Martin SM, Langdon M, Herzberg GR, Buettner GR. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. Pediatr Res. 2002;51(5):612-8. doi: 10.1203/00006450-200205000-00012.

Gila-Díaz A, Herranz Carrillo G, Cañas S, Saenz de Pipaón M, Martínez-Orgado JA, Rodríguez-Rodríguez P, et al. Influence of maternal age and gestational age on breast milk antioxidants during the first month of lactation. Nutrients. 2020;12(9): 2569. doi: 10.3390/nu12092569.

Guerby P, Tasta O, Swiader A, Pont F, Bujold E, Parant O, et al. Role of oxidative stress in the dysfunction of the placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia. Redox Biol. 2021;40:101861. doi: 10.1016/j.redox.2021.101861.

Gopalakrishna KP, Hand TW. Influence of maternal milk on the neonatal intestinal microbiome. Nutrients. 2020;12(3):823. doi: 10.3390/nu12030823.

Hanna N, Ahmed K, Anwar M, Petrova A, Hialt M, Hegyi T. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2004; 89; F518-20.

Hilali N, Kocyigit A, Demir M, Camuzcuoglu A, Incebiyik A, Camuzcuoglu H, et al. DNA damage and oxidative stress in patients with mild preeclampsia and offspring. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013; 170: 377-80.

Henderson JJ, Hartmann PE, Newnham JP, Simmer K. Effect of preterm birth and antenatal corticosteroid treatment on lactogenesis II in women. *Pediatrics*. 2008;121(1):e92-100. doi: 10.1542/peds.2007-1107.

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.

Marseglia L, D'Angelo G, Manti S, Arrigo T, Barberi I, Reiter RJ, Gitto E. Oxidative stress-mediated aging during the fetal and perinatal periods. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:358375. doi: 10.1155/2014/358375.

Kaur G, Mishra S, Sehgal A, Prasad R. Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in pregnancy with preeclampsia. *Med Cell Biochem*. 2008; 313: 37-44.

Kapadia VS, Chalak LF, Sparks JE, Allen JR, Savani RC, Wyckoff MH. Resuscitation of preterm neonates with limited versus high oxygen strategy. *Pediatrics*. 2013;132(6):e1488-96. doi: 10.1542/peds.2013-0978

Koletzko B, Sauerwald U, Keicher U, Saule H, Wawatschek S, Böhles H, et al. Fatty acid profiles, antioxidant status, and growth of preterm infants fed diets without or with long-chain polyunsaturated fatty acids. A randomized clinical trial. *Eur J Nutr*. 2003;42(5):243-53. doi: 10.1007/s00394-003-0418-2.

Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:711-60. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.

Mohamed I, Elremaly W, Rouleau T, Lavoie JC. Oxygen and parenteral nutrition two main oxidants for extremely preterm infants: 'It all adds up'. *J Neonatal Perinatal Med*. 2015; 8:189-97.

Moura ERF, Oliveira CGS, Damasceno AKC, Pereira MMQ. Fatores de risco para síndrome hipertensiva específica da gestação entre mulheres hospitalizadas com pré-eclâmpsia. *Cogitare Enferm.* 2010, 15: 250-55.

Namdev S, Bhat V, Adhisivam Zachariah, B. Oxidative stress and antioxidant status among neonates born to mothers with pre-eclampsia and their early outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014; 27(14):1481-484.

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

Nash P. Experimental and clinical studies of oxidative stress in preeclampsia [dissertação]. Uppsala: Faculty of Medicine Uppsala University; 2007.

Negi R, Pande D, Karki K, Kumar A, Khanna RS, Khanna HD. Association of oxidative DNA damage, protein oxidation and antioxidant function with oxidative stress induced cellular injury in pre-eclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation. *Chem Biol Interact.* 2014; 208: 77-83.

Nogueira C, Borges F, Ramalho A. Antioxidant micronutrients in neonates. *Rev Paul Pediatr.* 2010; 28(4): 381-86.

Novo JLVG, Gianini RJ. Mortalidade materna por eclâmpsia. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.* 2010, 10: 209-17.

Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Palomino N, Robles R, Mataix J, et al. Oxidative stress in erythrocytes from premature and full-term infants during their first 72h of life. *Free Radic Res.* 2003; 37: 317–22.

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.

Păduraru L, Dimitriu DC, Avasiloiu AL, Moscalu M, Zonda GI, Stamatina M. Total antioxidant status in fresh and stored human milk from mothers of term and preterm neonates. *Pediatr Neonatol*. 2018;59(6):600-605. doi: 10.1016/j.pedneo.2018.02.004.

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

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.

Peraçoli JC, Parpinelli MA. Síndromes hipertensivas da gestação: identificação de casos graves. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005; 27: 627-34.

Pepper MS, Baetens D, Mandriota SJ, Di Sanza C, Oikemus S, Lane TF, et al. Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. *Dev Dyn*. 2000;218(3):507-24. doi: 10.1002/1097-0177(200007)218:3<507::AID-DVDY1012>3.0.CO;2-5.

Peres LAB. Pré-eclâmpsia: papel do estresse oxidativo e resposta imune. *J Bras Nefrol*. 2007; 29: 164-70.

Perrone S, Tataranno LM, Stazzoni G, Ramenghi L, Buonocore G. Brain susceptibility to oxidative stress in the perinatal period. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015; 28 Suppl 1: 2291-295.

Perrone S, Laschi E, Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in the fetus and in the newborn. *Free Radic Biol Med*. 2019; 142: 23-31.

Poon LC, Shennan A, Hyett JA, Kapur A, Hadar E, Divakar H, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on Preeclampsia (PE): A Pragmatic Guide for first trimester screening and prevention. *Int J Gynaecol Obstet*. 2019;145(Suppl 1): 1–33.

Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Linde J, Bompadre S, Battino M, et al. Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free Radic Res*. 2006;40(2):199-206. doi: 10.1080/10715760500404805.

Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract*. 2013; 22(Suppl1): 8–19.

Raijmakers MTM, Roes EM, Poston L, Steegers EAP, Peters WHM. The transient increase of oxidative stress during normal pregnancy is higher and persists after delivery in women with pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008; 138: 39-44.

Rede Nacional de Banco de Leite Humano – Normas Técnicas, Disponível em: <http://www.bvsam.iciict.fiocruz.br/normastecnicas/coleta.pdf>. Acessado em: 12/10/2019.

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 LMSS, Bentlin MR, Trindade CEP. Preeclampsia: Effect on the fetus and newborn. *Neoreviews* 2011;12: 198-206.

Rugolo LMSS, Bentlin MR, Trindade CEP. Preeclampsia: Early and late neonatal outcomes. *Neoreviews* 2012;13; e532.

Rugolo LM, de Sá MP, Kurokawa CS, Madoglio RJ, Bentlin MR, Rugolo A Jr, Corrente JE. There is no difference in nitric oxide metabolites and neonatal outcome between premature infants born to pre-eclamptic and those born to normotensive women. *Pediatr Int Child Health*. 2015;35: 47-52.

Sahin S, Ozdemir T, Katipoglu N, Akcan AB, Kaynak Turkmen M. Comparison of changes in breast milk macronutrient content during the first month in preterm and term infants. *Breastfeed. Med.* 2020;15, 56–62.

Sharma JB, Sharma A, Bahadur A, Vimala N, Satyam A, Mittal S. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Int J Gynecol Obstet.* 2006; 94: 23-7.

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.

Shekeeb Shahab M, Kumar P, Sharma N, Narang A, Prasad R. Evaluation of oxidant and antioxidant status in term neonates: a plausible protective role of bilirubin. *Mol Cell Biochem.* 2008;317(1-2):51-9. doi: 10.1007/s11010-008-9807-4.

Silberstein T, Hamou B, Cervil S, Barak T, Burg A, Saphier O. Colostrum of preeclamptic women has a high level of polyphenols and better resistance to oxidative stress in comparison to that of healthy women. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:1380605. doi: 10.1155/2019/1380605.

Souza AR, Amorim MR, Costa AAR, Neto CN. Tratamento anti-hipertensivo na gravidez. *Acta Med Port.* 2010; 23:77-84.

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

Tsukahara H, Jiang MZ, Ohta N, Sato S, Tamura S, Hiraoka M, et al. Oxidative stress in neonates: evaluation using specific biomarkers. *Life Sci.* 2004; 75: 933-38.

Trindade CEP, Rugolo LMSS. Free radicals and neonatal diseases. *Neoreviews.* 2007; 8: 522-32.

Vancini RL, Lira CAB, Aboulafia J, Nouailhetas VLA. Radical livre, estresse oxidativo e exercício [monografia da internet]. São Paulo: UNIFESP; 2005 [acesso 09 jul 2018]. Disponível em: www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf.

Vanderlelie J, Venardos K, Clifton V, Gude N, Clarke F, Perkins A. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta*. 2005; 26:53-8.

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(1):e115-23. doi: 10.1542/peds.2005-2382.

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(4):e953-9. doi: 10.1542/peds.2006-3227.

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

Weber D, Stuetz W, Bernhard W, Franz A, Raith M, Grune T, Breusing N. Oxidative stress markers and micronutrients in maternal and cord blood in relation to neonatal outcome. *Eur J Clin Nutr*. 2014; 68: 215-22.

World Health Organization. Guidelines on Optimal Feeding of Low Birth-Weight Infants in Low- and Middle-Income Countries [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2011. PMID: 26042325.

Yuksel, S.; Yigit, A.A.; Cinar, M.; Atmaca, N.; Onaran, Y. Oxidant and antioxidant status of human breast milk during lactation period. *Dairy Sci. Technol.* 2015; 95: 295–302.

Yzydorczyk C, Mitanchez D, Buffat C, Ligi I, Grandvullemin I, Boubred F, Simeoni U. Oxidative stress after preterm birth: origins, biomarkers, and possible therapeutic approaches. *Arch Pediatr.* 2015; 22:1047-55.

ANEXOS

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da pré-eclampsia na composição do leite materno e no crescimento dos recém-nascidos no primeiro mês de vida.

Pesquisador: NATÁLIA ALVES DE FREITAS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42987315.8.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.011.745

Data da Relatoria: 06/04/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa para obtenção do título de mestre.

Denominou-se como sendo um estudo longitudinal de corte única concorrente de 30 dias.

Afirma a autora que A síndrome hipertensiva da gestação (SHG) é uma complicação importante na gestação e tem importante causa de morbidade materna e neonatal. A pré-eclampsia (PE) incide em 5 a 10% das gestações e é a manifestação mais frequente da SHG. Ressaltou-se que no momento, são escassos os dados sobre o crescimento de filhos de mães com PE, bem como os estudos sobre a composição do leite dessas mães. Contudo, tem-se que o aleitamento materno é padrão ouro na alimentação dos recém-nascidos e a composição do leite materno de mães com PE é pouco conhecida sendo que existem controvérsias quanto ao crescimento dos filhos de mães com PE.

Assim, elenca a hipótese de estudo no sentido de que existem diferenças significativas em relação às respostas das seguintes questões: a pré-eclampsia altera a composição do leite materno; como crescem os filhos de mães com pré-eclampsia.

Objetivo da Pesquisa:

Tem por objetivo analisar a composição do leite materno e o crescimento dos filhos de mães com

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 13.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

pré-eclampsia. Além disso elenca como objetivos específicos analisar a composição do colostro e do leite maduro de mães com pré-eclampsia, em comparação a um grupo controle de mães normotensas, nos seguintes aspectos: - valor energético e macronutrientes: calorias, proteínas, carboidratos e lipídios.- mediadores inflamatórios: Interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) e TNF; - mediadores de estresse oxidativo e anti-oxidantes: malondialdeído, glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase.- Imunoglobulina A (IgA). Avaliará ainda o crescimento dos filhos de mães com pré-eclampsia e investigará os efeitos da pré-eclampsia precoce versus tardia na composição do leite materno e no crescimento dos recém-nascidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o projeto há riscos quanto à coleta de leite. Contudo, bem ressalta a pesquisadora que quanto à coleta do leite materno poderá ocorrer apenas algum grau de desconforto materno associado à ordena do leite, entretanto, há que se considerar que este procedimento já é realizado rotineiramente no serviço. Em relação ao volume de leite ordenhado, este será pequeno (3 ml), e não irá comprometer a adequada ingestão de leite materno pelo recém-nascido. Para o recém-nascido consideramos que poderá ocorrer apenas um grau leve de desconforto no momento da medida da dobra da pele. O seguimento do crescimento de recém nascido, filho de mãe com pré-eclampsia é uma rotina do serviço visando detectar precocemente e minimizar os distúrbios de crescimento.

No entanto trará benefícios haja vista que poderá ser melhor estudada a composição do leite materno visando otimizar o seu uso, além de poder detectar precocemente distúrbios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A autora apresenta que serão 140 participantes tendo por critério de inclusão o nascimento na Maternidade do serviço (Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP), ausência de diabetes mellitus materno, ausência de uso materno de drogas ilícitas e/ou álcool, ausência de malformação múltipla ou infecção congênita no recém-nascido, obtenção de amostra de colostro.

Terá por critério de exclusão não obtenção da avaliação no final do primeiro mês será considerada perda da coorte.

Foi previsto uma amostra de 70 casos de PE a serem pareados pela idade gestacional com 70 casos de mães normotensas.

O grupo com pré-eclampsia será comparado a um grupo controle de mães normotensas, pareado pela idade gestacional e recrutado aleatoriamente durante o período de coleta de dados.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 13.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capelup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 1.011.745

Se o tamanho amostral do grupo pré-eclampsia permitir, será realizada análise de sub-grupo, comparando-se pré-eclampsia precoce versus tardia.

Os recém-nascidos serão estratificados em função da idade gestacional: termos e pré-termos e também em função da adequação do peso ao nascer: adequados e pequenos para a idade gestacional.

Serão avaliados: a composição do leite materno e o estado nutricional dos recém-nascidos em dois grupos: pré-eclampsia versus normotensas e em dois momentos de avaliação: nascimento e final do primeiro mês de vida.

As informações sobre a gestação, o nascimento e evolução neonatal serão obtidas a partir das anotações do prontuário do recém-nascido.

Por fim será realizada análise estatística.

Apesar de constar no preenchimento das informações da Plataforma Brasil que o estudo terá início em 03/03/2015, tem-se que para fins de análise bioética da pesquisa a data de 01/07/2015, haja vista tratar-se efetivamente da coleta de dados, não havendo de se falar em quaisquer prejuízos tanto para os participantes, como para o pesquisador, por tratar-se de mera formalidade, bem como evidenciar-se que o estudo não está em andamento. Posteriormente o estudo terá por término a data de 20/02/2017.

Ao final a pesquisadora indica que a pesquisa terá um custo estimado de R\$ 87.685,76 através de financiamento próprio, sendo que será encaminhado à FAPESP, como projeto regular, para captação de recursos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No que tange aos termos e autorizações, tem-se que foram devidamente apresentados nos termos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, quais sejam a autorização e cumprimento da diretora da Faculdade de Medicina de Botucatu; declaração de cumprimento das Resoluções; declaração de ciência e autorização do chefe do departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP; declaração de ciência e autorização da chefe do departamento de Pediatria, bem como sua autorização para coleta de dados.

No entanto, não apresentou declaração de ciência e autorização do Superintendente do HCFMB, local onde será realizada a pesquisa.

Em relação à adequação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido tem-se que foi formulado em linguagem acessível e clara. Apesar de conter expressão 'pré-eclampsia', não há que se dizer que tal expressão possa obstar a pesquisa, muito menos desrespeitar os ditames éticos da RES.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 1.011.745

466/12 do CNS, haja vista que se torna inerente ao estudo detalhado. Neste sentido é possível averiguar, como dito alhures, que a linguagem se mostra acessível e clara.

De mais a mais, há de se ressaltar o zelo da pesquisadora quanto ao detalhamento da pesquisa, bem como linguagem utilizada no projeto e nos demais documentos, o que evidencia a responsabilidade ética para com este Comitê e em relação aos participantes da pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante dos termos supra relatados aponto a seguinte recomendação: apresentação da declaração de ciência e autorização do Superintendente do HCFMB ou de quem lhe faça as vezes, haja vista tratar-se do local onde será realizada a pesquisa.

Por tratar-se de questão burocrática, sugiro aprovação, uma vez que o pesquisador poderá apresentar a autorização do superintendente através de notificação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa APROVADO com recomendação, deliberado em reunião do CEP de 06 de abril de 2015, sem necessidade de envio à CONEP.

Recomendação: É necessário incluir a "Declaração de Ciência e Autorização do Superintendente do HCFMB" no item 'Notificação'.

Ao final do estudo, é necessário apresentar o "Relatório Final de Atividades".

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 13.618-970

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

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.

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