



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

**Luiza Tavares Carneiro Santiago**

**Nutrição e crescimento de recém-nascidos no  
primeiro mês de vida: Componentes  
oxidantes e anti-oxidantes no colostro e leite  
materno maduro**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor(a) em Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adjunta Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo

Luiza Tavares Carneiro Santiago

**Nutrição e crescimento de recém-nascidos  
no primeiro mês de vida: Componentes  
oxidantes e anti-oxidantes no colostro e leite  
materno maduro**

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

Orientadora: Profa. Dra. Adjunta Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo

Botucatu  
2020

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

Santiago, Luiza Tavares Carneiro.

Nutrição e crescimento de recém-nascidos no primeiro mês de vida : componentes oxidantes e anti-oxidantes no colostro e leite materno maduro / Luiza Tavares Carneiro Santiago. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo  
Capes: 40101150

1. Recém-nascidos. 2. Prematuros. 3. Aleitamento materno. 4. Antioxidantes. 5. Agentes oxidantes. 6. Desenvolvimento fetal.

Palavras-chave: Antioxidantes; Leite materno; Oxidantes; Recém-nascido prematuro; Retardo do crescimento fetal.

## *Dedicatória*

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

*À minha irmã **Julia** pelo carinho, amizade e parceria.*

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

## *Agradecimento Especial*

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

## *Outros agradecimentos*

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

À Prof.<sup>a</sup> **Cilmery Suemy Kurokawa** e a toda a equipe do laboratório de pediatria experimental pela realização das análises laboratoriais e por todo o apoio durante o desenvolvimento desse projeto.

Ao Professor Adjunto **José Eduardo Corrente** pelas análises estatísticas.

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

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

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

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

A todos os **colegas e professores** da pós-graduação em Tocoginecologia, pelo convívio, competência e disposição em compartilhar experiências.

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

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

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº 2014/12784-9) que financiou a pesquisa que deu origem a essa tese de Doutorado.

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

# *Sumário*

## **Capítulo 1 - Revisão da Literatura**

1. Prematuridade e Estresse Oxidativo.....	09
2. Nutrição do prematuro e do recém-nascido com restrição do crescimento ...	11
3. Leite materno e sua importância na nutrição neonatal .....	12
4. Composição do leite materno.....	13
5. Justificativa do estudo .....	15
6. Hipótese .....	15
7. Referências Bibliográficas .....	16

## **Capítulo 2 – Artigo 1**

1. Introdução .....	23
2. Método .....	24
3. Resultados .....	26
4. Discussão .....	29
5. Referências bibliográficas .....	33

## **Capítulo 3 – Artigo 1 em Inglês**

1. Introduction.....	37
2. Method .....	38
3. Results .....	40
4. Discussion .....	43
5. References .....	46

## **Capítulo 4 – Artigo 2**

1. Introdução.....	52
2. Método .....	53
3. Resultados .....	55
4. Discussão .....	59
5. Referências bibliográficas .....	63
<b>Anexos</b> .....	<b>66</b>

*Capítulo 1*  
*Revisão da Literatura*

---

---

## **1- Prematuridade, Estresse Oxidativo e Restrição do Crescimento Fetal**

O estresse oxidativo ocorre devido ao desbalanço entre substâncias oxidantes e antioxidantes, podendo causar dano proteico, lipídico e do DNA, resultando em lesão celular. 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 (Cipierre et al, 2013; Perrone et al, 2019).

O sistema antioxidante compreende um conjunto de substâncias enzimáticas e não enzimáticas (cobre, zinco, selênio e vitaminas C e E) que, mesmo presentes em concentrações menores àquelas dos substratos oxidáveis, retardam ou inibem a oxidação desses substratos (Nogueira et al, 2010). 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 e Rugolo, 2007).

Várias situações no período neonatal estão associadas com aumento na produção de radicais livres, incluindo: 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).

O nascimento propicia a produção de radicais livres, devido ao aumento agudo da oxigenação na transição do ambiente intra-útero hipóxico para o extra-útero. 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 estes são mais vulneráveis ao estresse oxidativo desde o nascimento e durante todo o período neonatal (Perrone et al, 2019).

O prematuro apresenta limitações nos seus mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos. Assim, várias doenças típicas dos prematuros estão associadas ao estresse oxidativo, incluindo: displasia broncopulmonar, retinopatia da prematuridade, enterocolite necrosante, hemorragia intraventricular e leucomalácia periventricular (Trindade e Rugolo, 2007; Nogueira et al, 2010; Ozsurekci e Aykac, 2016; Castillo-Castañeda et al 2017; Perrone et al, 2019).

A restrição do crescimento fetal é outra condição associada ao aumento do estresse oxidativo, sendo documentado em sangue materno e de cordão umbilical concentrações aumentadas de MDA e menor capacidade antioxidante total (Chandra et al, 2016). Um aspecto interessante foi apontado no estudo de Ferencz et al, 2015 que avaliou a condição oxidante e antioxidante de recém-nascidos com restrição do crescimento fetal, e mostrou maior grau de estresse oxidativo em sangue de cordão umbilical dos recém-nascidos de termo comparados aos prematuros (Ferencz et al, 2015).

Frente ao risco aumentado de estresse oxidativo nos prematuros e recém-nascidos com restrição do crescimento fetal, estratégias têm sido propostas visando minimizar esse risco e melhorar o prognóstico desses recém-nascidos. Entretanto o benefício da terapia antioxidante no período neonatal ainda não está estabelecido e mais estudos são necessários para que se tenha uma estratégia efetiva e segura na prevenção da lesão oxidativa. Atualmente, as opções válidas na prevenção de lesões por radicais livres incluem: o uso criterioso de oxigênio, prevenção de infecção e otimização da nutrição com foco no aleitamento materno (Trindade e Rugolo, 2007; Aceti et al, 2018).

## **2- Nutrição do prematuro e do recém-nascido com restrição do crescimento fetal**

O nascimento prematuro impõe um grande desafio nutricional, tanto ao recém-nascido, como à toda equipe de saúde. Sistemas fisiológicos imaturos, necessidades metabólicas elevadas, doenças agudas e crônicas, predispõem esses recém-nascidos a deficiências nutricionais, que prejudicam o crescimento e neurodesenvolvimento no curto e longo prazo (Raturi et al, 2017).

A adequação qualitativa e quantitativa da nutrição neonatal é fundamental para o crescimento de prematuros, e a oferta adequada de proteína e energia na primeira semana de vida está associada a melhor prognóstico de desenvolvimento nos primeiros 18 meses de vida (Su, 2014). Entretanto, são frequentes as dificuldades e limitações na alimentação do prematuro, destacando-se a ocorrência de distensão abdominal e resíduos gástricos, indicativos de intolerância alimentar, que frequentemente levam à suspensão da dieta, devido à preocupação com o risco de enterocolite necrosante (Underwood, 2014; Patel e Kim, 2018).

A preocupação é ainda maior em recém-nascidos com restrição do crescimento fetal, especialmente se apresentarem alteração de Doppler da artéria umbilical (Bozzetti e Tagliabue, 2017). Shah et al, 2015 destacaram a dificuldade na otimização da nutrição de prematuros extremos com restrição do crescimento fetal, documentando nestes, o início mais tardio da dieta, maior tempo para atingir a dieta plena e conseqüentemente maior incidência de restrição do crescimento pós-natal que ocorreu em 73% dos prematuros (Shah et al, 2015).

Devido às limitações fisiológicas, morbidades e dificuldades na nutrição neonatal, que são inversamente proporcionais à idade gestacional e peso ao nascer, a restrição do crescimento pós-natal em prematuros, é uma complicação de alta prevalência, variando de 43% a 97%, e essa variabilidade em parte é associada à diversidade nas práticas nutricionais e ausência de padronização do esquema alimentar para prematuros. A restrição do crescimento pós-natal é preocupante por ter repercussão negativa no crescimento cerebral e associação com alterações neurológicas e metabólicas no longo prazo (Genoni et al, 2017).

Além do efeito da prematuridade no crescimento, a literatura, classicamente alerta para o pior prognóstico de crescimento de recém-nascidos com restrição do crescimento fetal ou pequenos para a idade gestacional, sendo sugerido que o inadequado crescimento fetal aumenta o risco de inadequação no crescimento pós-natal dos prematuros (Gutbrod et al, 2000; Bocca-Tjeertes et al, 2011; Grisaru-Granovsky et al, 2011).

### **3- Leite materno e sua importância na nutrição neonatal**

Enquanto a prematuridade e a restrição do crescimento fetal são fatores de risco para inadequado crescimento pós-natal, é inquestionável o papel protetor do leite materno, tanto no crescimento como no desenvolvimento infantil (Walsh e McGuire, 2019). O leite materno contém uma combinação perfeitamente adequada de macro e micronutrientes, incluindo minerais, vitaminas e vários componentes bioativos (WHO, 2000; Ballard & Morrow, 2013).

A OMS recomenda que todos os recém-nascidos, sejam alimentados com leite materno. (WHO, 2011). Vários estudos mostram que o leite materno diminui a incidência de problemas neonatais graves como sepse/enterocolite necrosante (Corpeleijn et al, 2012; Chapman, 2013; Patel et al, 2013), bem como apresenta benefícios no médio e longo prazo, incluindo melhor crescimento, e desenvolvimento e menor risco de síndrome metabólica no futuro (Owen et al, 2011; Lechner e Vohr, 2017; Willians e Suchdev, 2017). Revisão sistemática sobre o efeito da alimentação com leite humano de banco ou fórmula no crescimento e desenvolvimento de prematuros ou recém-nascidos de baixo peso, mostrou que os recém-nascidos alimentados com fórmula artificial tiveram maior benefício no crescimento em curto prazo, mas não no longo prazo, e ainda houve aumento significativo no risco de enterocolite necrosante (RR= 1,87; IC95%: 1,23-2,85) (Quigley et al, 2018).

Recém-nascidos em aleitamento materno exclusivo apresentam crescimento mais lento nos primeiros anos de vida, menores valores de IMC e menor prevalência de obesidade na infância, em comparação aos que recebem aleitamento artificial (Haschke et al, 2019).

#### 4- Composição do leite materno

A composição do leite materno difere em função da fase da lactação e da idade gestacional.

O colostro, produzido em pequenas quantidades nos primeiros cinco dias após o parto, é rico em componentes imunológicos (Castellote et al, 2011). O leite de transição, produzido do sexto dia até o final da segunda semana após o parto, apresenta algumas características do colostro, e quantidades crescentes de lactose, 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).

Leite de mães de prematuros apresenta maior conteúdo de proteína, lipídios e consequente maior valor energético em comparação ao de mães de termo (Ballard & Morrow, 2013). Entretanto, poucos estudos investigaram as repercussões da restrição do crescimento fetal na composição do leite materno. Em estudo prévio, nosso grupo de pesquisa mostrou que o conteúdo médio de gordura e o valor energético do colostro não diferiram em função da idade gestacional e do crescimento fetal, entretanto houve percentual significativamente maior de amostras de leite materno com crematócrito alto ( $\geq 4\%$ ) nas mães de recém-nascidos de termo pequenos para a idade gestacional (Santiago et al, 2018).

Um potencial benefício do leite materno, refere-se à capacidade de proteção contra o estresse oxidativo, uma vez que contém várias substâncias com capacidade antioxidante, incluindo enzimas como: catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase; bem como substâncias não-enzimáticas, como vitaminas ( $\alpha$ - tocoferol, carotenoides, ácido ascórbico), proteínas (lactoferrina) e minerais (selênio) (Ochoa et.al., 2003; Friel et al, 2004). Entretanto o papel do aleitamento materno na proteção contra o estresse oxidativo, ainda é pouco estudado e os resultados divergentes, principalmente quanto à influência da idade gestacional e do crescimento fetal nos níveis de seus componentes oxidantes e antioxidantes.

Estudo pequeno avaliou a atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) em leite de mães de prematuros e recém-nascidos de

termo nos primeiros 3 meses de lactação. No geral a atividade da GPx e da SOD aumentou nos 2 grupos com a progressão da lactação. Nas primeiras duas semanas, a atividade da GPx foi maior no leite materno de prematuros, enquanto que a SOD foi sempre maior no leite das mães de termos (L' Abbe e Friel, 2000). Outro estudo comparou leite materno de pré-termo (n=31) e de termo (n=14) e não evidenciou diferenças no conteúdo de oxidantes (TBARS) e na capacidade antioxidante total (Terek et al, 2015). Interessantes resultados foram obtidos no estudo de Sandal e colaboradores (2013) que mostrou aumento do estresse oxidativo e diminuição da capacidade antioxidante em sangue de recém-nascidos de termo e pré-termo pequenos para a idade gestacional em comparação aos adequados para a idade gestacional, porém sem diferença nos níveis de oxidantes e antioxidantes do leite materno (Sandal et al, 2013).

Em 2002, Friel e colaboradores analisaram a atividade oxidante e antioxidante do leite materno 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). Esse foi o primeiro estudo que analisou a atividade da catalase no leite humano (Friel et al, 2002).

Também são poucos os estudos que abordam o crescimento de recém-nascidos em aleitamento materno no primeiro mês de vida, em função da idade gestacional e do crescimento fetal. Embora o leite materno seja preconizado como primeira opção alimentar para esses recém-nascidos, recomenda-se o uso de aditivos a fim de atender as necessidades nutricionais aumentadas na fase de crescimento acelerado e minimizar a restrição do crescimento pós-natal (Hair et al, 2013; Huston et al, 2018). Os benefícios dessa prática alimentar parecem ser até mais evidentes nos prematuros pequenos para a idade gestacional, documentando-se nestes, além de maior catch-up do crescimento, melhor composição corporal e condição metabólica nos primeiros anos de vida (Visuthrankul et al, 2019).

## 5- **Justificativa do estudo**

A escassez de dados na literatura e os resultados ainda não conclusivos motivaram a realização desse estudo para responder duas questões que serão abordadas em dois capítulos:

*Capítulo 1:* Qual o efeito da idade gestacional e do crescimento fetal nos níveis de substâncias oxidantes e antioxidantes do colostro e do leite maduro?

*Capítulo 2:* Qual o efeito da idade gestacional e do crescimento fetal no crescimento de recém-nascidos em aleitamento materno exclusivo no primeiro mês de vida?

## 6- **Hipótese**

Considerando que o leite de mães de prematuros apresenta maior adequação de macronutrientes frente as necessidades nutricionais aumentadas desses recém-nascidos, a hipótese é que este leite, especialmente o colostro, também seja mais adequado frente à limitada capacidade antioxidante dos prematuros. Assim, no leite materno de mães de prematuros as concentrações de substâncias oxidantes seriam menores e de antioxidantes seriam maiores em comparação aos termos. Porém na situação de restrição do crescimento fetal esse benefício pode não ocorrer.

Quanto ao crescimento durante o primeiro mês de vida, a hipótese é que haja algum prejuízo em função da prematuridade, mais do que da restrição do crescimento fetal, e a presença concomitante desses 2 fatores estaria associada ao pior padrão de crescimento pós-natal.

## 7- Referências Bibliográficas

Aceti A, Beghetti I, Martini S, Faldella G, Corvaglia L. Oxidative Stress and Necrotizing Enterocolitis: Pathogenetic Mechanisms, Opportunities for Intervention, and Role of Human Milk. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018: 7397659.

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

Bocca-Tjeertes IF, Kerstjens JM, Reijneveld SA, de Winter AF, Bos AF. Growth and Predictors of Growth Restraint in Moderately Preterm Children Aged 0 to 4 Years. *Pediatrics* 2011; 128: e1187-94.

Bozzetti V, Tagliabue PE. Enteral feeding of intrauterine growth restriction preterm infants: theoretical risks and practical implications. *Pediatr Med Chir*. 2017; 39:160.

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.

Castillo-Castañeda PC, Gaxiola-Robles R, Labrada-Martagón V, Acosta Vargas B, Méndez-Rodríguez LC, Zenteno-Savín T. Oxidative damage to proteins related to metals and antioxidant defenses in breastmilk. *Nutr Hosp*. 2017; 34: 59-64.

Chandra N, Mehndiratta M, Banerjee BD, Guleria K, Tripathi AK. Idiopathic Fetal Growth Restriction: Repercussion of Modulation in Oxidative Stress. *Indian J Clin Biochem*. 2016; 31:30-7.

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

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.

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.

Ferencz Á, Orvos H, Hermes E. Major differences in the levels of redox status and antioxidant defence markers in the erythrocytes of pre- and full-term neonates with intrauterine growth restriction. *Reprod Toxicol*. 2015; 53:10-4.

Friel JK, Friesen RW, Harding SV, Roberts, LJ. Evidence of oxidative stress in full-term healthy infants. *Pediatr Res* 2004; 56: 878–882.

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 May; 51: 612-8.

Genoni G, Binotti M, Monzani A, Bernascone E, Stasi I, Bona G, Ferrero F. Nonrandomised interventional study showed that early aggressive nutrition was effective in reducing postnatal growth restriction in preterm infants. *Acta Paediatr*. 2017; 106: 1589-1595.

Grisaru-Granovsky S, Reichman B, Lerner-Geva L, Boyko V, Hammerman C, Samueloff A, et al. Mortality and morbidity in preterm small-for-gestational-age infants: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 205: e.1-e.7.

Gutbrod T, Wolke D, Soehne B, Ohrt B, Riegel K. Effects of gestation and birth weight on the growth and development of very low birthweight small for gestational age infants: a matched group comparison. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2000; 82: 208-14.

Hair AB, Hawthorne KM, Chetta KE, Abrams SA. Human milk feeding supports adequate growth in infants  $\leq$  1250 grams birth weight. *BMC Res Notes* 2013; 6: 459.

Haschke F, Binder C, Huber-Dangl M, Haiden N. Early-Life Nutrition, Growth Trajectories, and Long-Term Outcome. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2019; 90: 107-120.

Henderson JJ, Hartmann PE, Newnham JP, Simmer K. Effect of preterm birth and antenatal corticosteroid treatment on lactogenesis II in women. *Pediatrics.* 2008; 121: 92–100.

Huston RK, Markell AM, McCulley EA, Gardiner SK, Sweeney SL. Improving Growth for Infants  $\leq$ 1250 Grams Receiving an Exclusive Human Milk Diet. *Nutr Clin Pract.* 2018; 33: 671-8.

Lechner BE, Vohr BR. Neurodevelopmental Outcomes of Preterm Infants Fed Human Milk: A Systematic Review. *Clin Perinatol.* 2017; 44: 69-83.

Nogueira, C; Borges, F; Ramalho, A. Micronutrientes com ação antioxidante em neonatos. *Rev Paul Pediatr,* 2010, 28: 381-386.

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.

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 72 h 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.

Ozsurekci Y, Aykac K. Oxidative Stress Related Diseases in Newborns. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 2768365.

Patel AL, Johnson TJ, Engstrom JL, Fogg LF, Jegier BJ, Bigger HR, et al. Impact of early human milk on sepsis and health-care costs in very low birth weight infants. *J Perinatol*. 2013; 33: 514-19.

Patel AL, Kim JH. Human milk and necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg*. 2018; 27: 34-38.

Perrone S, Laschi E, Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in the fetus and in the newborn. *Free Radic Biol Med*. 2019; Apr 5. pii: S0891-5849(19)30183-2.

Quigley M, Embleton ND, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Jun 20; 6: CD002971.

Raturi S, Zheng Q, Daniel LM, Shi L, Rajadurai VS, Agarwal PK. Nutritional intake and growth velocity in preterm extremely low-birthweight infants in Asia: Are we doing enough? *J Paediatr Child Health*. 2017; 53:1199-1207.

Sandal G, Uras N, Gokmen T, Oguz SS, Erdeve O, Dilmen U. Assessment of oxidant/antioxidant system in newborns and their breast milks. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013; 26: 540-3.

Santiago LTC, Meira Júnior JD, Freitas NA, Kurokawa CS, Rugolo LMSS. Colostrum fat and energy content: Effect of gestational age and fetal growth. *Rev Paul Pediatr*. 2018; 36: 286-291.

Shah P, Nathan E, Doherty D, Patole S. Optimising enteral nutrition in growth restricted extremely preterm neonates--a difficult proposition. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015; 28:1981-4.

Su BH. Optimizing Nutrition in Preterm Infants. *Pediatr Neonatol*. 2014; 55: 5-13.

Terek D, Köroğlu OA, Sözmen E, Yalaz M, Kültürsay N. Contents of Breast Milk Obtained from Mothers of Preterm and Term Newborn Infants. *The Journal of Pediatric Research* 2015; 2: 183-6

Trindade CEP, Rugolo LMSS. Free Radicals and Neonatal Diseases. NeoReviews. 2007;8: e522-31

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

Visuthranukul C, Abrams SA, Hawthorne KM, Hagan JL, Hair AB. Premature small for gestational age infants fed an exclusive human milk-based diet achieve catch-up growth without metabolic consequences at 2 years of age. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2019; 104: 242-247.

Walsh V, McGuire W. Immunonutrition for Preterm Infants. *Neonatology.* 2019; 115:398-405.

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.

Williams AM, Suchdev PS. Assessing and Improving Childhood Nutrition and Growth Globally. *Pediatr Clin North Am.* 2017; 64:755-68.

World Health Organization (WHO). Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the prevention of infant mortality. Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious disease in less developed countries: a pooled analysis. *Lancet.* 2000; 355: 451-55.

World Health Organization (WHO). Guideline - Optimal feeding of low birth weight infants in low-and middle-income countries – 2011.

## *Capítulo 1*

**Artigo1: Componentes oxidantes e antioxidantes no colostro e leite materno maduro em função da idade gestacional e do crescimento fetal**

---

---

## Componentes oxidantes e antioxidantes no colostro e leite materno maduro em função da idade gestacional e do crescimento fetal

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O efeito da idade gestacional e do crescimento fetal na composição oxidante e antioxidante do leite materno é pouco conhecido. **OBJETIVO:** Avaliar a concentração de substâncias oxidantes e antioxidantes no colostro e leite maduro em função da idade gestacional e crescimento fetal. **MÉTODO:** Estudo longitudinal, com mães de recém-nascidos prematuros (PT) e de termo (T), nascidos em um centro terciário entre 2014-2018. Critério de inclusão: gestação única; sem diabetes, sem uso de medicações/drogas ilícitas, recém-nascido sem malformação/infecção congênita. Exclusão: não obtenção do colostro e mastite. Constituídos 4 grupos conforme idade gestacional e peso de nascimento (adequado=AIG e pequeno=PIG): PTPIG (n=37), PTAIG (n=99), TPIG (n=65), TAIG (controle, n=69). O colostro foi coletado entre 24-72 horas e o leite maduro na 4ª semana. 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 teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher, ANOVA seguida pelo teste de Wald com controle de confundidores e ANOVA-RM para investigar o efeito do grupo e tempo. **RESULTADOS:** No colostro de prematuros e TPIG houve menor concentração de MDA, e nos prematuros a concentração de SOD e CAT foi maior. No leite maduro apenas o MDA diferiu, sendo TPIG > TAIG > PTPIG > PTAIG. Na comparação colostro X leite maduro a CAT diminuiu nos prematuros e o MDA aumentou em todos grupos exceto nos PTAIG. **CONCLUSÃO:** A concentração de oxidantes e antioxidantes do leite materno é influenciada pela idade gestacional e crescimento fetal. A proteção antioxidante é especialmente importante no colostro de mães de prematuros.

**Palavras-chave:** leite materno, recém-nascido prematuro, retardo do crescimento fetal, oxidantes, antioxidantes.

## 1. INTRODUÇÃO

Quanto menor o peso de nascimento e maior o grau de prematuridade, maior é a necessidade de procedimentos invasivos para garantir a sobrevivência do recém-nascido. Esses procedimentos, incluindo o uso de oxigênio e de nutrição parenteral, podem aumentar a produção de radicais livres de oxigênio, propiciando o estresse oxidativo e consequente lesão tecidual (Trindade & Rugolo, 2007; Aceti et al 2018).

Há muita preocupação com o estresse oxidativo nos prematuros, pois além da exposição frequente, esses recém-nascidos têm limitações nos seus mecanismos de defesa antioxidante, em especial baixa atividade das enzimas: superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPX) e catalase (CAT), que em conjunto com a vitamina E, desempenham papel protetor importante na peroxidação lipídica das membranas celulares (Thibeault, 2000; Trindade & Rugolo, 2007). Várias doenças dos prematuros estão associadas ao estresse oxidativo, incluindo: displasia broncopulmonar, retinopatia da prematuridade, enterocolite necrosante, hemorragia intraventricular e leucomalácia periventricular (Saugstad, 2005; Shoji e Koletzko, 2007). E ainda, o estresse oxidativo parece estar envolvido na gênese da restrição do crescimento fetal, atuando por diversos mecanismos, seja a lesão de DNA, alteração no metabolismo do colágeno e diminuição do crescimento placentário (Toy et al, 2009; Lian et al, 2011; Kimura et al, 2013; Chandra et al, 2016).

O prognóstico dos recém-nascidos, especialmente os prematuros, é influenciado pela morbidade neonatal e pela nutrição no início da vida, destacando-se a importância do leite materno como fator protetor no prognóstico em curto e longo prazo (Cai et al, 2019).

Um potencial benefício do leite materno refere-se à capacidade de proteção contra o estresse oxidativo, uma vez que contém várias substâncias antioxidantes, incluindo enzimas e substâncias não-enzimáticas (Ochoa et al, 2003). Em prematuros alimentados com leite materno foi documentada, nas primeiras semanas, menor concentração urinária de marcadores de estresse oxidativo, em comparação aos que receberam fórmula de pré-termo (Chen et al, 2019). Entretanto o papel do aleitamento materno na proteção contra o estresse oxidativo, ainda é pouco estudado,

principalmente quanto à influência da idade gestacional e do crescimento fetal nos níveis de substâncias oxidantes e antioxidantes do leite materno.

Esse estudo tem com objetivo testar a hipótese que no leite de mães de prematuros, especialmente no colostro, há menor concentração de substâncias oxidantes e maior de antioxidantes, em comparação aos termos. Porém na restrição do crescimento fetal esse benefício pode não ocorrer.

## 2. MÉTODO

Estudo longitudinal de corte transversal, com puérperas que tiveram parto de termo ou pré-termo, na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, no período de 2014 até 2018.

Critérios de inclusão: puérperas que manifestaram a intenção de amamentar e que tiveram: gestação única; ausência de diabetes; sorologias negativas para sífilis, HIV e Hepatite B; sem uso de medicamentos/drogas ilícitas; recém-nascido sem malformação/infecção congênita.

Mães de recém-nascidos grandes para a idade gestacional não foram incluídas.

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

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (Parecer 670.629 Anexo 1) e as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo teve apoio financeiro da FAPESP (Proc. 2014/12784-9 - ANEXO 2).

A amostra estudada correspondeu ao número máximo de puérperas que preencheram os critérios de inclusão e concordaram em participar do estudo. No total 270 puérperas foram estudadas e distribuídas nos 4 grupos de estudo, conforme a idade gestacional e o crescimento fetal:

- I- Prematuros pequenos para a idade gestacional (PT-PIG)
- II- Prematuros adequados para a idade gestacional (PT-AIG)
- III- Termos pequenos para a idade gestacional (T-PIG)
- IV- Termos adequados para a idade gestacional (T-AIG) = grupo controle

A idade gestacional foi calculada pela melhor estimativa obstétrica (data precisa da última menstruação e/ou ultrassonografia no primeiro trimestre), sendo considerados prematuros os recém-nascidos com menos que 37 semanas de gestação e de termo aqueles com idade gestacional entre 37 e 41 semanas. Com base na curva de crescimento intra-uterino de Fenton & Kim 2013, os recém-nascidos foram classificados em adequados para a idade gestacional (peso entre os percentis 10-90) e pequenos para a idade gestacional (peso menor que percentil 10).

As variáveis independentes do estudo incluíram: dados maternos (idade, escolaridade, medidas antropométricas pré-gestacionais, tabagismo, paridade, intercorrências gestacionais e tipo de parto) e dados do recém-nascido (idade gestacional, gênero, necessidade de reanimação ao nascimento, Apgar de 1º minuto de vida, peso de nascimento, classificação do peso para a idade gestacional, morbidade neonatal e frequência de aleitamento materno exclusivo durante a internação).

Os desfechos de interesse foram as concentrações de substâncias oxidantes (malondialdeído) e antioxidantes (glutathione peroxidase, catalase, superóxido dismutase) no colostro e leite maduro.

Amostras de 3 mL de colostro foram obtidas por ordenha manual entre 24 e 72 horas após o parto e de leite maduro na 4ª semana de vida. As amostras foram coletadas no período da manhã no intervalo das mamadas, imediatamente congeladas e estocadas a menos 80°C até o momento das dosagens.

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 anti-oxidante 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<sup>®</sup>.

Na análise descritiva da amostra as variáveis contínuas foram apresentadas em tabelas com cálculo de média e desvio padrão ou mediana e percentis, conforme apropriado; e as variáveis categóricas foram expressas pelo número e proporção de eventos.

No estudo das associações entre as variáveis categóricas foi empregado o teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher e na análise das variáveis contínuas o teste ANOVA seguido pelo teste de Wald, com controle de potenciais confundidores, identificados na análise univariada.

A distribuição Gama foi empregada para controlar a variabilidade dos valores das substâncias oxidantes e anti-oxidantes.

O efeito do grupo e do tempo nas dosagens efetuadas no leite materno foi avaliado em amostras pareadas de colostro e leite maduro por meio de análise de variância para medidas repetidas (ANOVA-RM).

Em todas as análises o nível de significância foi de 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS for Windows V.9.4.

### **3. RESULTADOS**

Dentre 430 puérperas selecionadas no período de agosto de 2014 a julho de 2018, 370 preencheram os critérios de inclusão, porém 40 puérperas recusaram participar do estudo e 60 foram excluídas devido à não obtenção do volume necessário de colostro. Assim, foram estudadas amostras de colostro e leite maduro de 270 puérperas, estratificadas nos 4 grupos: 37 prematuros pequenos para a idade gestacional (PT-PIG); 99 prematuros adequados para a idade gestacional (PT-AIG); 64 termos pequenos para a idade gestacional (T-PIG); e 69 controles (T-AIG).

Todas as puérperas realizaram controle pré-natal e tiveram, em média, 25 anos de idade e 9,5 anos de estudo, sem diferença entre os grupos. Os principais dados maternos e gestacionais estão apresentados na Tabela 1. Destaca-se nessa tabela que em todos os grupos as médias de IMC materno foram  $\geq 25$ , caracterizando

a amostra estudada como sobrepeso. Pré-eclampsia foi a principal doença gestacional nos grupos de prematuros (Tabela 1).

**Tabela 1. Dados Maternos, Gestacionais e Neonatais nos 4 grupos**

	<b>PT PIG (n=37)</b>	<b>PT AIG (n=99)</b>	<b>T PIG (n=64)</b>	<b>T AIG (n=69)</b>	<b>P valor #</b>
Peso Prévio (Kg)*	64 ± 14 <sup>a</sup>	67 ± 22 <sup>a</sup>	62 ± 16 <sup>a</sup>	75 ± 22 <sup>b</sup>	<b>0,002</b>
IMC Prévio*	25,3 ± 6,0 <sup>a</sup>	26,0 ± 6,1 <sup>a</sup>	25,1 ± 6,5 <sup>a</sup>	28,5 ± 8,3 <sup>b</sup>	<b>0,015</b>
Primigesta (%)	18 (48)	31 (31)	34 (52)	23 (33)	0,065
Tabagismo (%)	6 (16)	19 (19)	16 (24)	8 (11)	0,262
Corticóide antenatal <34s (%)	7/10 (70) <sup>a</sup>	20/27 (74) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Pré-eclampsia (%)	17 (48) <sup>a</sup>	30 (30) <sup>a</sup>	7 (20) <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Bolsa Rota > 18h (%)	2 (5)	14 (14)	2 (3)	3 (4)	0,056
Parto Cesáreo (%)	25 (67) <sup>a</sup>	39 (39) <sup>b</sup>	8 (12) <sup>c</sup>	19 (27) <sup>bc</sup>	<b>&lt;0,001</b>

\*média ± desvio padrão # letras iguais: sem diferença entre os grupos; letras diferentes: com diferença entre os grupos  
IMC= Índice de massa corporal

Dentre os recém-nascidos, não houve distribuição preferencial quanto ao gênero, sendo 46% do gênero masculino. A média do Apgar de 1º minuto foi 8 em todos os grupos. Dentre os prematuros 73% foram prematuros tardios (≥ 34 semanas) e a morbidade neonatal foi baixa, exceto a icterícia necessitando de fototerapia (Tabela 2).

**Tabela 2. Dados de Nascimento e Neonatais nos 4 grupos**

	<b>PT PIG (n=37)</b>	<b>PT AIG (n=99)</b>	<b>T PIG (n=64)</b>	<b>T AIG (n=69)</b>	<b>P valor #</b>
Idade Gestacional (sem)*	34 ± 2 <sup>a</sup>	33 ± 2 <sup>a</sup>	39 ± 3 <sup>b</sup>	39 ± 3 <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Peso Nascimento (g)*	1760 ± 470 <sup>a</sup>	2320 ± 470 <sup>b</sup>	2535 ± 520 <sup>c</sup>	3285 ± 550 <sup>d</sup>	<b>&lt;0,001</b>
VPP (%)	9 (24) <sup>a</sup>	21 (21) <sup>a</sup>	5 (7) <sup>b</sup>	2 (2) <sup>b</sup>	<b>0,008</b>
SDR (%)	7 (18) <sup>a</sup>	20 (20) <sup>a</sup>	0 (-) <sup>b</sup>	0 (-) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Fototerapia (%)	23 (62) <sup>a</sup>	57 (57) <sup>a</sup>	14 (21) <sup>b</sup>	9 (13) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Ventilação mecânica (%)	5 (13) <sup>a</sup>	14 (14) <sup>a</sup>	0 (-) <sup>b</sup>	0 (-) <sup>b</sup>	<b>0,001</b>
CPAP (%)	9 (24) <sup>a</sup>	26 (26) <sup>a</sup>	2 (3) <sup>b</sup>	0 (-) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Aleitamento exclusivo até a alta (%)	22 (60) <sup>a</sup>	59 (58) <sup>a</sup>	58 (91) <sup>b</sup>	66 (96) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>

\*média ± desvio padrão #letras iguais: sem diferença entre os grupos; letras diferentes: com diferença entre os grupos  
VPP= Ventilação por pressão positiva SDR= Síndrome do desconforto respiratório

A tabela 3 mostra os resultados das dosagens das substâncias oxidantes e antioxidantes em amostras pareadas de colostro e leite maduro das puérperas nos 4 grupos, com ajuste dos fatores de confusão: pré-eclâmpsia e tipo de parto.

No geral, houve no colostro menor concentração de oxidante nos grupos de prematuros e TPIG e maior concentração de anti-oxidantes nos prematuros. No leite maduro a concentração de oxidante foi menor nos prematuros, e maior nos TPIG, comparados ao controle; e a concentração de antioxidantes não diferiu entre os grupos. Ao comparar colostro com leite maduro verificou-se que a concentração de oxidante aumentou em todos os grupos exceto nos PTAIG e a concentração da enzima catalase diminuiu nos prematuros (Tabela 3).

**Tabela 3. Valores médios das enzimas antioxidantes e oxidantes no colostro e leite maduro das mães nos 4 grupos**

Variáveis		PT PIG (n=16)	PT AIG (n=47)	T PIG (n=27)	T AIG (n=34)	P valor*
<b>MDA</b> (nmol/mg proteína)	Colostro	7,5 ± 5,2 <sup>a</sup>	14,6 ± 9,6 <sup>b</sup>	17,6 ± 24,3 <sup>b</sup>	21,7 ± 20,6 <sup>c</sup>	<b>&lt;0,001</b>
	Maduro	24,8 ± 20,2 <sup>a</sup>	17,6 ± 9,4 <sup>b</sup>	113,7 ± 92,6 <sup>c</sup>	56,6 ± 38,5 <sup>d</sup>	<b>&lt;0,001</b>
<i>Colostro x maduro P valor<sup>#</sup></i>		<b>0,002</b>	0,078	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	
<b>SOD</b> (U/mL)	Colostro	0,07 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,03 ± 0,03 <sup>c</sup>	<b>&lt;0,001</b>
	Maduro	0,05 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,599
<i>Colostro x maduro P valor<sup>#</sup></i>		0,460	0,178	0,701	0,359	
<b>CAT</b> (nmol/min/mL)	Colostro	337 ± 441 <sup>a</sup>	603 ± 868 <sup>b</sup>	286 ± 434 <sup>a</sup>	396 ± 358 <sup>a</sup>	<b>&lt;0,001</b>
	Maduro	127 ± 88 <sup>a</sup>	83,2 ± 105 <sup>a</sup>	139 ± 212 <sup>a</sup>	150 ± 176 <sup>a</sup>	0,227
<i>Colostro x maduro P valor<sup>#</sup></i>		<b>0,037</b>	<b>0,005</b>	0,208	0,064	
<b>GPx</b> (nmol/min/mL)	Colostro	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,653
	Maduro	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,582
<i>Colostro x maduro P valor<sup>#</sup></i>		0,761	0,400	0,266	0,075	

Controlado para pré-eclâmpsia e tipo de parto

# letras iguais: sem diferença entre os grupos; letras diferentes: com diferença entre os grupos

MDA= malondealdeído SOD= Superóxido dismutase CAT= Catalase GPx= Glutathione Peroxidase

#### 4. DISCUSSÃO:

A prematuridade é um evento associado à inflamação/infecção e a restrição do crescimento fetal é uma condição relacionada à hipóxia/isquemia (Perrone et al, 2019). Tanto a inflamação como a hipoxia/isquemia associam-se com aumento do estresse oxidativo, entretanto as potenciais repercussões desses eventos no leite materno ainda não estão bem estabelecidas. Uma vez que a composição de nutrientes do leite materno modifica-se para melhor adequação às necessidades do prematuro, a hipótese desse estudo foi que haveria diferenças nas concentrações de marcadores oxidantes/antioxidantes no leite materno em função da idade gestacional e do crescimento fetal, com maior efeito da idade gestacional.

Nossa hipótese de que alterações no leite materno ocorreriam para proteger o recém-nascido em relação ao estresse oxidativo foi confirmada, principalmente nos prematuros, pois o colostro apresentou menor concentração do marcador de peroxidação lipídica (MDA) e maiores concentrações de enzimas antioxidantes (SOD e CAT). Com o progredir da lactação o leite das mães de prematuros persistiu com baixos valores de oxidantes, e apesar da diminuição da catalase, a concentração das enzimas antioxidantes não diferiu entre os grupos.

O crescimento fetal também influenciou na composição do leite materno, porém com menor efeito do que a idade gestacional. Basicamente houve diferença na concentração de oxidante que foi menor no colostro, porém maior no leite maduro; enquanto que as enzimas antioxidantes não diferiram em relação ao controle. Com o progredir da lactação algum efeito protetor persistiu, pois, apesar do aumento do marcador oxidante não houve diminuição das enzimas antioxidantes.

A análise do perfil evolutivo dos componentes oxidantes/antioxidantes no leite materno do grupo controle conforme o tempo de lactação mostrou maior efeito protetor do colostro, que apresentou menor quantidade de marcador oxidante. Efeito protetor do colostro foi também evidenciado por Zarban e col. que analisaram amostras de leite materno em diferentes estágios de lactação (desde colostro até 6 meses de lactação) de 115 mães de recém-nascidos de termo e saudáveis e mostraram maior capacidade antioxidante no colostro comparado ao leite maduro, reforçando a importância do aleitamento materno nos primeiros dias de vida (Zarban et al, 2009).

Nosso estudo mostrou que o colostro de mães de prematuros é perfeitamente adaptado às limitações dos prematuros, contendo menor quantidade de substâncias oxidantes e maior de antioxidantes, em comparação ao grupo controle. Resultados diferentes foram obtidos por Sandal e col., que investigaram a condição oxidante total, o índice de estresse oxidativo e a capacidade antioxidante total em 84 amostras de colostro (sendo 44 puérperas de termo e 40 de pré-termo, com média de idade gestacional de 38,6 e 33,7 semanas respectivamente) e não encontraram diferenças em função da idade gestacional e do crescimento fetal (Sandal et al, 2013). Por outro lado, Abuhandan e col., avaliaram a capacidade oxidante e antioxidante total e o índice de oxidação no colostro e no soro de prematuros e recém-nascidos de

termo, e documentaram maior capacidade oxidante e antioxidante total no colostro dos prematuros, porém sem diferença no índice de oxidação, enquanto que no soro os prematuros apresentaram maior capacidade antioxidante em comparação aos termos, concluindo os autores que o colostro aumenta a capacidade antioxidante dos prematuros (Abuhandan et al. 2015).

Estudo recente mostrou que a capacidade antioxidante aumenta com o progredir da lactação. No colostro não houve diferença entre termos e pré-termos, porém no leite maduro a capacidade antioxidante foi maior nos termos do que nos prematuros (Paduraru et al, 2018). Em nosso estudo, a concentração de antioxidantes do leite maduro não diferiu entre termos e prematuros, provavelmente porque a maioria de nossos prematuros eram prematuros tardios e na coleta do leite maduro, ao final do primeiro mês, já haviam atingido o termo.

A literatura ainda é escassa em relação à condição oxidante/antioxidante do leite materno, e os resultados são inconclusivos. A divergência nos resultados pode ser devida ao pequeno número amostral dos estudos, às diferenças metodológicas na avaliação da condição oxidante/antioxidante e também variação na idade gestacional. Apesar dessas limitações, os estudos sugerem que o leite materno oferece boa proteção antioxidante para os recém-nascidos, especialmente aos prematuros, que são mais susceptíveis e expostos ao estresse oxidativo e apresentam limitações nos mecanismos de defesa antioxidante.

Um achado interessante foi que no grupo de termos pequenos para a idade gestacional a concentração de antioxidantes tanto no colostro como no leite maduro foi semelhante ao grupo controle, porém no leite maduro os TPIG apresentaram os maiores valores de oxidantes. Não há dados na literatura sobre a composição oxidante/antioxidante do leite materno de recém-nascidos com restrição do crescimento fetal que nos dê subsídios para explicar esse resultado, e mais estudos devem ser realizados para que possamos entender o significado desse achado.

Uma limitação de nosso estudo foi avaliar apenas de um marcador oxidante e as enzimas antioxidantes, sabendo-se que outros componentes poderiam também interferir na condição oxidante e antioxidante total do leite materno. Entretanto, frente à escassa literatura disponível, nossos resultados acrescentam novos dados,

especialmente quanto à condição oxidante do leite materno, que é pouco referida na literatura. Esses resultados estimulam a realização de mais estudos para melhor entender os mecanismos fisiológicos envolvidos na capacidade do leite materno proteger o recém-nascido contra o estresse oxidativo, mecanismos esses que diferem em função da idade gestacional e do crescimento fetal.

Concluindo, a concentração de substâncias oxidantes e antioxidantes no leite materno é influenciada pela idade gestacional e pelo crescimento fetal. A proteção antioxidante é maior no leite de mães de prematuros do que das mães de recém-nascidos pequenos para idade gestacional, tanto no colostro como no leite maduro, o que reforça a importância do aleitamento materno para os prematuros.

## 5. Referências Bibliográficas

Abuhandan M, Demir N, Guzel B, Almaz V, Koca B, Tuncer O, et al. An evaluation of oxidative status in serum and breast milk of mothers giving birth prematurely and at full-term. *Iran J Pediatr.* 2015; 25: e2363.

Aceti A, Beghetti I, Martini S, Faldella G, Corvaglia L. Oxidative Stress and Necrotizing Enterocolitis: Pathogenetic Mechanisms, Opportunities for Intervention, and Role of Human Milk. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018: 7397659.

Cai C, Zhang Z, Morales M, Wang Y, Khafipour E, Friel J. Feeding practice influences gut microbiome composition in very low birth weight preterm infants and the association with oxidative stress: A prospective cohort study. *Free Radic Biol Med.* 2019 Mar 6. pii: S0891-5849 (18) 32426-2.

Chandra N, Mehndiratta M, Banerjee BD, Guleria K, Tripathi AK. Idiopathic Fetal Growth Restriction: Repercussion of Modulation in Oxidative Stress. *Indian J Clin Biochem.* 2016 Ma; 31: 30-7.

Chen Y, Fantuzzi G, Schoeny M, Meier P, Patel AL. High-Dose Human Milk Feedings Decrease Oxidative Stress in Premature Infant. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2019 Jan; 43: 126-32.

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

Kimura C, Watanabe K, Iwasaki A, Mori T, Matsushita H, Shinohara K, et al. The severity of hypoxic changes and oxidative DNA damage in the placenta of early-onset preeclamptic women and fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013; 26: 491–6.

Lian IA, Løset M, Mundal SB, Fenstad MH, Johnson MP, Eide IP, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia. *Placenta.* 2011; 32: 823–9.

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 72 h of life. *Free Radic Res* 2003; 37: 317–22.

Păduraru L, Dimitriu DC, Avasiloaiei 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; pii: S1875-9572 (17) 30330-3.

Perrone S, Laschi E, Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in the fetus and in the newborn. *Free Radic Biol Med*. 2019; Apr 5. pii: S0891-5849 (19) 30183-2.

Sandal G, Uras N, Gokmen T, Oguz SS, Erdeve O, Dilmen U. Assessment of oxidant/antioxidant system in newborns and their breast milks. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013 Mar; 26: 540-3.

Saugstad OA. Oxidative stress in the newborn. A 30-year perspective. *Biol Neonate*. 2005; 88: 228–36.

Shoji H, Koletzko B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007; 10: 24–28.

Thibeault DW. The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *Am J Perinatol*. 2000; 4:167–81.

Toy H, Camuzcuoglu H, Ario DT, Kurt S, Celik H, Aksoy N. Serum prolidase activity and oxidative stress markers in pregnancies with intrauterine growth restricted infants. *J Obstet Gynaecol Res*. 2009; 35: 1047–53.

Trindade CEP, Rugolo LMSS. Free Radicals and Neonatal Diseases. *NeoReviews*. 2007;8: e522-31.

Zarban A, Taheri F, Chahkandi T, Sharifzadeh G, Khorashadizadeh M. Antioxidant and radical scavenging activity of human colostrum, transitional and mature milk. *J Clin Biochem Nutr*. 2009; 45: 150e4.

## *Capítulo 2*

**Artigo em Inglês - Oxidant and antioxidant components in colostrum and mature breast milk according to gestational age and fetal growth**

---

---

## **Oxidant and antioxidant components in colostrum and mature breast milk according to gestational age and fetal growth**

### **ABSTRACT**

**BACKGROUND:** The effect of gestational age and fetal growth on the oxidative and antioxidant composition of breast milk is poorly understood. **OBJECTIVE:** To evaluate the concentration of oxidant and antioxidant substances in colostrum and mature breast milk according to gestational age and fetal growth. **METHOD:** Longitudinal study, with mothers of premature (PT) and term (T) newborns, in a tertiary center between 2014-2018. Inclusion criteria: single pregnancy; no diabetes, no use of medications/illicit drugs, newborn without malformation/congenital infection. Excluded: failure in obtain colostrum and mastitis. Four groups were formed based on gestational age and birth weight (adequate = AGA and small for gestational age = SGA): PTSGA (n = 37), PTAGA (n = 99), TSGA (n = 65), TAGA (control, n = 69). Colostrum was collected between 24-72 hours after delivery and mature milk in the 4th week. The antioxidant enzymes: Glutathione peroxidase (GPX), Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD) and the lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA) were measured. The groups were compared using the Chi-square test or Fisher's Exact test, ANOVA followed by the Wald test adjusting for potential confounders, and ANOVA-RM to investigate the effect of the group and time. **RESULTS:** In the colostrum of preterm infants and TPIG there was a lower concentration of MDA, and in premature infants the concentration of SOD and CAT was higher. In mature milk only the MDA differed, being TPIG> TAIG> PTPIG> PTAIG. In the comparison of colostrum X mature milk, CAT decreased in premature infants and MDA increased in all groups except PTAIG. **CONCLUSION:** The concentration of oxidants and antioxidants in breast milk is influenced by gestational age and fetal growth. Antioxidant protection is especially important in the colostrum of mothers of premature infants.

**Keywords:** human milk, infant newborn, fetal growth retardation, oxidants, antioxidants.

## INTRODUCTION

The lower the birth weight and gestational age, the greater the need for invasive procedures to ensure the preterm neonate's survival. These procedures, including the use of oxygen and parenteral nutrition, can increase the production of free radicals. Free radicals react with polyunsaturated fatty acids of cell membranes, proteins and nucleic acids, causing functional alterations within the cell, with subsequent tissue injury by oxidative stress (Trindade & Rugolo, 2007; Aceti et al 2018).

Preterm infants are particularly prone to oxidative stress because they are frequently exposed to events leading to overproduction of free radicals and have reduced antioxidant defense, especially low enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase (CAT), which together with vitamin E, play an important protective role in the lipid peroxidation of cell membranes (Thibeault, 2000; Trindade & Rugolo, 2007). Oxidative stress has been associated with increased risk of serious prematurity-associated diseases, including bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity, necrotizing enterocolitis, intraventricular hemorrhage and periventricular leukomalacia (Saugstad, 2005; Shoji and Koletzko, 2007). Furthermore, oxidative stress have been implicated in the pathogenesis of intrauterine growth restriction, acting through several mechanisms, such as DNA damage, altered collagen turnover and reduced placental growth (Toy et al, 2009; Lian et al, 2011 ; Kimura et al, 2013; Chandra et al, 2016).

Currently, one of the goals in neonatal care is to minimize free radicals production and promote the development of antioxidant systems. Breast milk has been associated with substantial benefits to the health and development of preterm infants (Cai et al, 2019) and can provide antioxidant protection, since it contains several antioxidant compounds, including enzymes and non-enzymatic substances (Ochoa et al, 2003). Premature infants fed with breast milk exhibited a lower urinary concentration of oxidative stress biomarkers in the first weeks of life, compared with

those fed with premature infant formula (Chen et al, 2019). However, the role of breastfeeding in protecting against oxidative stress is still poorly studied, especially regarding the influence of gestational age and fetal growth on the levels of oxidant and antioxidant substances in breast milk. We hypothesized that prematurity is associated with increased antioxidants and decreased oxidants concentrations in breast milk whereas the opposite occur in intrauterine growth restriction.

This study aims to investigate the influence of gestational age and fetal growth on the concentration of oxidative stress biomarker and antioxidants enzymes in colostrum and mature breast milk.

## **METHOD**

A prospective observational study, with women who had given birth at term or prematurely at the Maternity Hospital of the Sao Paulo State University- Botucatu School of Medicine, from 2014 to 2018.

Inclusion criteria: postpartum women who intended to breastfeed exclusively and who have had negative serology results for syphilis, HIV and Hepatitis B.

Exclusion criteria included: multiple pregnancy, diabetes mellitus, use of medication or illicit drug, presence of mastitis, newborn large for gestational age or with congenital anomalies, as well as the impossibility of obtaining colostrum.

The study was approved by the Institution's Research Ethics Committee and informed consent was obtained from each participant woman.

All women who met the inclusion criteria and agreed to participate in the study were included and distributed into 4 study groups, according to gestational age and fetal growth:

- V- Preterm infants small for gestational age (PT-SGA)
- VI- Preterm infants appropriate for gestational age (PT-AGA)
- VII- Term infants small for gestational age (T-SGA)
- VIII- Term infants appropriate for gestational age (T-AGA) = control group

Gestational age was calculated by the best obstetric estimate (precise date of the last menstruation and/or ultrasound in the first quarter). SGA was defined as birth weight < 10 percentile on Fenton intrauterine growth (Fenton & Kin, 2013), and AGA when birth weight between 10-90<sup>th</sup> percentiles.

The study's independent variables included: maternal data (age, education, pre-gestational anthropometric measurements, tobacco use, parity, gestational complications and type of delivery) and newborn data (gestational age, gender, delivery room resuscitation, 1-minute Apgar score, birth weight, weight classification for gestational age, neonatal morbidity and frequency of exclusive breastfeeding during hospitalization).

The primary outcomes were the concentrations of oxidant (malondialdehyde) and antioxidants substances (glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase) in colostrum and mature breast milk.

Samples of 3mL of colostrum were obtained by manual expression between 24 and 72 hours after delivery and of mature milk in the 4th week of life. Sample collection was standardized between 9:00-11:00 in the morning, during the feeding interval. Milk samples were immediately frozen and kept in the freezer at - 80°C until analysis.

The lipid peroxidation biomarker, malondialdehyde (MDA), was measured by spectrophotometric absorbance of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which react with malondialdehyde to produce a pinkish substance. The amount of TBARS is thus proportional to the amount of MDA. The TBARS concentration was calculated using the standard MDA curve and was expressed in nmol/mg of protein.

The 3 main antioxidant enzymes were measured as markers for antioxidant capacity: Glutathione peroxidase (GPX), Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD). These measurements were performed by Colorimetric Assay using specific kits: Glutathione Peroxidase Assay Kit, Catalase Assay Kit and Superoxide Dismutase Assay Kit, provided by Cayman Chemical®.

In the descriptive analysis of the sample, continuous variables were reported as mean and standard deviation or median and percentiles, as appropriate; and categorical variables were expressed as the number and proportion of events.

To examine the associations between categorical variables, the Chi-square test or Fisher's exact test was used; and continuous variables were analysed by ANOVA followed by Tukey test. The oxidative stress biomarker (MDA) and antioxidant enzymes levels were compared between the 4 groups using a one-way layout, followed by Wald test, adjusting for potential confounders. The gamma distribution was used to control for the variability in the values for oxidant and antioxidant substances.

The effect of group and time on the measurements made in breast milk samples was evaluated in paired samples of colostrum and mature milk through repeated measures analysis of variance (ANOVA-RM).

A two-tailed P value of less than 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using SAS for Windows v.9.4 statistical software (Cary, NC, USA).

## **RESULTS**

Among the 430 postpartum women selected from August 2014 to July 2018, 370 met the inclusion criteria. However, 40 women refused to participate in the study and 60 were excluded because the necessary volume of colostrum could not be obtained. Thus, samples of colostrum and mature milk from 270 lactating women were analyzed, sub-divided into 4 groups: 37 preterm infants small for gestational age (PT-SGA); 99 preterm infants appropriate for gestational age (PT-AGA); 64 term infants small for gestational age (T-SGA); and 69 controls (T-AGA).

All women attended antenatal care and had, on average, 25 years of age and 9.5 years of study, with no difference between groups. The main maternal and gestational data are shown in Table 1. In all groups the mean maternal BMI was  $\geq 25$ , characterizing the sample as overweight. Pre-eclampsia was the main pregnancy-related complication in the preterm groups (Table 1).

Table 1. Maternal and gestational data

	PT SGA (n=37)	PT AGA (n=99)	T SGA (n=64)	T AGA (n=69)	<i>P value</i> #
Weight before pregnancy (Kg)*	64 ± 14 <sup>a</sup>	67 ± 22 <sup>a</sup>	62 ± 16 <sup>a</sup>	75 ± 22 <sup>b</sup>	0,002
BMI before pregnancy*	25,3 ± 6,0 <sup>a</sup>	26,0 ± 6,1 <sup>a</sup>	25,1 ± 6,5 <sup>a</sup>	28,5 ± 8,3 <sup>b</sup>	0,015
Primiparous (%)	18 (48)	31 (31)	34 (52)	23 (33)	0,065
Smoking (%)	6 (16)	19 (19)	16 (24)	8 (11)	0,262
Antenatal steroids <34s (%)	7/10 (70) <sup>a</sup>	20/27 (74) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	<0,001
Preeclampsia (%)	17 (48) <sup>a</sup>	30 (30) <sup>a</sup>	7 (20) <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	<0,001
PROM > 18h (%)	2 (5)	14 (14)	2 (3)	3 (4)	0,056
Cesarean delivery (%)	25 (67) <sup>a</sup>	39 (39) <sup>b</sup>	8 (12) <sup>c</sup>	19 (27) <sup>bc</sup>	<0,001

\*mean±standard deviation; #equal letters: no difference between groups; different letters: with difference between groups  
 BMI= body mass index; PROM= Premature rupture of membranes

Groups were similar in terms of newborn gender (46% male) and the 1-minute Apgar (average 8 for all groups). Among preterm infants, 73% were late preterm infants (≥ 34 weeks' gestation) and neonatal morbidity was low, except for jaundice requiring phototherapy (Table 2).

Table 2. Birth and Neonatal Data

	PT SGA (n=37)	PT AGA (n=99)	T SGA (n=64)	T AGA (n=69)	<i>P value</i> #
Gestational age (sem)*	34 ± 2 <sup>a</sup>	33 ± 2 <sup>a</sup>	39 ± 3 <sup>b</sup>	39 ± 3 <sup>b</sup>	<0,001
Birth weight (g)*	1760 ± 470 <sup>a</sup>	2320 ± 470 <sup>b</sup>	2535 ± 520 <sup>c</sup>	3285 ± 550 <sup>d</sup>	<0,001
Resuscitation at birth (%)	9 (24) <sup>a</sup>	21 (21) <sup>a</sup>	5 (7) <sup>b</sup>	2 (2) <sup>b</sup>	0,008
RDS (%)	7 (18) <sup>a</sup>	20 (20) <sup>a</sup>	0 (-) <sup>b</sup>	0 (-) <sup>b</sup>	<0,001
Phototherapy (%)	23 (62) <sup>a</sup>	57 (57) <sup>a</sup>	14 (21) <sup>b</sup>	9 (13) <sup>b</sup>	<0,001
Mechanical ventilation (%)	5 (13) <sup>a</sup>	14 (14) <sup>a</sup>	0 (-) <sup>b</sup>	0 (-) <sup>b</sup>	0,001
CPAP (%)	9 (24) <sup>a</sup>	26 (26) <sup>a</sup>	2 (3) <sup>b</sup>	0 (-) <sup>b</sup>	<0,001
Exclusive breastfeeding until discharge (%)	22 (60) <sup>a</sup>	59 (58) <sup>a</sup>	58 (91) <sup>b</sup>	66 (96) <sup>b</sup>	<0,001

\*mean±standard deviation; #equal letters: no difference between groups; different letters: with difference between groups  
 RDS= distress syndrome in preterm infants

Table 3 shows the mean concentration of oxidative stress biomarker (MDA) and antioxidant enzymes in paired samples of colostrum and mature milk in all 4 groups, adjusting for confounding factors: preeclampsia and mode of delivery.

Overall, mothers of preterm infants had lower levels of oxidative marker in colostrum and mature milk, and higher concentration of antioxidants in colostrum, compared with the control group. Mothers of T-SGA had lower levels of oxidative marker in colostrum, but higher in mature milk, compared with the control group. The concentration of antioxidant enzymes in mature milk did not differ between groups.

Comparing colostrum with mature milk, the concentration of MDA increased during the course of lactation in all groups except in the PT-AGA, whereas catalase showed a trend to decrease with significant lower levels in mature milk of preterm infants' mothers (Table 3).

Table 3. Mean values of antioxidant and oxidizing enzymes in the colostrum and mature milk of mothers in the 4 groups

		PT SGA (n=37)	PT AGA (n=99)	T SGA (n=64)	T AGA (n=69)	<i>P value</i> #
<b>MDA</b> (nmol/mg protein)	Colostrum	7,5 ± 5,2 <sup>a</sup>	14,6 ± 9,6 <sup>b</sup>	17,6 ± 24,3 <sup>b</sup>	21,7 ± 20,6 <sup>c</sup>	<b>&lt;0,001</b>
	Mature Milk	24,8 ± 20,2 <sup>a</sup>	17,6 ± 9,4 <sup>b</sup>	113,7 ± 92,6 <sup>c</sup>	56,6 ± 38,5 <sup>d</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Colostrum x Mature Mil	<i>P valor</i> <sup>#</sup>	<b>0,002</b>	0,078	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	
<b>SOD</b> (U/mL)	Colostrum	0,07 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,03 ± 0,03 <sup>c</sup>	<b>&lt;0,001</b>
	Mature Milk	0,05 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,599
Colostrum x Mature Mil	<i>P valor</i> <sup>#</sup>	0,460	0,178	0,701	0,359	
<b>CAT</b> (nmol/min/mL)	Colostrum	337 ± 441 <sup>a</sup>	603 ± 868 <sup>b</sup>	286 ± 434 <sup>a</sup>	396 ± 358 <sup>a</sup>	<b>&lt;0,001</b>
	Mature Milk	127 ± 88 <sup>a</sup>	83,2 ± 105 <sup>a</sup>	139 ± 212 <sup>a</sup>	150 ± 176 <sup>a</sup>	0,227
Colostrum x Mature Mil	<i>P valor</i> <sup>#</sup>	<b>0,037</b>	<b>0,005</b>	0,208	0,064	
<b>GPx</b> (nmol/min/mL)	Colostrum	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,653
	Mature Milk	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,582
Colostrum x Mature Mil	<i>P valor</i> <sup>#</sup>	0,761	0,400	0,266	0,075	

Controlled for preeclampsia and type of delivery

\*mean±standard deviation; #equal letters: no difference between groups; different letters: with difference between groups MDA= malondialdehyde; SOD= Superoxide dismutase; CAT= Catalase; GPx= Glutathione Peroxidase

## **DISCUSSION:**

Prematurity is strongly associated with inflammation/infection and fetal growth restriction is related to hypoxia/ischemia (Perrone et al, 2019). Both inflammation and hypoxia/ischemia are associated with increased oxidative stress, but the effects of prematurity and fetal growth restriction on breast milk components are still not well established. Since the macronutrient composition of breast milk changes throughout lactation to provide appropriateness of nutritional intake to the premature infant, the hypothesis of this study was that there would be differences in the concentrations of oxidative stress biomarker and antioxidant enzymes in breast milk according to gestational age and fetal growth, with greater effect of gestational age.

Our hypothesis that changes in breast milk would occur to protect the newborn from oxidative stress was confirmed, especially in preterm infants. A very interesting result was a high concentration of antioxidant enzymes in colostrum, and low level of oxidative biomarker (MDA) in colostrum and mature milk of preterm mothers, suggesting that the protective effect of breast milk persisted during the course of lactation.

Previous studies, comparing antioxidant properties of preterm and term breast milk reported heterogeneous results. Some data show that preterm mothers' milk has more antioxidants (Abuhandan et al, 201) and it has been observed that the total antioxidant capacity of premature breast milk may not decline during lactation (Deniz et al 2019). However, other studies have showed no difference between term and preterm colostrum (Sandal, 2013), or a lower total antioxidant capacity in colostrum of preterm compared to full-term mothers (Deniz et al, 2019).

To date, a few studies have investigated the influence of fetal growth on the oxidant/antioxidant status of breast milk. In this study we have shown that oxidant content of milk from mothers of T-SGA was lower in colostrum and higher in mature milk compared with control group. This is a highly interesting result, suggesting a possible adaptive mechanism in mother's mammary gland to protect neonates with fetal growth restriction during the first days of life when the oxidative damage is more common, but the protective effect of breast milk did not persist throughout lactation,

and it is difficult to explain why the biomarker of oxidative stress is increased in mature milk. This is an unexpected finding that will require additional investigation to better understand the influence of fetal growth restriction on oxidant status of breast milk and its changes during the course of lactation.

In all groups of our study the oxidant/antioxidant compounds in the breast milk changed during the course of lactation showing a greater protective effect of colostrum for preterm and term infants. This finding is in agreement with previous study that reported higher total antioxidant capacity in the colostrum than in mature milk of full-term mothers (Zarban et al, 2009). Our results are also in line with a recent report by Deniz et al who have reported that colostrum has the highest antioxidant capacity level, which decreased during lactation, and although antioxidant capacity was lower in preterm compared with term, the total oxidant status was lower in colostrum and mature milk of preterm mothers (Deniz et al, 2019). Taken together, these findings highlight the importance of breastfeeding, especially for preterm infants in the first days of life. In contrast, Paduraru et al, have evaluated preterm and term milk at different moments of lactation and showed that in both groups the antioxidant capacity of breast milk increases throughout lactation. No difference was found between term and preterm colostrum, but mature preterm milk had lower antioxidant capacity than term milk (Paduraru et al, 2018).

The literature on oxidant/antioxidant status of breast milk is still scarce, and results are inconclusive. The discrepancy in results may be due to sample sizes, differences in methods used for measurement of oxidant/antioxidant status, nutritional habits, and gestational age. Despite these limitations, there is growing evidence that breast milk offers good antioxidant protection for newborns, especially for premature infants, who are more susceptible and exposed to oxidative stress and have limited antioxidant defense mechanisms.

Present study has many strong aspects as well as limitations. A limitation is that we measured only one oxidative stress biomarker and the antioxidant enzymes, so we cannot comment on breast milk's total oxidant and antioxidant status. Another limitation is the lack of information related to dietary intake of the mothers, however when colostrum was collected the diet was similar, because the women were

hospitalized. The strengths of the study were: we investigated one aspect of breast milk composition not yet evaluated in the literature, specifically MDA, a marker of oxidative stress; and also we could show the different effect of gestational age and fetal growth on the breast milk. This issue has been little addressed in the literature, mainly regarding the effect of fetal growth restriction on the oxidant/antioxidant status of breast milk.

In conclusion, the concentration of oxidative stress biomarker and antioxidant enzymes in breast milk is more influenced by gestational age than fetal growth. Antioxidant protection is especially important in breast milk of preterm' mothers. Breast milk may be a good strategy to promote the antioxidant defenses and to protect the preterm infant from oxidative stress.

## REFERENCES:

Abuhandan M, Demir N, Guzel B, Almaz V, Koca B, Tuncer O, et al. An evaluation of oxidative status in serum and breast milk of mothers giving birth prematurely and at full-term. *Iran J Pediatr.* 2015; 25: e2363. doi: 10.5812 / ijp.2363.

Aceti A, Beghetti I, Martini S, Faldella G, Corvaglia L. Oxidative Stress and Necrotizing Enterocolitis: Pathogenetic Mechanisms, Opportunities for Intervention, and Role of Human Milk. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018: 7397659. doi: 10.1155 / 2018/7397659.

Cai C, Zhang Z, Morales M, Wang Y, Khafipour E, Friel J. Feeding practice influences gut microbiome composition in very low birth weight preterm infants and the association with oxidative stress: A prospective cohort study. *Free Radic Biol Med.* 2019 Mar 6. pii: S0891-5849 (18) 32426-2. doi: 10.1016 / j.freeradbiomed.2019.02.032.

Chandra N, Mehndiratta M, Banerjee BD, Guleria K, Tripathi AK. Idiopathic Fetal Growth Restriction: Repercussion of Modulation in Oxidative Stress. *Indian J Clin Biochem.* 2016 Mar; 31: 30-7. doi: 10.1007 / s12291-015-0487-z.

Chen Y, Fantuzzi G, Schoeny M, Meier P, Patel AL. High-Dose Human Milk Feedings Decrease Oxidative Stress in Premature Infant. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2019 Jan; 43: 126-32. doi: 10.1002 / jpen.1178.

Deniz A, Aydemir O, Saglik A, Sekili Z, Kiraz Z, 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.* 2019 Sep 6. doi: 10.1055/s-0039-1696715.

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.

Kimura C, Watanabe K, Iwasaki A, Mori T, Matsushita H, Shinohara K, et al. The severity of hypoxic changes and oxidative DNA damage in the placenta of early-onset preeclamptic women and fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013; 26: 491–6. doi: 10.3109 / 14767058.2012.733766.

Lian IA, Løset M, Mundal SB, Fenstad MH, Johnson MP, Eide IP, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia. *Placenta.* 2011; 32: 823–9. doi: 10.1016 / j.placenta.2011.08.005.

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 72 h of life. *Free Radic Res* 2003; 37: 317–22. doi: 10.1080 / 1071576021000050438.

Păduraru L, Dimitriu DC, Avasiloaiei AL, Moscalu M, Zonda GI, Stamatin M. Total antioxidant status in fresh and stored human milk from mothers of term and preterm neonates. *Pediatr Neonatol.* 2018; 59: 600-5. doi: 10.1016 / j.pedneo.2018.02.004.

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. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.034.

Sandal G, Uras N, Gokmen T, Oguz SS, Erdeve O, Dilmen U. Assessment of oxidant/antioxidant system in newborns and their breast milks. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013 Mar; 26: 540-3. doi: 10.3109 / 14767058.2012.717998.

Saugstad OA. Oxidative stress in the newborn. A 30-year perspective. *Biol Neonate.* 2005; 88: 228–36. doi: 10.1159 / 000087586.

Shoji H, Koletzko B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007; 10: 24–28. doi: 10.1097 / MCO.0b013e3280a94f6d.

Thibeault DW. The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *Am J Perinatol*. 2000; 4:167–81. doi: 10.1055 / s-2000-9422.

Toy H, Camuzcuoglu H, Ario DT, Kurt S, Celik H, Aksoy N. Serum prolidase activity and oxidative stress markers in pregnancies with intrauterine growth restricted infants. *J Obstet Gynaecol Res*. 2009; 35: 1047–53. doi: 10.1111 / j.1447-0756.2009.01063.x.

Trindade CEP, Rugolo LMSS. Free Radicals and Neonatal Diseases. *NeoReviews*. 2007; 8: 522-31. doi: 10.1542 / neo.8-12-e522.

Zarban A, Taheri F, Chahkandi T, Sharifzadeh G, Khorashadizadeh M. Antioxidant and radical scavenging activity of human colostrum, transitional and mature milk. *J Clin Biochem Nutr*. 2009; 45: 150-4. doi: 10.3164 / jcbn.08-233.

## *Capítulo 4*

### **Artigo 2 - Crescimento de prematuros e recém-nascidos pequenos para a idade gestacional em aleitamento materno no primeiro mês de vida**

---

---

## **Crescimento de prematuros e recém-nascidos pequenos para a idade gestacional em aleitamento materno no primeiro mês de vida**

### **RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** Recém-nascidos (RN) prematuros e os pequenos para a idade gestacional são de risco para inadequado crescimento no início da vida. **OBJETIVO:** Investigar o efeito da idade gestacional e do crescimento fetal no crescimento de RN em aleitamento materno exclusivo no 1º mês de vida. **MÉTODO:** Estudo longitudinal, com RN prematuros (PT) e de termo (T), nascidos entre 2014-2018 e amamentados no 1º mês de vida. Critério de inclusão: gestação única, sem infecção/malformação congênita. Exclusão: aleitamento misto no 1º mês. Formados 4 grupos conforme a idade gestacional e peso de nascimento (adequado= AIG e pequeno= PIG): PT-PIG (n=44), PT-AIG (n=63), T-PIG (n=52), T-AIG (controle, n=55). O crescimento foi avaliado pelos escores Z do peso, comprimento e perímetro cefálico ao nascimento e com um mês. Os grupos foram comparados pelo teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher, ANOVA seguida pelo teste de Wald, ANOVA-RM e Qui-quadrado de tendência. **RESULTADOS:** Prematuros adequados para a idade gestacional mantiveram seus escores Z estáveis e similares ao grupo controle no primeiro mês de vida. Recém-nascidos PIG, prematuros ou de termo apresentaram piores escores Z no primeiro mês de vida, entretanto os 2 grupos PIG apresentaram *catch-up* do perímetro cefálico e os T-PIG também tiveram *catch-up* da estatura, enquanto que os PT-AIG não tiveram *catch-up*. **CONCLUSÃO:** Recém-nascidos prematuros ou de termo, adequados ou pequenos para idade gestacional, amamentados no 1º mês têm crescimento satisfatório. O crescimento fetal parece ter maior influência que a idade gestacional no crescimento pós-natal inicial.

**Palavras-chave:** recém-nascido prematuro, crescimento, aleitamento materno, retardo do crescimento fetal

## **Growth of breast-fed premature and small for gestational age infants in the first month of life**

### **ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Premature and small for gestational age newborns are at risk for inadequate growth early in life. **OBJECTIVE:** To investigate the effect of gestational age and fetal growth on the postnatal growth of newborns on exclusive breastfeeding in the first month of life. **METHOD:** Longitudinal study, with premature (PT) and term (T) newborns, born between 2014-2018 and breastfed in the first month of life. Inclusion criteria: single pregnancy, without congenital infection/malformation. Exclusion: mixed breastfeeding or artificial feeding in the 1st month. Four groups were formed according to gestational age and birth weight (adequate=AGA and small for gestational age=SGA): PT-SGA (n= 44), PT-AGA (n= 63), T-SGA (n= 52), T-AGA (control, n= 55). Growth was assessed by Z scores for weight, length and head circumference at birth and one month. The groups were compared using the Chi-square test or Fisher's Exact test, ANOVA followed by the Wald test, ANOVA-RM, and Chi-square test for trend. **RESULTS:** Preterm infants adequate for gestational age kept their Z scores stable and similar to the control group in the first month of life. SGA, premature or full-term newborns had the worst Z scores in the first month of life, however the 2 SGA groups had head circumference catch-up and the T-SGA also had height catch-up, whereas the PT-AGA had no catch-up. **CONCLUSION:** Premature or term newborns, adequate or small for gestational age, and breastfed in the first month of life, have satisfactory growth. Fetal growth appears to have a greater influence than gestational age on initial postnatal growth.

**Keywords:** premature newborn, growth, breastfeeding, fetal growth retardation

## 1. INTRODUÇÃO

O nascimento prematuro é um grande desafio nutricional, pois estes recém-nascidos apresentam sistemas fisiológicos imaturos, necessidades metabólicas elevadas, doenças agudas e crônicas, que limitam a oferta nutricional e predisõem a deficiências nutricionais, prejudicando o crescimento e neurodesenvolvimento e propiciando a restrição do crescimento pós-natal (ESPGHAN, 2006; Agostini et al, 2010; Raturi et al, 2017; Lapillonne et al, 2019)

A prevalência da restrição do crescimento pós-natal em prematuros varia de 43% a 97%, e essa variabilidade em grande parte se deve à diversidade nas práticas nutricionais e ausência de padronização do esquema alimentar para prematuros. A restrição do crescimento no início da vida tem repercussão negativa no desenvolvimento cerebral, e pode associar-se com alterações neurológicas e metabólicas no longo prazo (Genoni et al, 2017; Raghuram et al, 2017).

O crescimento pós-natal é também influenciado pelo crescimento fetal. Inadequado crescimento fetal aumenta o risco de inadequação no crescimento pós-natal em prematuros e em recém-nascidos de termo (Bocca-Tjeertes et al, 2011; Grisaru-Granovsky et al, 2011; Lee et al, 2018; Takeuchi et al, 2018).

Enquanto a prematuridade e a restrição do crescimento fetal são fatores de risco para inadequado crescimento pós-natal, é inquestionável o benefício do leite materno, tanto no crescimento como no desenvolvimento infantil (Walsh e McGuire, 2019), sendo esperado que recém-nascidos em aleitamento materno exclusivo apresentem crescimento mais lento no início da vida, com menor risco de obesidade na infância (Haschke et al, 2019).

Considerando que nos últimos anos houve grande melhora nas práticas nutricionais e aumento do investimento no aleitamento materno exclusivo, a expectativa atual é que a restrição do crescimento pós-natal seja menos frequente em prematuros e sua evolução nutricional seja adequada nos primeiros meses de vida. Por outro lado, a interação entre prematuridade e restrição do crescimento fetal provavelmente tem efeito sinérgico e deletério no crescimento pós-natal.

Esse estudo foi proposto para investigar o efeito da idade gestacional e do crescimento fetal no crescimento de recém-nascidos em aleitamento materno exclusivo no primeiro mês de vida, testando a hipótese de que a prematuridade tem maior efeito no crescimento pós-natal inicial do que a restrição do crescimento fetal, e a presença concomitante desses 2 fatores piora o padrão de crescimento. Assim o estudo objetivou comparar a evolução dos escores Z de peso, comprimento e perímetro cefálico obtidos ao nascimento e com um mês de vida, em quatro grupos de recém-nascidos em aleitamento materno exclusivo: prematuros pequenos, prematuros adequados, termos pequenos e termos adequados para a idade gestacional.

## **2. METODO**

Estudo longitudinal com recém-nascidos cujo nascimento ocorreu na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, no período de 2015 a 2018 e que receberam aleitamento materno exclusivo no primeiro mês de vida.

Foram incluídos recém-nascidos de termo e de pré-termo, com peso de nascimento adequado e pequeno para a idade gestacional, cujas mães não tiveram intercorrências gestacionais, amamentaram durante a internação e manifestaram a intenção de manter aleitamento exclusivo nos primeiros meses de vida.

Gemelares não foram incluídos e o aleitamento misto ou artificial ao final do primeiro mês de vida foi critério de exclusão.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (Parecer 670.629 Anexo 1) e as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Obtido apoio financeiro da FAPESP (Proc. 2014/12784-9 - ANEXO 2).

A amostra estudada correspondeu ao número máximo de recém-nascidos que preencheram os critérios de inclusão, sendo estes distribuídos em 4 grupos, conforme a idade gestacional e o crescimento fetal:

- I- Prematuros pequenos para a idade gestacional (PT-PIG);

- II- Prematuros adequados para a idade gestacional (PT-AIG);
- III- Termos pequenos para a idade gestacional (T-PIG);
- IV- Grupo controle de termos adequados para a idade gestacional (T-AIG).

A idade gestacional foi calculada com base na melhor estimativa obstétrica (data precisa da última menstruação e/ou ultrassonografia no primeiro trimestre), sendo considerados prematuros os recém-nascidos com menos que 37 semanas de gestação e de termo aqueles com idade gestacional entre 37 e 41 semanas. Com base na curva de crescimento intrauterino de Fenton & Kim (2013), os recém-nascidos foram classificados em adequados para a idade gestacional (peso entre os percentis 10-90) e pequenos para a idade gestacional (peso menor que percentil 10). Prematuros menores que 34 semanas foram alimentados via gavagem com leite da própria mãe ou leite humano de banco (aditivado a partir do volume de 100 mL/kg/dia). Entre 33 e 34 semanas a rotina do serviço é iniciar o estímulo ao seio materno e a transição da gavagem para via oral no seio materno é feita a partir de 34 semanas.

O crescimento dos recém-nascidos foi avaliado pelas medidas do peso, comprimento e perímetros: cefálico, torácico e abdominal, obtidas ao nascimento, e com um mês de vida. Essas medidas foram avaliadas como escores Z para a idade gestacional na Curva de Fenton e Kim (2013). Escore  $Z < -2$  DP foi considerado crescimento inadequado, e variação  $\geq +0,67$  entre 2 escores Z consecutivos caracterizou o *catch-up* (Ong et al, 2000).

As variáveis independentes do estudo incluíram: dados maternos (idade, escolaridade, medidas antropométricas pré-gestacionais, paridade, intercorrências gestacionais e tipo de parto) e dados do recém-nascido (idade gestacional, sexo, reanimação ao nascimento (necessidade de ventilação com pressão positiva), peso de nascimento, classificação do peso para a idade gestacional, morbidade neonatal e tempo de internação).

O desfecho de interesse foi o crescimento no primeiro mês de vida, avaliado pela diferença entre os escores Z das medidas antropométricas ao nascimento e no fim do primeiro mês.

No estudo das associações entre as variáveis categóricas foi empregado o teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher e na análise das variáveis contínuas o teste ANOVA seguido pela comparação múltipla de Tukey. Para investigar o efeito do grupo e do tempo no crescimento dos recém-nascidos no primeiro mês de vida, foi realizada análise de variância para medidas repetidas (ANOVA-RM) e o teste do Qui-quadrado de tendência. Em todas as análises o nível de significância foi de 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS for Windows V.9.4.

### **3. RESULTADOS**

No total 368 puérperas preencheram os critérios de inclusão, entretanto, ao final do primeiro mês de vida o percentual de aleitamento misto (critério de exclusão) foi: 31% nos PT-PIG; 48% nos PT-AIG; 42% nos T-PIG e 41% nos T-AIG. Assim, foram estudados 214 recém-nascidos que permaneceram em aleitamento exclusivo no primeiro mês, sendo estes estratificados nos 4 grupos: 44 prematuros pequenos para a idade gestacional (PT-PIG); 63 prematuros adequados para a idade gestacional (PT-AIG); 52 recém-nascidos de termo pequenos para a idade gestacional (T-PIG) e 55 controles (T-AIG).

A Tabela 1 apresenta os principais dados maternos, gestacionais e neonatais dos 4 grupos. O estado nutricional materno foi classificado como eutrófico (IMC < 25) somente nos grupos PTPIG e T PIG. A principal doença materna foi a pré-eclâmpsia, que predominou no grupo PT-PIG. Quanto aos recém-nascidos, a idade gestacional média foi 33-34 semanas nos prematuros e 38-39 semanas nos termos, não houve distribuição preferencial no gênero, a morbidade neonatal foi baixa, e os prematuros tiveram maior tempo de internação (Tabela 1).

**Tabela 1. Dados Maternos, Gestacionais e Neonatais dos 4 grupos**

	<b>PT PIG (44)</b>	<b>PT AIG (63)</b>	<b>T PIG (52)</b>	<b>T AIG (55)</b>	<b>P valor #</b>
Peso Prévio materno (Kg)*	64 ± 16 <sup>a</sup>	65 ± 16 <sup>a</sup>	61 ± 13 <sup>a</sup>	75 ± 20 <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
IMC Prévio materno*	24,9 ± 6,5 <sup>a</sup>	25,6 ± 6,1 <sup>a</sup>	24,3 ± 5,5 <sup>a</sup>	28,9 ± 7,3 <sup>b</sup>	<b>0,002</b>
Primigesta (%)	20 (45)	27 (43)	29 (55)	21 (38)	<b>&lt;0,001</b>
Pré eclampsia (%)	25 (58)	11 (17)	6 (11)	19 (35)	<b>&lt;0,001</b>
Parto Cesáreo (%)	41 (93)	23 (36)	12 (22)	18 (33)	<b>&lt;0,001</b>
Idade Gestacional (sem)*	34 ± 2 <sup>a</sup>	33 ± 2 <sup>b</sup>	38,5 ± 1 <sup>b</sup>	39 ± 1 <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Gênero Feminino (%)	19 (43)	26 (41)	33(62)	25(45)	0,083
Reanimação em sala de parto (%)	17 (38)	17 (27)	7 (21)	5 (0)	<b>&lt;0,001</b>
SDR (%)	5 (11)	10 (16)	1 (2)	1 (2)	<b>0,010</b>
Dias de internação**	11 (5-24) <sup>a</sup>	4 (3-14) <sup>b</sup>	3 (2-3) <sup>c</sup>	2 (2-3) <sup>d</sup>	<b>&lt;0,001</b>

\*média ± desvio padrão    \*\* mediana (percentis)

# letras iguais: sem diferença entre os grupos; letras diferentes: com diferença entre os grupos

IMC= Índice de massa corporal; SDR= Síndrome do desconforto respiratório

A Tabela 2 mostra a evolução das medidas antropométricas no primeiro mês de vida, verificando-se que ao final do primeiro mês, os prematuros PIG equipararam-se aos AIG, enquanto que os termos PIG permaneceram menores que os AIG (Tabela 2).

**Tabela 2. Medidas antropométricas e crescimento dos recém-nascidos no 1º mês de vida, nos 4 grupos**

	PT PIG (44)	PT AIG (63)	T PIG (52)	T AIG (55)	P valor #
Peso Nascimento (kg)	1691 ± 358 <sup>a</sup>	2216 ± 553 <sup>b</sup>	2448 ± 263 <sup>c</sup>	3363 ± 373 <sup>d</sup>	<0,001
Peso 1 mês (kg)	2658 ± 772 <sup>a</sup>	2916 ± 798 <sup>a</sup>	3330 ± 527 <sup>b</sup>	4089 ± 1022 <sup>c</sup>	<0,001
Comprimento Nascimento (cm)	41 ± 3,2 <sup>a</sup>	44 ± 3,2 <sup>b</sup>	46 ± 1,9 <sup>c</sup>	49 ± 1,9 <sup>d</sup>	<0,001
Comprimento 1 mês (cm)	46 ± 3,6 <sup>a</sup>	48 ± 3,4 <sup>a</sup>	50 ± 2,1 <sup>b</sup>	52 ± 3,9 <sup>c</sup>	<0,001
IMC Nascimento (kg/m <sup>2</sup> )	9,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	11,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	11,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	13,8 ± 1,2 <sup>c</sup>	<0,001
IMC 1 mês (kg/m <sup>2</sup> )	11,8 ± 1,9 <sup>a</sup>	12,4 ± 1,9 <sup>b</sup>	13,0 ± 1,6 <sup>b</sup>	14,6 ± 1,9 <sup>b</sup>	<0,001
PC Nascimento (cm)	30 ± 2,1 <sup>a</sup>	31 ± 2,5 <sup>a</sup>	32,2 ± 1,7 <sup>b</sup>	34,3 ± 1,5 <sup>c</sup>	<0,001
PC 1 mês (cm)	34 ± 2,2 <sup>a</sup>	34 ± 2,2 <sup>a</sup>	35 ± 1,2 <sup>b</sup>	36 ± 2,1 <sup>b</sup>	<0,001
PA Nascimento (cm)	24 ± 1,9 <sup>a</sup>	27 ± 2,5 <sup>b</sup>	28 ± 2,2 <sup>c</sup>	32 ± 2,2 <sup>d</sup>	<0,001
PA 1 mês (cm)	31 ± 4,1 <sup>a</sup>	32 ± 3,4 <sup>ab</sup>	34 ± 1,5 <sup>bc</sup>	35 ± 4,0 <sup>c</sup>	<0,001
PT Nascimento (cm)	26 ± 2,1 <sup>a</sup>	28 ± 2,7 <sup>b</sup>	30 ± 1,7 <sup>c</sup>	33 ± 1,5 <sup>d</sup>	<0,001
PT 1 mês (cm)	31 ± 4,5 <sup>a</sup>	33 ± 3,5 <sup>ab</sup>	35 ± 1,6 <sup>bc</sup>	36 ± 3,8 <sup>c</sup>	<0,001

# ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

letras iguais: sem diferença entre os grupos; letras diferentes: com diferença entre os grupos

IMC= Índice de massa corporal; PC= Perímetro cefálico; PA= Perímetro abdominal; PT= Perímetro torácico

A classificação do estado nutricional dos recém-nascidos ao nascimento e com um mês de vida está apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3. Classificação do Estado Nutricional dos recém-nascidos ao nascimento e com um mês de vida (escores Z), nos 4 grupos**

	PT PIG (n= 44)	PT AIG (n= 63)	T PIG (n= 52)	T AIG (n= 55)	P valor #
Z P/I Nascimento	-1,57 ± 0,69 <sup>a</sup>	-0,19 ± 0,67 <sup>b</sup>	- 1,78 ± 0,44 <sup>a</sup>	-0,23 ± 0,68 <sup>b</sup>	<0,001
Z P/I 1 mês de vida	-0,98 ± 1,38 <sup>a</sup>	-0,34 ± 1,15 <sup>b</sup>	-1,24 ± 0,85 <sup>a</sup>	0,76 ± 1,33 <sup>b</sup>	<0,001
Z E/I Nascimento	-1,70 ± 1,19 <sup>a</sup>	-0,13 ± 0,85 <sup>b</sup>	-1,70 ± 0,74 <sup>a</sup>	-0,36 ± 0,84 <sup>b</sup>	<0,001
Z E/I 1 mês de vida	-1,10 ± 1,33 <sup>a</sup>	-0,30 ± 1,11 <sup>b</sup>	-1,03 ± 0,87 <sup>a</sup>	0,62 ± 1,31 <sup>c</sup>	<0,001
Z PC/I Nascimento	-0,82 ± 0,79 <sup>a</sup>	-0,10 ± 1,07 <sup>b</sup>	-1,18 ± 0,74 <sup>a</sup>	-0,04 ± 0,79 <sup>b</sup>	<0,001
Z PC/I 1 mês de vida	-0,13 ± 1,01 <sup>ac</sup>	0,34 ± 0,87 <sup>ab</sup>	-0,49 ± 0,86 <sup>c</sup>	0,64 ± 0,97 <sup>b</sup>	<0,001

Médias seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey

P/I= Peso/Idade

E/I= Estatura/Idade

PC/I= Perímetro cefálico/Idade

Observa-se nessa tabela, que os PIG prematuros e termos tiveram escores Z similares e menores que os grupos AIG ao nascimento e com um mês de vida. Os prematuros AIG mantiveram seus escores similares ao grupo controle, desde o nascimento até um mês, exceto pelo menor Z escore de estatura (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra a diferença entre os escores Z do nascimento e com um mês de vida. Prematuros AIG não tiveram *catch-up*, enquanto que os PTPIG apresentaram *catch-up* do perímetro cefálico, e os TPIG tiveram *catch-up* na estatura e perímetro cefálico (Tabela 4).

**Tabela 4. Diferenças entre os escores Z de nascimento e com um mês de idade, nos 4 grupos**

	PT PIG (44)	PT AIG (63)	T PIG (52)	T AIG (55)	P valor #
Δ Z P/I Nascimento/1 mês	0,59 ± 1,40 <sup>a</sup>	-0,15 ± 1,01 <sup>b</sup>	0,54 ± 0,87 <sup>a</sup>	1,0 ± 1,23 <sup>a</sup>	<0,001
Δ Z E/I Nascimento/1 mês	0,59 ± 1,53 <sup>a</sup>	-0,17 ± 1,03 <sup>b</sup>	<b>0,68 ± 0,84<sup>a</sup></b>	0,98 ± 1,28 <sup>a</sup>	<0,001
Δ Z PC/I Nascimento/1 mês	<b>0,69 ± 1,21<sup>a</sup></b>	0,44 ± 0,97 <sup>a</sup>	<b>0,68 ± 0,73<sup>a</sup></b>	0,66 ± 0,96 <sup>a</sup>	0,470

A Tabela 5 apresenta a tendência de evolução dos escores Z no primeiro mês de vida, nos 4 grupos. Não houve tendência significativa para melhora ou piora dos escores Z de peso, estatura e perímetro cefálico nos 4 grupos e a maioria dos recém-nascidos manteve seus escores. Embora sem significância estatística, aproximadamente 25% dos prematuros PIG pioraram seus escores Z de peso e estatura.

**Tabela 5. Tendência de evolução dos Escores Z no primeiro mês de vida, nos 4 grupos**

Tendência*		PT PIG (n=44)	PT AIG (n=63)	T PIG (n=52)	T AIG (n=55)
Z P/I	Melhora	16%	0	21%	0
	Mantém	61%	95%	71%	100%
	Piora	23%	5%	8%	0
	<i>p valor</i>	0,971		0,863	
Z E/I	Melhora	14%	2%	21%	2%
	Mantém	61%	95%	73%	98%
	Piora	25%	3%	6%	0
	<i>p valor</i>	0,343	0,855	0,175	
Z PC/I	Melhora	4,5%	3%	11%	0
	Mantém	91%	97%	85%	96,5%
	Piora	4,5%	0	4%	3,5%
	<i>p valor</i>	0,722		0,425	

\*Qui-quadrado de tendência; P/I= Peso/Idade; E/I= Estatura/Idade; PC/I= Perímetro cefálico/Idade

#### 4. DISCUSSÃO

Crescimento é um processo contínuo, modulado por múltiplos fatores, dentre os quais as doenças neonatais e a inadequada nutrição no período fetal e neonatal exercem importante influência negativa (Asbury et al, 2019). O crescimento nos primeiros meses e anos de vida é motivo de grande interesse e preocupação por sua influência na saúde futura do recém-nascido.

Neste estudo comparamos o crescimento de recém-nascidos de termo e prematuros (T e PT), com pesos adequados (AIG) ou pequenos para a idade gestacional (PIG), em aleitamento materno exclusivo no primeiro mês de vida, e mostramos que a trajetória foi satisfatória, mas diferiu entre os 4 grupos.

O principal resultado do estudo, obtido pela análise dos escores Z foi que os recém-nascidos PIG (PT ou T) foram menores que os AIG (PT ou T) desde o nascimento até o primeiro mês de vida. Esse achado sugere que o crescimento fetal tem maior

influência negativa no crescimento pós-natal inicial do que a idade gestacional, o que contraria a hipótese inicial do estudo. Resultados similares foram obtidos por Morag e col. que compararam o crescimento inicial (do nascimento até 36 semanas de idade pós-menstrual) de 83 gemelares prematuros discordantes (um AIG e o outro PIG) com idade gestacional média similar aos nossos prematuros e mostraram que os PIG apresentaram escores Z de peso e perímetro cefálico significativamente piores que os AIG com 36 semanas de idade pós-menstrual. O percentual de escore Z de peso < -2 foi 10 vezes maior nos prematuros PIG do que nos AIG ao atingir 36 semanas (Morag et al, 2018).

Um achado interessante em nosso estudo foi que os recém-nascidos de termo PIG apresentaram, no primeiro mês, *catch-up* na estatura e no perímetro cefálico, sugerindo a possibilidade de equipararem-se ao grupo controle com o passar do tempo, pois um mês de observação é um tempo curto para que se possa estabelecer o prognóstico de crescimento. Há preocupação com o crescimento dos recém-nascidos PIG, pois estes podem apresentar diversas trajetórias como: *catch-up* precoce e excessivo associando-se com obesidade na infância e síndrome metabólica no adulto (Singhal, 2017); por outro lado, podem não apresentar *catch-up* e evoluir com baixa estatura e prejuízo no neurodesenvolvimento (Lei et al, 2015).

Embora nossos PTAIG não tenham apresentado *catch-up* no primeiro mês de vida, há que se destacar que esse grupo foi o único que equiparou seu escore Z do peso e do perímetro cefálico ao grupo controle, o que reforça a adequação do aleitamento materno exclusivo garantindo o crescimento satisfatório dos prematuros.

É inquestionável a importância do *catch-up* do perímetro cefálico, pois este está associado com prognóstico de neurodesenvolvimento. Estudo multicêntrico canadense com 1973 prematuros extremos mostrou que o inadequado crescimento do perímetro cefálico foi frequente durante a internação (24%), mas após a alta ocorreu *catch-up* nos primeiros 16-36 meses. Nesse estudo as médias dos escores Z de peso e perímetro cefálico diminuíram de forma similar durante a internação, que foi prolongada (Raghuram et al, 2017). Estudo recente mostrou que prematuros de muito baixo peso em aleitamento materno, ao atingir o termo, apresentam maior volume

cerebral e melhor organização da substância branca, em comparação aos alimentados com fórmula (Ottolini et al, 2020).

Os resultados de nosso estudo não permitiram confirmar a hipótese de que a associação da prematuridade com o inadequado crescimento fetal piora o crescimento no primeiro mês de vida, pois no geral não houve diferença nos escores Z dos prematuros e termos PIG com um mês de idade. Entretanto ao analisarmos a tendência de evolução dos escores Z no primeiro mês de vida, a despeito de não ter sido detectada tendência significativa de melhora ou piora nos 4 grupos, há que se destacar que cerca de 25% dos PTPIG pioraram seus escores de peso e estatura, o que pode sugerir que o efeito negativo sinérgico da prematuridade e do inadequado crescimento fetal talvez pudesse ser detectado em um tempo mais prolongado de seguimento.

Em estudo prévio de nosso grupo foi avaliado o crescimento de 70 prematuros de extremo baixo peso nos primeiros 24 meses de idade corrigida, documentando-se que após o *catch-down* entre o nascimento e 40 semanas ocorreu *catch-up* nos primeiros 3 meses de idade corrigida. Nesse estudo os prematuros com displasia broncopulmonar tiveram pior padrão de crescimento e a restrição do crescimento pós-natal foi preditor de falha no crescimento nos primeiros anos de vida (Rugolo et al, 2007). Outro estudo brasileiro, com 358 prematuros de baixo peso, mostrou que o crescimento nos primeiros 3 meses de vida varia conforme a faixa de peso ao nascer, mas o perfil de crescimento foi similar entre os adequados e pequenos para a idade gestacional. É difícil comparar os dados desse estudo com os nossos, pois os autores analisaram as medidas absolutas dos dados antropométricos e não os escores Z, e também nesse estudo ao final da terceira semana de vida apenas 35% dos prematuros AIG e 28% dos PIG encontravam-se em aleitamento materno exclusivo (Anchieta et al, 2004).

Importante notar que no presente estudo, apesar das diferenças entre os grupos, todos apresentaram valores médios dos escores Z na faixa de normalidade, ou seja -2 a +2, o que reforça a adequação do aleitamento materno exclusivo para todos os recém-nascidos, sejam de termo ou pré-termo, adequados ou pequenos para a idade gestacional.

Nosso estudo apresenta algumas limitações, pois o crescimento foi avaliado pelas medidas antropométricas obtidas em apenas 2 momentos: nascimento e um mês de vida; o que inviabiliza uma análise mais profunda dos fatores peri e neonatais que modularam a trajetória de crescimento inicial dos prematuros, como: tempo de início da dieta, início da amamentação ao seio materno, perda de peso nos primeiros dias de vida, tempo para recuperar o peso de nascimento. Por outro lado, embora o período de avaliação tenha sido curto, conhecer a trajetória inicial do crescimento é importante, pois esta tem relação com o prognóstico de neurodesenvolvimento (Varella e Moss, 2015) e ainda, pode possibilitar intervenção nutricional precoce se necessário.

O objetivo deste estudo não foi analisar o padrão de crescimento no período neonatal e sim comparar a condição nutricional, expressa pelos escores Z, de quatro grupos de recém-nascidos em aleitamento materno exclusivo ao final do primeiro mês de vida, visando confirmar o conceito de que o aleitamento materno exclusivo é uma proposta válida, benéfica e segura para todos os recém-nascidos sejam de termo ou prematuros, adequados ou pequenos para a idade gestacional.

Prematuros adequados para a idade gestacional mantiveram seus escores Z estáveis e similares ao grupo controle no primeiro mês de vida. Recém-nascidos PIG, sejam prematuros ou de termo tiveram piores escores Z no primeiro mês de vida, mas apresentaram *catch-up* em alguns parâmetros antropométricos, o que gera uma boa expectativa de crescimento no médio e longo prazo e nos permite afirmar que o aleitamento materno deve ser incentivado para todos os grupos de recém-nascidos.

Os resultados obtidos permitem concluir que: recém-nascidos em aleitamento materno exclusivo no 1º mês de vida apresentam crescimento satisfatório, sejam eles prematuros ou de termo, adequados ou pequenos para a idade gestacional. O crescimento fetal teve maior influência que a idade gestacional no crescimento pós-natal inicial.

## 5. Referências Bibliográficas

Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, Decsi T, et al. Enteral nutriente supply for preterm infants: Commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2010; 50: 85–91.

Anchieta LM, Xavier CC, Colosimo EA. Growth of preterm newborns during the first 12 weeks of life. *J Pediatr (Rio J)*. 2004; 80:267-76.

Asbury MR, Unger S, Kiss A, Ng DVY, Luk Y, Bando N, et al. Optimizing the growth of very-low-birth-weight infants requires targeting both nutritional and nonnutritional modifiable factors specific to stage of hospitalization. *Am J Clin Nutr.* 2019; 110:1384-94.

Bocca-Tjeertes IF, Kerstjens JM, Reijneveld SA, de Winter AF, Bos AF. Growth and Predictors of Growth Restraint in Moderately Preterm Children Aged 0 to 4 Years. *Pediatrics* 2011; 128: e1187-94.

ESPGHAN Committee on Nutrition: Aggett PJ, Agostoni C; Axelsson I; De Curtis M, Goulet O, Hernell O, et al. Feeding Preterm Infants After Hospital Discharge - A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Ped Gastroenterol Nutrition.* 2006; 42: 596-603.

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

Genoni G, Binotti M, Monzani A, Bernascone E, Stasi I, Bona G, Ferrero F. Nonrandomised interventional study showed that early aggressive nutrition was effective in reducing postnatal growth restriction in preterm infants. *Acta Paediatr.* 2017; 106: 1589-1595.

Grisaru-Granovsky S, Reichman B, Lerner-Geva L, Boyko V, Hammerman C, Samueloff A, et al. Mortality and morbidity in preterm small-for-gestational-age infants: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 205: e.1-e.7.

Haschke F, Binder C, Huber-Dangl M, Haiden N. Early-Life Nutrition, Growth Trajectories, and Long-Term Outcome. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2019; 90: 107-120.

Lee SM, Kim N, Namgung R, Park M, Park K, Jeon J. Prediction of Postnatal Growth Failure among Very Low Birth Weight Infants. *Sci Rep.* 2018; 8: 3729.

Lei X, Chen Y, Ye J, Ouyang F, Jiang F, Zhang J. The optimal postnatal growth trajectory for term small for gestational age babies: a prospective cohort study. *J Pediatr.* 2015; 166:54-8.

Morag I, Stern Levkovitz O, Siman-Tov M, Frisch M, Pinhas-Hamiel O, Strauss T. Postnatal Growth Disadvantage of the Small for Gestational Age Preterm Twins. *Nutrients.* 2018; 12: 10.

Ong KKL, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *Br Med J.* 2000; 320: 967-71.

Ottolini KM, Andescavage N, Kapse K, Jacobs M, Limperopoulos C. Improved brain growth and microstructural development in breast milk-fed very low birth weight premature infants. *Acta Paediatr.* 2020; 10.

Raghuram K, Yang J, Church PT, Cieslak Z, Synnes A, Mukerji A, et al. Head Growth Trajectory and Neurodevelopmental Outcomes in Preterm Neonates. *Pediatrics.* 2017; 140: e20170216.

Raturi S, Zheng Q, Daniel LM, Shi L, Rajadurai VS, Agarwal PK. Nutritional intake and growth velocity in preterm extremely low-birthweight infants in Asia: Are we doing enough? *J Paediatr Child Health.* 2017; 53:1199-1207.

Rugolo LM. Growth and developmental outcomes of the extremely preterm infant. *J Pediatr (Rio J)*. 2005; 81: S101-10.

Rugolo LMSS, Bentlin MR, Rugolo Jr A, Dalben I, Trindade CEP. Crescimento de prematuros de extremo baixo peso nos primeiros dois anos de vida. *Rev Paul Pediatr*. 2007; 25: 142-9.

Singhal A. Long-Term Adverse Effects of Early Growth Acceleration or Catch-Up Growth. *Ann Nutr Metab*. 2017; 70:236-240.

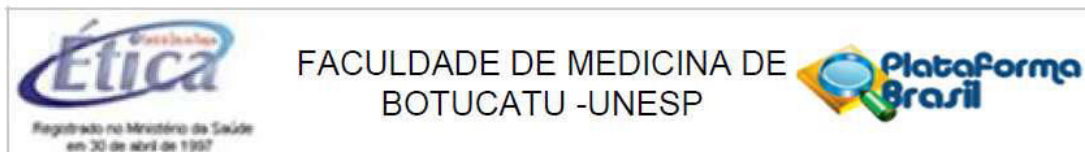
Takeuchi A, Yorifuji T, Nakamura K, Tamai K, Mori S, Nakamura M, et al. Catch-Up Growth and Neurobehavioral Development among Full-Term, Small-for-Gestational-Age Children: A Nationwide Japanese Population-Based Study. *J Pediatr*. 2018; 192: 41-46.

Varella, MH; Moss,WJ. Early growth patterns are associated with intelligence quotient scores in children born small-for-gestational age. *Early Hum. Dev*. 2015, 91, 491–97.

Walsh V, McGuire W. Immunonutrition for Preterm Infants. *Neonatology*. 2019; 115: 398-405.

*Anexos*

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



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** LUIZA TAVARES CARNEIRO SANTIAGO

**Área Temática:**

**Versão:**

**CAAE:** 30989814.0.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Ginecologia e Obstetria

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 670.629

**Data da Relatoria:** 02/06/2014

#### Apresentação do Projeto:

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

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**CEP:** 18.618-970

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 670.629

colostro/leite maduro e desenvolvimento dos recém nascidos.

**Objetivo da Pesquisa:**

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

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

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

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

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

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Recomendo aprovação, sem necessidade de envio a CONEP.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

ANEXO II – Termo de Outorga FAPESP



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

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO  
**TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS**  
 PROCESSO 2014/12784-9

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