YINGYING ZHENG

**Influência da infecção no lactente na expressão de quimiocinas
e de seus receptores envolvidos no *homing* de leucócitos para
o leite materno**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Dra. Patricia Palmeira Daenekas Jorge

São Paulo

Março/2020

YINGYING ZHENG

**Influência da infecção no lactente na expressão de quimiocinas
e de seus receptores envolvidos no *homing* de leucócitos para
o leite materno**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Dra. Patricia Palmeira Daenekas Jorge

São Paulo

Março/2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Zheng, Yingying

Influência da infecção no lactente na expressão
de quimiocinas e de seus receptores envolvidos no
homing de leucócitos para o leite materno / Yingying
Zheng. -- São Paulo, 2020.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Patricia Palmeira Daenekas Jorge.

Descritores: 1.Leite humano 2.Lactente 3.Doenças
respiratórias 4.Linfócitos T 5.Linfócitos B
6.Macrófagos 7.Quimiocinas 8.Migração e rolagem de
leucócitos 9.Movimento celular 10.Receptores de
quimiocinas

USP/FM/DBD-061/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

致我的家人

我将这篇论文献于我的父母郑金海和余杏芳，
无论有多少困难，都会竭尽全力为我和我的妹妹们提供一切。
感谢您们是不一样的中国传统父母！感谢您们尽管不了解我的工作，
但也从未反对过我的决定，也从未怀疑过我。

À minha família

Dedico esta dissertação aos meus pais, Marisa e Roy, que apesar das adversidades, sempre fizeram de tudo para nunca faltar nada à mim e às minhas irmãs. Obrigada por serem pais chineses tradicionais extraordinários! Obrigada por, apesar de não entenderem o que eu faço, nunca se opuseram às minhas decisões e nunca duvidaram de mim.

Agradecimento especial

À minha orientadora Dra. Patricia Palmeira por ser essa pessoa maravilhosa! Por estar sempre presente, preocupada e disposta para qualquer problema e dúvida que tive, por dividir e me iluminar com seu enorme conhecimento científico. Eu não podia ter tido uma orientadora melhor! Você é a orientadora que qualquer aluno almeja e sonha ter.

Muito obrigada por ser minha orientadora!

Agradecimentos

Minha imensa gratidão e amor a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho:

À minha co-orientadora Profa. Dra. Simone Corrêa-Silva, pela qual tudo começou. Obrigada por confiar em mim, me recrutar como aluna de iniciação científica, por me apresentar ao LIM-36 e para a Pat. Esta dissertação não existiria e eu não estaria aqui hoje sem você. Muito obrigada pelo carinho!

Às minhas irmãs Susana e Luciana Zheng, por terem orgulho de mim.

Ao Bruno Soares Scaramuzzi, pela paciência, pela companhia nessa caminhada, por me ouvir e por me incentivar.

A meus amores do Crusp, Michelle, Marco e André pelas energias positivas, pela amizade, pelas alegrias e pelas muitas risadas. Vocês são minhas luzes no Crusp!

A todos os amigos queridos do LIM-36, pelos muitos momentos de descontração, pela convivência agradável e por fazer sentir o lab como minha segunda casa: Andreia Rangel Santos, Elaine Cristina Cardoso, Jana Sicília Viotti de Oliveira, Denis Santana Santos, Aline Paulino Espósito, Thamiris Magalhães Gimenez, Regina Celia de Paula Pena, Marília Moreira Montenegro, Estela Novak, e em especial, Fernanda Andrade Macaferri da Fonseca, Ana Lucia Silveira Lessa, Thiago Porto Silva e

Laila Lima, pelas palavras de conforto e de incentivo, pela companhia e por estarem sempre prontos para me auxiliar nos experimentos.

À Profa. Dra. Magda M. S. Carneiro-Sampaio por ter disponibilizado seu Laboratório permitindo, assim, a realização deste sonho.

À Dra. Eloisa Corrêa de Souza e à toda equipe médica e de enfermagem do pronto socorro pediátrico do Hospital Universitário (HU) da USP, por terem me ajudado nas coletas e seleção dos casos.

À Dra. Regina Maria Rodrigues por ter disponibilizado seu consultório e me apresentado às mães que participaram deste trabalho.

Ao Dr. Alfredo Elias Gilio, por ter organizado a dinâmica das coletas no HU.

Às mães que cederam gentilmente suas amostras para que fosse possível a realização deste trabalho.

Aos membros da Banca examinadora do Exame de Qualificação: Dra. Maria Notomi Sato, Dra. Solange Barros Carbonare e Profa. Dra. Cléia Rodrigues Leone, pelas sugestões construtivas que contribuíram de maneira bastante positiva para o desenvolvimento deste trabalho.

E por fim, à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivos específicos	13
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Ética	14
3.2	Casuística	14
3.3	Obtenção das amostras de sangue periférico e de leite	15
3.4	Obtenção das células e da fase líquida do leite	17
3.5	Imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico e do leite materno	17
3.6.	Quantificação das quimiocinas e citocinas	22
3.7.	Análise estatística	22
4.	RESULTADOS	23
4.1	Caracterização das mães e seus lactentes	23
4.2	Linfócitos T	25
4.3	Linfócitos B e plasmócitos	32

4.4	Monócitos e macrófagos	35
4.5	Concentrações das quimiocinas e citocinas no sangue e no leite materno	39
4.6	Correlações entre as quimiocinas e citocinas no leite e no sangue	42
5.	DISCUSSÃO	44
6.	CONCLUSÕES	57
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ANEXO 2 – Parecer consubstanciado do CEP HU

ANEXO 3 – Parecer consubstanciado do CEP FMUSP

ANEXO 4 – Ficha de anamnese

ANEXO 5 – Artigo publicado

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno (<i>Antigen presenting cell</i>)
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	Grupamento de diferenciação (<i>Cluster of Differentiation</i>)
DC	Célula dendrítica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
et al.	E outros
FSC	<i>Forward scatter</i>
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano (<i>Human leukocyte antigens</i>)
IFN	Interferon
ICr	Instituto da Criança e de Adolescente
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgAS	Imunoglobulina de classe A Secretória
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
IL	Interleucina
IRF	Fator de regulação de Interferon
kDa	<i>Kilodalton</i>
M	Molar
MAdCAM-1	Molécula de adesão celular da mucosa 1 (<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule 1</i>)
MALT	Tecido linfoide associado às mucosas
mg	Miligrama
mL	Mililitro

NaCl	Cloreto de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pg	Picograma
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	<i>Side scatter</i>
Th1	<i>T helper</i> tipo 1
Th17	<i>T helper</i> tipo 17
Th2	<i>T helper</i> tipo 2
TLR	Receptor <i>Toll-Like</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa (<i>Tumor necrosis fator-alfa</i>)
TORCHS	Toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes simples e sífilis.
TSLP	Linfopoietina estromal tímica
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular (<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>
μL	Microlitro
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura - 1	Delineamento metodológico do presente projeto	16
Figura - 2	Tipos e subtipos celulares, e os receptores de quimiocinas analisados no presente projeto	18
Figura - 3	Estratégia de gates para a análise dos linfócitos T CD4 e CD8, linfócitos B e macrófagos do leite	21
Figura - 4	Frequências de linfócitos T CD4 ⁺ CCR5 ⁺ <i>naïve</i> , de memória e ativados do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	26
Figura - 5	Frequências de linfócitos T CD4 ⁺ CCR6 ⁺ <i>naïve</i> , de memória e ativados do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	27
Figura - 6	Frequências de linfócitos T CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ <i>naïve</i> , de memória e ativados do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	28
Figura - 7	Frequências de linfócitos T CD8 ⁺ CCR5 ⁺ <i>naïve</i> e de memória do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	30
Figura - 8	Frequências de linfócitos T CD8 ⁺ CCR6 ⁺ <i>naïve</i> e de memória do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	31
Figura - 9	Frequências de linfócitos T CD8 ⁺ CXCR3 ⁺ <i>naïve</i> e de memória do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	31
Figura - 10	Frequências de linfócitos B <i>naïve</i> e de memória expressando os receptores CCR6 (A), CCR10 (B) e CXCR3 (C) em amostras de sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	34
Figura - 11	Frequências de monócitos/macrófagos CD16 ⁺ (A) e CD16 ⁻ (B) expressando os receptores CCR2 e CX3CR1 em amostras de sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	37
Figura - 12	Frequências de dupla marcação dos receptores CCR2 e CX3CR1 em monócitos/macrófagos CD16 ⁺ e CD16 ⁻ do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	38
Figura - 13	Concentrações de CCL20 (A), CCL28 (B), CXCL10 (C), CCL5 (D), CCL2 (E) e CX3CL1 (F) no soro e leite materno de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	40
Figura - 14	Concentrações de IL-8 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e IL-10 (D) no soro e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	41

LISTA DE TABELAS

Tabela - 1	Marcadores de superfície celular de linfócitos T <i>naive</i> , de memória e ativados	19
Tabela - 2	Marcadores de superfície celular de linfócitos B <i>naive</i> , de memória e plasmócito	19
Tabela - 3	Marcadores de superfície celular de linfócitos B <i>naive</i> , de memória e plasmócito	20
Tabela - 4	Marcadores de superfície celular de macrófagos	20
Tabela - 5	Kits para dosagem das quimiocinas analisadas no presente trabalho	22
Tabela - 6	Caracterização materna e dos lactentes, tipos de aleitamento, infecções e sintomas	24
Tabela - 7	Frequência de linfócitos T CD4 totais, <i>naive</i> , de memória e ativados no sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	25
Tabela - 8	Frequências de linfócitos TCD8 totais, <i>naive</i> e de memória no sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	29
Tabela - 9	Frequências de linfócitos B CD19+ totais, B <i>naive</i> , B de memória e plasmócitos no sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	33
Tabela - 10	Frequências de monócitos (sangue) e macrófagos (leite) CD14+HLA-DR+, e suas subpopulações de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S)	36
Tabela - 11	Índices de correlação entre quimiocinas e citocinas nos soros de mães de lactentes com infecção respiratória (I) e nos soros de mães de lactentes saudáveis (S)	42
Tabela - 12	Índices de correlação entre quimiocinas e citocinas nos leites de mães de lactentes com infecção respiratória (I) e nos leites de mães de lactentes saudáveis (S)	43

RESUMO

ZHENG Y. *Influência da infecção no lactente na expressão de quimiocinas e de seus receptores envolvidos no homing de leucócitos para o leite materno* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Estudos têm mostrado que a composição imunológica do leite materno pode sofrer alterações durante o período de infecção dos lactentes, levando à presença de um maior número de leucócitos no leite. As quimiocinas e seus receptores específicos possuem um papel fundamental no processo de migração celular para os tecidos e influenciam a presença dos leucócitos no leite. O objetivo deste estudo foi investigar possíveis alterações no perfil de expressão das quimiocinas e de seus receptores envolvidos no *homing* de leucócitos para o leite materno em resposta a infecções respiratórias presentes nos lactentes. A casuística foi composta por amostras de sangue periférico e de leite maduro de 33 mães saudáveis de lactentes com infecção respiratória (Grupo I) e de 26 mães saudáveis de lactentes saudáveis (Grupo S). A expressão dos receptores de quimiocinas e os níveis de citocinas séricas foram analisados por citometria de fluxo. As concentrações das quimiocinas no soro e no leite materno foram determinadas por ELISA. Não foi observada diferença na frequência de leucócitos totais no leite entre os grupos, porém houve um aumento da frequência dos linfócitos TCD3 totais e de linfócitos B, e também de macrófagos totais nas amostras de leite do Grupo I. As subpopulações de linfócitos T e B, no leite, não apresentaram diferenças em suas frequências entre os grupos, entretanto no Grupo I houve um aumento de macrófagos anti-inflamatórios e diminuição dos pró-inflamatórios comparado ao Grupo S. A análise dos receptores de quimiocinas mostrou que no Grupo I as frequências de CCR5 e de CCR6 nos linfócitos TCD4 *naïve* e de CCR6 nos linfócitos TCD8 *naïve* estavam diminuídas comparadas ao Grupo S. Além disso, houve uma prevalência de expressão de CCR5 nos linfócitos T do leite. Já nos macrófagos do leite, houve um aumento da frequência da dupla marcação CCR2⁺CX3CR1⁺ no CD16⁻ no Grupo I comparado ao Grupo S. A análise das quimiocinas no leite mostrou um aumento dos níveis de CCL20, CXCL10, CCL2 e CX3CL1 e diminuição de CCL28 no Grupo I comparado ao Grupo S. As concentrações de IL-8 e IL-6 estavam elevadas nas amostras de leite de Grupo I em relação ao Grupo S e se mostraram positivamente correlacionadas com a produção das quimiocinas no leite, especialmente durante a infecção nos lactentes. Os resultados apresentados indicam que a infecção respiratória vigente no lactente influenciou a presença de linfócitos TCD3, linfócitos B e macrófagos anti-inflamatórios no leite materno, provavelmente em decorrência do aumento nos níveis de CCL20, CXCL10 e CX3CL1, que se mostraram positivamente correlacionados com as citocinas inflamatórias IL-8 e IL-6. Portanto, podemos concluir que há mudanças dinâmicas no perfil imunológico do leite materno em relação ao sangue, o que pode nos indicar algum tipo de adaptação deste excepcional compartimento imunológico de forma a prover ao lactente enfermo componentes bioativos específicos de proteção frente à infecção.

Descritores: Leite humano; Lactente; Doenças respiratórias; Linfócitos T; Linfócitos B; Macrófagos; Quimiocinas; Migração e rolagem de leucócitos; Movimento celular; Receptores de quimiocinas.

SUMMARY

ZHENG Y. *Influence of the nursing infant infection on the expression of chemokines and their receptors involved in leukocyte homing into breast milk* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Studies have shown that immune components of human milk can be changed during an infection in the nursing infant, leading to increased leukocyte numbers in milk. Chemokines and their specific receptors play a key role in the process of cell migration to tissues and influence the presence of leukocytes in milk. The aim of this study was to investigate possible changes in the expression profile of chemokines and their receptors involved in leukocyte homing into breast milk in response to ongoing respiratory infections in the nursing infants. Peripheral blood and mature milk were collected from 33 healthy mothers of nursing infants with respiratory infections (Group I) and from 26 healthy mothers of healthy nursing infants (Group S). Chemokine receptors expression and cytokine levels were analyzed by flow cytometry, and chemokine levels were quantified by ELISA in maternal serum and milk. There was no difference in the frequency of total milk leukocytes between groups; however there was an increase in total TCD3 and B lymphocytes, and also in total macrophage frequencies in milk samples from Group I. T and B lymphocyte subsets, in milk, did not show differences in their frequencies between groups, yet in Group I there was an increase of anti-inflammatory macrophages and a decrease of pro-inflammatory macrophages compared to Group S. Chemokine receptor analyses have showed that, in Group I, the frequencies of CCR5 and CCR6 in naive TCD4 and CCR6 in naive TCD8 lymphocytes were decreased compared to Group S. In addition, there was a prevalence of CCR5 expression in milk T lymphocytes. Furthermore, in milk macrophages, there was an increase of double-labeled CCR2⁺CX3CR1⁺ frequencies in CD16⁻ in Group I compared to Group S. Chemokine analyses in milk have showed an increase in CCL20, CXCL10, CCL2 and CX3CL1 levels and a decrease in CCL28 in Group I compared to Group S. IL-8 and IL-6 concentrations were higher in milk from Group I compared to Group S, and they were positively correlated with the production of chemokines in milk, especially during infant infection. The results indicate that ongoing infections in the nursing infant have influenced the presence of TCD3 lymphocytes, B lymphocytes and anti-inflammatory macrophages in breast milk, probably due to the increase in CCL20, CXCL10 and CX3CL1 levels, which were shown to be positively correlated with inflammatory cytokines IL-8 and IL-6. Therefore, we can conclude that there are dynamic changes in the immunological profile of breast milk compared to blood, which may indicate some kind of adaptation of this exceptional immune compartment in order to provide the sick infant with specific protective bioactive components against infection.

Descriptors: Milk, human; Infant; Respiratory tract diseases; T-Lymphocytes; B-Lymphocytes; Macrophages; Chemokines; Leukocyte rolling; Cell movement; Receptors, chemokine.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que o aleitamento materno seja iniciado até uma hora após do nascimento do neonato e exclusivo até os 6 meses de idade e deva ser continuado até os 2 anos, mesmo com a alimentação complementar (WHO, 2017). O leite humano, além de seu valor nutricional, apresenta diversos fatores de proteção com ação anti-infecciosa como: leucócitos, anticorpos, quimiocinas, enzimas, citocinas, componentes do sistema complemento, oligossacarídeos, nucleotídeos, peptídeos, lipídeos e hormônios que interagem entre si e com as mucosas dos tratores digestivo e respiratório superior do recém-nascido, conferindo, além da imunidade passiva, estímulo ao desenvolvimento e maturação do sistema imunológico do neonato (Barros e Carneiro-Sampaio, 1984; Grumach et al., 1993; Radillo et al., 2013).

Ao longo da lactação, o leite passa por uma alteração gradual na sua composição, sendo classificado como: colostro, leite de transição e leite maduro. O colostro, produzido até o sétimo dia após o parto e em pouca quantidade em comparação ao leite maduro, é rico em proteínas, em componentes bioativos como a IgA secretora, lactoferrina, leucócitos, assim como fatores de crescimento, porém apresenta baixas concentrações de carboidratos e de gordura, o que sugere que sua principal função não é nutricional, mas imunológica, oferecendo uma proteção imediata ao neonato (Ballard e Morrow, 2013; Jenness, 1979; Castellote et al., 2011) .

Já o leite de transição ocorre entre o sétimo dia e a segunda semana pós-parto e apresenta características mistas de colostro e de leite maduro, dando suporte à necessidade nutricional e de desenvolvimento ao crescimento

rápido do lactente. A partir da quarta semana pós-parto, o leite materno já pode ser considerado maduro. Diferente do colostro, o leite maduro apresenta menor conteúdo proteico e de imunocomponentes, porém concentrações mais altas de carboidratos e de gorduras, o que reforça sua importância nutricional (Saint et al., 1984; Kulski e Hartmann, 1981; Trend et al., 2015; Trend et al., 2016).

Os componentes nutricionais do leite humano podem ser sintetizados pelas células das glândulas mamárias, ou podem ser originários da dieta, ou de reservas materna. Contudo, a composição do leite é pouco afetada pelo estado nutricional ou imunológico materno (Ballard e Morrow, 2013). Em nossos estudos, assim como no estudo de Hahn-Zoric e colaboradores (1997), foi demonstrado que em lactantes com deficiência seletiva de IgA, a presença de anticorpos IgG e IgM em níveis aumentados no seu leite constitui um mecanismo de compensação para a falta de IgA secretória (IgAS) nas mucosas e a ação biológica desses anticorpos é tão eficiente quanto a observada em mulheres saudáveis (Palmeira et al., 2009; Quinello et al., 2010). Estudo do nosso grupo também mostrou que apesar das mães asmáticas apresentarem perfil mais inflamatório, em comparação com mães saudáveis, não existe diferença significativa nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no colostro. Tudo indica que o leite materno é capaz de se adaptar às necessidades do lactente, sempre visando proteger esse novo ser, independente do estado fisiológico da mãe (Correa-Silva, 2008).

O leite humano contém uma variedade de células, incluindo macrófagos, linfócitos T, células-tronco, linfócitos B e células epiteliais. No início da lactação, o lactente pode consumir até 10^{10} leucócitos maternos por dia. Acredita-se que os leucócitos encontrados no leite possam ser originários

dos vasos sanguíneos e linfáticos ou do próprio compartimento da glândula mamária, por meio de diapedese na membrana basal pela via paracelular, entrando no leite (Seelig e Beer, 1981; Lin et al., 1995). As células imunológicas do leite materno, além de conferir uma imunidade ativa ao bebê, também estão envolvidas na proteção da glândula mamária contra infecções (Zhou et al., 2000; Vidal et al., 2001; Lonnerdal, 2003)

Imunologia da mucosa mamária e homing de leucócitos para mucosa

As mamas são revestidas pela superfície mucosa que conta com um sistema imunológico especializado chamado tecido linfoide associado às mucosas (MALT), assim como ocorre no intestino. Nesse local, os antígenos das superfícies mucosas são captados por células epiteliais especializadas chamadas células M e pelas células dendríticas (DCs), que se infiltram no epitélio, captam antígenos e os apresentam aos linfócitos localizados na lâmina própria. Os linfócitos, após o contato com o antígeno no intestino, são estimulados e, em seguida, migram pelas vias linfáticas até os linfonodos mesentéricos, entram na circulação sanguínea através do ducto torácico, e se diferenciam em células efetoras até alcançarem outras superfícies mucosas e tecidos glandulares, como a mama, ou voltar à mucosa de origem, pelo mecanismo chamado *homing*. A proteção da mucosa é dependente do *homing* e do agrupamento eficiente das células T efetoras $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, assim como de plasmócitos secretores de anticorpos IgA (Brandtzaeg e Pabst, 2004; Brandtzaeg e Johansen, 2005; Rimoldi et al., 2005).

O *homing* é o processo de migração de leucócitos para um tipo restrito de tecido ou para um tecido que tenha sofrido lesão, mediado pela liberação de

quimiocinas (citocinas quimiotáticas) que se ligam aos seus receptores específicos nos leucócitos (Sullivan et al., 2002). A quimiotaxia envolve a capacidade da célula de detectar um sinal inflamatório, aderir à matriz do tecido através de receptores de adesão e redistribuir os receptores ao longo da membrana celular, a fim de impulsionar a célula num processo de rolamento, mecanismo que os leucócitos do sangue utilizam para aderir e atravessar a parede vascular e atingir os tecidos (Carr, 2000; Sullivan et al., 2002).

As quimiocinas são membros de uma família de pequenas proteínas de massa molecular entre 8 e 12kDa e são divididas em quatro subfamílias (CXC, CC, CX₃C e C). As duas principais subfamílias de quimiocinas são CC e CXC e são produzidas pelos leucócitos e por vários tipos celulares teciduais, como as células endoteliais, epiteliais e os fibroblastos (Rollins, 1997; Ward et al., 1998). Tais moléculas estão envolvidas em funções biológicas importantes como a angiogênese, hematopoese, desenvolvimento embrionário, desenvolvimento de linfócitos T e B e regulação da resposta imune normal, maturação de células dendríticas, crescimento tumoral e metástase, alergia, doenças autoimunes, doenças infecciosas e inflamação. Em situação de inflamação, lesão tecidual ou infecção, as quimiocinas são induzidas e recrutam leucócitos efetores para o local (Rollins, 1997; Ward et al., 1998; Guerreiro et al., 2011).

Já os receptores de quimiocinas apresentam peso molecular por volta de 40 kDa e são designados CXCR1 a CXCR6 (ligantes das quimiocinas CXC), CCR1 a CCR11 (ligantes das quimiocinas CC), CX₃CR1 (ligante da fractalcina) e XCR1 (ligante da linfotactina). Células T e B expressam diferentes receptores de quimiocinas que contribuem com o tráfego seletivo, tanto para levar as células *naïves* a locais onde possam encontrar o antígeno pela primeira vez,

como para os tecidos inflamados para exercerem suas funções efetoras (Murphy et al., 2000; Murphy, 2002; Charo e Ransohoff, 2006; Soldevila e García-Zepeda, 2007).

A presença de quimiocinas no leite materno ainda é pouco estudada. Radillo e colaboradores (2013) descreveram a presença de CCL27 (CTAK) e de CCL7 (MCP-3) tanto no colostro, quanto no leite maduro. A CCL27 é predominantemente produzida na pele pelos queratinócitos (Morales et al., 1999), cujo ligante é o CCR10 que, por sua vez, é muito expresso nas células T ativadas e de memória que estão associadas ao *homing* para a pele (Soler et al., 2003). Já a CCL7 é produzida pelas células epiteliais e pela lâmina própria do intestino e é capaz de atrair monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos que expressam os receptores CCR1, CCR2, CCR3 e CCR5 (Wedemeyer et al., 1999; Helwig et al., 2000; Menten et al., 2001). Foi demonstrado que o colostro apresenta níveis mais elevados das quimiocinas CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP-10), CXCL9 (MIG) e CCL2 (MCP-1) do que o leite maduro (Böttcher et al., 2000; Takahata et al., 2003; Kverka et al., 2007; Radillo et al., 2013).

A CCL5 possui atividade quimiotática específica para células T de memória (Sim et al., 1995; Alam, 1997), enquanto a CXCL9 e a CXCL10 são ambas induzidas por IFN- γ , que é indutor exclusivo da CXCL9, enquanto a CXCL10 também pode ser induzida pelo IFN do tipo I (Luster et al., 1985; Farber, 1990; Amichay et al., 1996). Além disso, a produção de CXCL10 também pode ser induzida por lipopolissacarídeo e adenovírus via ativação do NF- κ B (Borgland et al., 2000; Innocenti et al., 2001). Uma vez que as células são atraídas pelas quimiocinas, o menor número de leucócitos no leite em relação ao colostro (Trend et al., 2015; Trend et al., 2016) pode estar de acordo

com a menor concentração de quimiocinas no leite em relação ao colostro (Kverka et al., 2007; Radillo et al., 2013).

Macrófagos no leite materno

Os monócitos se originam da medula óssea e são liberados no sangue periférico, onde circulam por vários dias antes de entrar nos tecidos e reabastecer as populações de macrófagos teciduais. Os macrófagos estão entre os leucócitos mais abundantes na mucosa de todas as espécies de mamíferos e provavelmente a maior população de fagócitos mononucleares no corpo humano (Hume, 2006), o que pode justificar a sua grande presença no leite humano.

Monócitos e macrófagos podem ser divididos em dois subgrupos principais: clássicos/inflamatórios (CD16⁻) e não-clássicos/anti-inflamatórios (CD16⁺) (Geissmann et al., 2003; Weber et al., 2000). Monócitos e macrófagos clássicos apresentam alta expressão de CCR2 e baixa expressão de CX3CR1 e são encontrados principalmente no sangue, enquanto os monócitos e macrófagos não-clássicos são amplamente encontrados na mucosa intestinal e são caracterizados pela baixa expressão de CCR2, porém alta expressão de CX3CR1 (Nahrendorf et al., 2007). Estímulos pró-inflamatórios, metabólicos e imunológicos aumentam o recrutamento de monócitos para locais periféricos, onde ocorre diferenciação em macrófagos e DCs, contribuindo para a defesa do hospedeiro e a reparação e remodelação tecidual. Em geral, os monócitos e macrófagos clássicos participam da resposta inflamatória induzida por patógenos ou danos aos tecidos, enquanto os monócitos e macrófagos não-clássicos têm várias funções, incluindo função anti-inflamatória e resposta a

danos vasculares para facilitar a cicatrização, revascularização e remodelação (Nahrendorf et al., 2007; Auffray et al., 2007). Monócitos e macrófagos que expressam CCR2 podem ser recrutados para o local inflamatório por meio das quimiocinas CCL2, CCL4 e CCL8, enquanto o CX3CL1 é o ligante exclusivo para os que expressam CX3CR1 (Mowat e Bain, 2011).

Linfócitos T no leite materno

Os linfócitos do leite humano compreendem de 5 a 9% dos leucócitos totais, sendo a maioria composta por linfócitos T (entre 60 e 73%) (Crago et al., 1979; Richie et al., 1980). É bem descrito que a maioria dos leucócitos do leite estão na sua forma ativa e assim são encontrados mais de 90% dos linfócitos T do leite (Wirt et al., 1992).

A expressão de receptores de quimiocinas nas subpopulações de linfócitos T é heterogênea e depende do seu estado de maturidade e de ativação (Smit e Lukacs, 2006). Células Th1 humanas expressam preferencialmente CCR5 e CXCR3, enquanto a maioria das células Th2 expressam CCR4, o que poucas Th1 fazem (Kim et al., 2011). A expressão de CCR5 pela maioria de células Th1 e monócitos permite que esses dois tipos celulares sejam frequentemente recrutados aos sítios de inflamação, através do reconhecimento de numerosas quimiocinas, como a CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES), que são produzidas em altos níveis por leucócitos nestes locais, o que pode aumentar a ativação dos fagócitos mononucleares por IFN- γ produzido por células Th1 (Mo et al., 1998; Viola et al., 2008). Já as células que expressam CXCR3 são atraídas pela liberação de CXCL10, também conhecida como proteína indutora de interferon (IP-10), que por sua

vez é produzida em alta concentração durante a inflamação mamária (Groom e Luster, 2011; Rainard et al., 2013). Os ligantes para CCR4, CCL17 e CCL22, são comumente expressos por leucócitos nos sítios de processos alérgicos, o que atrai células Th2, que contribuem para a patogênese alérgica. A maioria das células Th17 expressam CCR6 (Liu e Rohowsky-Kochan, 2008), o que ajuda a direcionar essas células para os tecidos, como o tecido mamário inflamado que produz altos níveis de CCL20, único ligante para CCR6 (Rainard et al., 2013; Williams, 2006).

Os linfócitos T CD8 efetores, também conhecidos como células T citotóxicas, podem expressar receptores de quimiocinas diferentes de acordo com o estímulo e o antígeno apresentado pelas células dendríticas. Os receptores mais conhecidos expressos por essas células são o CCR5 e o CXCR3, que as direcionam aos locais de inflamação. Em adição, é descrito também que as células T citotóxicas, assim como as T CD4 encontradas em tecidos da mucosa expressam, em sua maioria, o CCR6 (Francis et al., 2008; Barbarroja-Escudero et al., 2014).

Linfócitos B no leite materno

O número de linfócitos B no leite humano constitui uma pequena porcentagem do total de linfócitos, entretanto, a concentração de anticorpos IgA é alta, principalmente no colostro. Em geral, a ativação de células B e diferenciação para células de mucosa produtoras de anticorpos IgA (plasmablastos e plasmócitos) induz o aumento da expressão de CCR10 e integrina $\alpha 4\beta 1$, que se ligam a CCL28 e VCAM-1 nas mucosas, respectivamente. A diferenciação de plasmablastos produtores de IgA nos

tecidos linfoides do intestino delgado, adicionalmente, induz a expressão de CCR9 e $\alpha 4\beta 7$, que orienta o *homing* de volta para o intestino delgado que, por sua vez expressa os ligantes CCL25 e MAdCAM-1, respectivamente. Durante a lactação, os plasmócitos produtores de IgA CCR10⁺ também são recrutados e retidos nas glândulas mamárias pelo aumento da produção de CCL28 (Wilson e Butcher, 2004; Bourges et al., 2008). Consequentemente, 90% das imunoglobulinas secretadas no leite materno são IgA (Goldman, 1993). Por outro lado, plasmócitos secretores de IgG ou IgM não são atraídos por CCL28 *in vitro* e, assim, não se acumulam na glândula mamária (Wilson e Butcher, 2004). Em contraste, estas células apresentam aumento da expressão de CXCR3, que responde as quimiocinas CXCL9 e CXCL10, direcionando a migração para tecidos inflamados, tanto na mucosa, quanto sistêmicos (Macpherson et al., 2008). Estudos demonstram que CCR6 também pode ser expresso em linfócitos B de memória, podendo contribuir para a migração dessas células para a mucosa (Krzysiek et al., 2000; Bhattacharya et al., 2007).

Mais especificamente, foi demonstrado que a maioria das células B do leite materno exibe um fenótipo de células B de memória IgD⁻. Elas apresentam um perfil particular de moléculas de adesão (CD44⁺, CD62L⁻, $\alpha 4\beta 7^{+/-}$, $\alpha 4\beta 1^{+}$) sugerindo, mais uma vez, que estas células podem ser provenientes do GALT. A maior parte destas células está ativada e, um trabalho mostrou que os plasmócitos do leite materno produzem principalmente anticorpos IgG (Tuailon et al., 2009). Esses autores sugerem que o extravasamento de células B do epitélio mamário para o leite pode implicar em um processo de seleção negativa operando no epitélio alveolar ou ducto mamário. Pode-se supor que as células B de memória IgA⁺ são ancoradas mais fortemente no tecido da

glândula mamária do que as células correspondentes IgG⁺, porque essas últimas apresentam uma atração mais fraca pela quimiocina CCL28, permitindo o tráfego do tecido mamário para o leite materno (Tuaille et al., 2009).

O **Quadro 1**, a seguir, resume as quimiocinas e seus receptores presentes nos leucócitos estudados neste trabalho.

Quadro 1. Quimiocinas e seus respectivos receptores expressos nos diferentes leucócitos.

QUIMIOCIAS		RECEPTORES		LEUCÓCITOS
IP-10	CXCL10	————	CXCR3	Th1, NK
MCP-1	CCL2	————	CCR2	Mo, T. at, B, NK, Ba, iDC
RANTES	CCL5	————	CCR5	Mo, MΦ, Th1, T. at, NK
MIP-3α	CCL20	————	CCR6	B, NK, iDC
MEC	CCL28	————	CCR10	T. at, T. muc, T. pele, B, P
FRACTALCINA	CX3CL1	————	CX3CR1	Mo, MΦ, Th1, iDC, NK
Inflamatória			Inflamatória e Homeostática	

Th1 = Linfócitos T Th1; NK = Células *natural killer*; Mo = Monócitos; T = Linfócitos T; T at = Linfócitos T ativados; B = Linfócitos B; Ba = Basófilos; iDC = Células dendríticas imaturas; MΦ = Macrófagos; T. muc = Linfócitos T da mucosa; T. pele = Linfócitos T da pele; P = Plasmócitos. Adaptado de Mantovani et al., 2004.

Alteração da composição imunológica do leite

Até poucos anos atrás, acreditava-se que a composição imunológica do leite maduro era constante, contudo dois diferentes estudos, Riskin et al. (2012) e Hassiotou et al. (2013) observaram que mães saudáveis são capazes de responder imunologicamente durante a infecção ativa de seus lactentes. Foi observado que, tanto no sangue, quanto no leite materno ocorre o aumento do número total de leucócitos, especificamente de linfócitos B, macrófagos e neutrófilos, assim como os níveis de TNF-α. Estes resultados evidenciam a natureza dinâmica da proteção imunológica fornecida aos lactentes doentes. Embora o mecanismo responsável por esse fenômeno não esteja claro, é

discutido que a exposição do lactente à uma infecção poderia estimular uma resposta imunológica materna que se manifesta sem sintomatologia evidente, mas que poderia influenciar na composição leucocitária do leite materno. Os autores acima sugerem que uma possível explicação para tal fato seria que durante a amamentação, ocorre o aumento dos níveis de ocitocina, que leva ao aumento da pressão no ducto mamário, provocando sua dilatação e a consequente liberação do leite do mamilo para a boca do lactente. No final da mamada, com a diminuição dos níveis de ocitocina, a pressão do ducto diminui, assim como a sua dilatação. Neste momento, o leite pode refluir para dentro da mama, provavelmente acompanhado da saliva da boca do lactente, transferindo, desta forma, os microrganismos para as glândulas mamárias da mãe, o que poderia estimular sua resposta imune e levar ao recrutamento dos leucócitos maternos para a mama.

No entanto, esses trabalhos não estudaram os mecanismos responsáveis pelo recrutamento destes leucócitos. Como já citado, estes mecanismos são cruciais para a presença e atividade efetora de linfócitos e macrófagos na glândula mamária. Desta forma, torna-se crucial o estudo de tais mecanismos para que possamos entender não só a presença, como a função destas células no leite humano e seu possível papel no estímulo da resposta imune do lactente.

Justificativa

O leite materno, por meio de seus componentes imunológicos e bioativos, oferece ao lactente, além de uma nutrição adequada, uma imunidade passiva. Até recentemente, acreditava-se que as alterações nos componentes

imunológicos do leite materno estavam relacionadas com o tempo que decorreu após o parto ou, em alguns casos, relacionadas com o estado nutricional da mãe. Ainda não havia se discutido se essa defesa passiva e relativamente constante poderia mudar de acordo com as necessidades vigentes do lactente em resposta a algumas situações, como as infecções.

A variação do número de leucócitos no primeiro mês pós-parto e durante uma possível infecção do lactente sugere que a composição imunológica do leite pode estar vinculada às necessidades imunológicas do lactente (Riskin et al., 2012). As quimiocinas possuem um papel fundamental no processo de migração das células para os tecidos e, seguramente, influenciam na presença dos leucócitos no leite materno. Todavia, a sua expressão e sua relação com o número e perfil dos leucócitos presentes no leite humano ainda são questões pouco estudadas.

A análise dos níveis de quimiocinas e sua correlação com os leucócitos no leite materno durante uma infecção vigente do lactente permite um maior entendimento da interação materno-infantil por meio da amamentação.

Hipótese

Nossa hipótese é que lactentes infectados são capazes de induzir uma resposta imune local nas mamas de suas mães, promovendo um aumento e possível modificação da expressão de quimiocinas produzidas localmente, o que pode acarretar no aumento do influxo de leucócitos e mudança do perfil dessas células nas glândulas mamárias durante o período de infecção aguda do lactente.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é investigar possíveis alterações no perfil de expressão das moléculas envolvidas no *homing* de leucócitos para o leite materno em resposta a infecções respiratórias presentes nos lactentes.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar no sangue e no leite maduro de mães saudáveis de lactentes com infecção respiratória (Grupo I) e de mães saudáveis de lactentes saudáveis (Grupo S):

- a) As subpopulações de linfócitos, T e B, e macrófagos:
- b) A expressão dos receptores envolvidos no *homing* das subpopulações de linfócitos T e B e macrófagos para o leite;
- c) Os níveis das quimiocinas envolvidas no *homing* das subpopulações de linfócitos T e B e macrófagos para o leite.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ética

A coleta somente foi realizada após aprovação do Comitê de Ética do Hospital Universitário e do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPEsq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (parecer HU N° 1.786.170 em 21/10/2016 e Cappelq N° 1.754.872 em 27/09/2016). Todas as mães foram informadas dos objetivos do projeto e o destino de suas amostras e a coleta somente foi realizada após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

3.2 Casuística

Trata-se de um estudo de corte transversal para o qual foram coletadas amostras de sangue periférico e de leite maduro de dois grupos de mães saudáveis: Grupo I (Infectado), composto por amostras de mães de lactentes doentes no momento da coleta; e Grupo S (Saudável), composto por mães de lactentes saudáveis no momento da coleta. Nenhuma amostra foi coletada dos lactentes.

As coletas foram realizadas no Pronto Socorro Infantil e na Enfermaria Pediátrica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, com o auxílio da Dra. Eloísa Correa de Souza e Dr. Alfredo Elias Gilio e na Clínica Particular da Dra. Regina Maria Rodrigues, médica plantonista do ICr e colaboradora do presente trabalho. O número de participantes foi 33 e 26, para o Grupo I e S, respectivamente.

Para a seleção das mães foram considerados os seguintes critérios:

- Critérios de inclusão: mães saudáveis em fase de lactação cujo lactente esteja em aleitamento diretamente no seio materno e com idade entre 1 e 12 meses; nascidos sadios, a termo, com peso adequado para a idade gestacional. Para o Grupo I, os lactentes deveriam apresentar infecção respiratória vigente no momento da coleta, com diagnóstico confirmado clínica e/ou laboratorialmente pela equipe médica. E para o Grupo S, foram utilizados os mesmos critérios, porém os lactentes deveriam estar saudáveis, sem nenhum sintoma de doença por, pelo menos, 7 dias antes da coleta.

- Critérios de exclusão: doenças maternas sistêmicas como diabetes ou hipertensão; uso materno de qualquer tipo de medicação ou drogas ilícitas; doenças infecciosas graves durante a gestação, no período do parto ou durante a lactação; reações sorológicas positivas para doenças infectocontagiosas, como infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), TORCHS (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes simplex e sífilis) e malária, doenças autoimunes (como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide juvenil); presença materna de mastite, febre, gripe ou resfriado, tosse, pneumonia, diarreia, vômito ou alergias.

3.3 Obtenção das amostras de sangue periférico e de leite

O sangue materno foi coletado da veia periférica no volume de 10 ml e distribuído, parte em tubo com EDTA para realização da imunofenotipagem e parte em tubo com gel separador para a obtenção do soro, que foi aliquotado e armazenado a -80°C. A coleta do leite foi efetuada por ordenha manual com volume variando entre 20 e 30 ml em tubo Falcon de 50 ml e transportado

imediatamente, sob refrigeração, ao LIM-36, no Instituto da Criança. A **Figura 1** ilustra o delineamento metodológico do presente projeto.

Figura 1. Delineamento metodológico do presente projeto.

3.4 Obtenção das células e da fase líquida do leite

As amostras de leite foram centrifugadas por 30 minutos a 1800 rpm a 4°C para a formação do *pellet* celular, fase líquida e porção lipídica. O *pellet* celular foi coletado e lavado duas vezes com BD FACSFlow™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) acrescido de 10% de soro fetal bovino e as células seguiram para análise de imunofenotipagem no mesmo dia. A fase líquida foi aliquoteada e imediatamente armazenada em -80°C para posteriormente ser utilizada na quantificação das quimiocinas e citocinas. Já a porção lipídica do leite foi descartada.

3.5 Imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico e do leite materno

O número total de leucócitos obtidos do sangue periférico foi determinado com um contador automático (Sysmex XP-300, Sysmex Corporation, Kobe, Japão) e o número total de células do leite materno, por contagem em câmara de Neubauer. Para obtenção dos leucócitos sanguíneos foi realizada a lise das hemácias do sangue coletado em tubo com EDTA, com *Lysing Buffer* (BD Pharm Lyse™), seguida de duas lavagens com BD FACSFlow™. Posteriormente, os leucócitos obtidos do sangue periférico, assim como as células do leite foram marcados e incubados por 30 minutos com anticorpos, conjugados a fluorocromos, específicos para moléculas de superfície celular capazes de discriminar tipos e subtipos celulares, assim como para os receptores de quimiocinas (**Figura 2**). Todos os anticorpos utilizados foram da BD Biosciences (San Jose, CA, USA), exceto o anticorpo anti-receptor CCR2, cuja marca é R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Figura 2. Tipos e subtipos celulares, e os receptores de quimiocinas analisados no presente projeto.

As **Tabelas 1 a 4** mostram os fluorocromos e clones dos anticorpos utilizados para marcar cada molécula de superfície. Após a marcação, mais duas lavagens foram realizadas com o mesmo tampão e as suspensões celulares foram submetidas à leitura em citômetro de fluxo *FACS LRS II Fortessa* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), utilizando o *software BD FACSDiva*, onde foram adquiridos 100.000 eventos totais. A análise foi realizada no *software FlowJo*, onde cada população celular foi analisada separadamente através de *gates* utilizando como parâmetro o FSC (*forward scatter*) por SSC (*side scatter*). A **Figura 3** mostra a estratégia de gates para a análise dos leucócitos (Linfócitos T CD4 e CD8, linfócitos B e macrófagos) do leite.

Tabela 1. Marcadores de superfície celular de linfócitos T *naive*, de memória e ativados.

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Clones
CD3	BUV395	SK7
CD4	PerCPCy5.5	RPAT4
CD45RA	BV510	H100
CD69	APC	FN50
CCR6 (CD196)	BV421	11A9
CCR5 (CD195)	PECF594	2D7
CXCR3	PECy7	1C6
CD45	APCCy7	2D1

Tabela 2. Marcadores de superfície celular de linfócitos B *naive*, de memória e plasmócito.

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Clones
CD19	APCCy7	SJ25C1
CD27	V450	MT271
CD138	BV510	MI15
CD38	FITC	HIT2
CCR6	PECy7	11A9
CD45	BUV395	HI30

Tabela 3. Marcadores de superfície celular de linfócitos B *naïve*, de memória e plasmócito.

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Clones
CD19	APCCy7	SJ25C1
CD27	V450	MT271
CD138	BV510	MI15
CD38	FITC	HIT2
CCR10	PerCPCy5.5	1B5
CXCR3	PECy7	1C6
CD45	BUV395	HI30

Tabela 4. Marcadores de superfície celular de macrófagos.

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Clones
CD14	V500	M5E2
HLADR	APCH7	L243
CD16	FITC	NKP15
CCR2	APC	K036C2
CX3CR1	BV421	2A91
CCR5	PECF495	2D7
CD45	BUV395	HI30

Figura 3. Estratégia de gates para a análise dos linfócitos T CD4 e CD8, linfócitos B e macrófagos do leite.

3.6 Quantificação das quimiocinas e citocinas

As concentrações das quimiocinas no soro e no leite materno foram determinadas por ELISA. A **Tabela 5** ilustra as quimiocinas analisadas e seus respectivos fabricantes. As dosagens das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α foram realizadas pelo método de citometria de fluxo (Cytometric Bead Array – CBA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Todos os ensaios foram conduzidos de acordo com as instruções dos fabricantes.

Tabela 5. Kits para dosagem das quimiocinas analisadas no presente trabalho.

Quimiocinas	Kit	Fabricante
CCL2 (MCP-1)	Human CCL2/MCP-1 DuoSet Elisa	R&D Systems
CCL5 (RANTES)	Human CCL5/RANTES DuoSet Elisa	R&D Systems
CCL20 (LARC)	Human CCL20/MIP-3 DuoSet Elisa	R&D Systems
CCL28	Human CCL28 DuoSet Elisa	R&D Systems
CXCL10 (IP10)	Human CXCL10/IP-10 DuoSet Elisa	R&D Systems

3.7 Análise estatística

No presente trabalho, a análise estatística descritiva foi representada pelo cálculo das médias, medianas, valores mínimo e máximo e intervalos de confiança de 95%. A comparação entre os grupos foi realizada pelo Teste *T* de *Student* ou Teste de *Mann-Whitney*, conforme a normalidade dos dados. Para avaliar possíveis correlações entre quimiocinas e citocinas foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Toda a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 7.0 (Graph-Pad Software, LaJolla, CA, USA). Um limite de significância de 0,05 foi utilizado para todos os testes.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das mães e seus lactentes

A **Tabela 6** apresenta os dados demográficos e clínicos maternos e dos lactentes dos grupos I (lactentes com infecção respiratória) e S (lactentes saudáveis). As mães do grupo S apresentaram maior idade e menor número das gestações em relação às do grupo I. Os lactentes de ambos os grupos nasceram a termo e com peso adequado para idade gestacional. Aproximadamente 60% dos lactentes recebiam aleitamento materno exclusivo em ambos os grupos e, dos que recebiam alimentação complementar, 90% deles recebiam seio materno em livre demanda, mostrando que o estímulo areolomamilar era constante.

Em relação aos lactentes do grupo I, todos foram diagnosticados com infecções respiratórias: 26 casos de bronquiolite aguda, 5 com pneumonia e 2 com influenza. Dos 33 bebês doentes, 21 apresentaram alterações importantes no raio X torácico como infiltração, hiperinflação ou atelectasia; todos os lactentes com infecção apresentaram tosse, 91% tinham rinorreia e 75% tinham febre. Nenhum deles apresentou vômitos ou diarreia. De acordo com a descrição materna, os sintomas tiveram início 3 a 7 dias antes da coleta. Todos os lactentes do grupo I estavam recebendo tratamento médico que consistiu, principalmente, em inalação com soro fisiológico, contendo ou não broncodilatadores, e quando necessário, antibióticos, cortisol e antipirético de acordo com os sintomas e diagnóstico apresentados.

Tabela 6. Caracterização materna e dos lactentes, tipos de aleitamento, infecções e sintomas.

	Parâmetros	Grupo I (n = 33)	Grupo S (n = 26)	p
Dados maternos	Idade (anos) [*]	25 (23 – 29)	33 (25 – 36)	0,010
	Gestações, n ^{**}	2,4 (± 0,2)	1,8 (± 0,2)	0,024
	Parto cesariano, n (%)	12 (36%)	17 (65%)	0,049
Dados dos lactentes	Idade (meses) [*]	4 (2 – 5)	4 (3 - 7)	-
	Masculino, n (%)	21 (64%)	10 (38%)	-
	Tipo de aleitamento, n (%):			
	Exclusivo ¹	19 (58%)	16 (61%)	-
	Predominante ²	0	0	-
	Complementado ³	14 (42%)	10 (39%)	-
	Frequência do aleitamento, n (%):			
Doenças dos lactentes	Livre demanda	30 (91%)	24 (92%)	-
	Bronquiolite aguda, total, n (%):	26 (79%)	NA	
	- VSR, somente	10 (30%)		
	- VSR e otite média	2 (6%)		
	- Parainfluenza III, somente	1 (3%)		
	- Não específico	13 (39%)		
	Pneumonia, total, n (%):	5 (15%)		
	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> e VSR	1 (3%)		
	- Não específico	3 (9%)		
	- Não específico e otite média	1 (3%)		
Principais sintomas	Gripe, total, n (%):	2 (6%)		
	Febre	25 (75%)	NA	
	Tosse	33 (100%)		
	Rinorreia	30 (91%)		
	Diarreia	0		
	Vômito	0		
Início dos sintomas (dias antes da coleta)[*]		6 (3 - 7)	NA	

^{*} Mediana (intervalo de confiança entre 25% e 75%); ^{**} Média ± DP; n: número; Grupo I: mães de lactentes infectados; Grupo S: mães de lactentes saudáveis; - sem diferença estatística; ¹ Aleitamento materno exclusivo; ² Recebe alguns tipos de líquidos (água e bebidas baseadas em água, sucos de frutas); ³ Recebe qualquer tipo de alimento ou líquidos incluindo leite não humano ou fórmula (WHO, 2007); VSR: vírus sincicial respiratório; NA: Não se aplica.

4.2 Linfócitos T

Linfócitos T CD4 *naïve*, de memória e ativados

O número total de leucócitos não diferiu entre os grupos no leite (Grupo I: $58 \times 10^3/\text{mL}$ e Grupo S: $40 \times 10^3/\text{mL}$, $p = 0,071$) ou no sangue (Grupo I: $6,8 \times 10^6/\text{mL}$ e Grupo S: $6,5 \times 10^6/\text{mL}$, $p=0,322$). No leite, foram observadas frequências elevadas de linfócitos T CD3⁺ totais no grupo I comparado ao grupo H, com médias de 8,4% e 5,9%, respectivamente ($p=0,037$), enquanto no sangue não foram encontradas diferenças entre os grupos I e S, com média de 73,9% e 76,1%, respectivamente ($p = 0,12$). Não foram observadas diferenças entre os grupos nos linfócitos T CD4⁺ totais, tanto no leite, quanto no sangue. Por outro lado, apesar de não termos encontrado diferenças entre os grupos nas subpopulações de células T no leite, podemos observar uma menor frequência de linfócitos T CD4⁺ *naïve* e maior frequência de linfócitos T CD4⁺ de memória e ativados no sangue das mães do grupo I (**Tabela 7**).

Tabela 7. Frequência de linfócitos T CD4 totais, *naïve*, de memória e ativados no sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S).

	SANGUE			LEITE			Grupo I	Grupo S
	I	S	<i>p</i>	I	S	<i>p</i>	Sg x LM (<i>p</i>)	Sg x LM (<i>p</i>)
Totais[#]	61,8 (±1,3)	63,0 (±2,3)	-	64,0 (±3,1)	57,4 (±3,6)	-	-	-
Naïve	35,6 (±2,1)	42,4 (±2,5)	0,041	57,3 (±3,9)	60,7 (±3,7)	-	<0,0001	0,0002 ^a
Memória	64,5 (±2,1)	57,8 (±2,4)	0,048	53,9 (±4,7)	45,6 (±4,4)	-	0,034 ^a	0,022 ^a
Ativados	7,2 (2,0 - 12,4)	2,3 (0,9 - 3,5)	0,004	70,2 (±5,3)	80,17 (±4,6)	-	<0,0001	<0,0001

I: mães de lactentes com infecção; S: mães de lactentes saudáveis; Sg: sangue; LM: Leite materno; Resultados expressos em médias (± desvio padrão) e submetidos ao teste t de Student; Resultados expressos em medianas (intervalo de confiança entre 25% e 75%) e submetidos ao teste de *Mann-Whitney*; [#] % referente aos linfócitos T (CD3) totais; - não significativa.

Comparando o leite com o sangue, podemos observar que a frequência de linfócitos T CD4⁺ totais no leite é semelhante ao sangue, contudo, o leite apresenta menor frequência de linfócitos T CD4 de memória e maior frequência de linfócitos T CD4 *naïve* e ativados, em ambos os grupos.

Em relação à expressão dos receptores de quimiocinas nas subpopulações de linfócitos T CD4, comparando-se os grupos I e S, no sangue, não vimos diferenças nas frequências de TCD4⁺CCR5⁺ e de TCD4⁺CCR6⁺, porém no leite, houve uma diminuição dessas frequências na população de TCD4 *naïve* no grupo I em relação ao grupo S (**Figuras 4 e 5**).

Figura 4. Frequências de linfócitos T CD4⁺CCR5⁺ *naïve*, de memória e ativados do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S). * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Comparando as frequências dos receptores entre leite e sangue, observamos que a frequência de CCR5 é sempre maior no leite nas populações de TCD4 *naive*, de memória e ativada, independente do lactente estar infectado ou não (**Figura 4**).

Já as frequências dos receptores CCR6 e CXCR3 são maiores no leite em TCD4 *naive* em ambos os grupos. Nas subpopulações de TCD4 de memória, quando os lactentes estão saudáveis, as frequências desses dois receptores são maiores no sangue, porém essa diferença se perde quando os lactentes estão infectados.

Figura 5. Frequências de linfócitos T CD4⁺CCR6⁺ *naive*, de memória e ativados do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Já nos TCD4 ativados, enquanto os lactentes estão saudáveis, as frequências de CCR6 e CXCR3 são equivalentes entre o leite e o sangue, contudo quando os lactentes encontram-se infectados, as frequências são maiores no leite em relação ao sangue (**Figuras 5 e 6**).

Quanto à frequência de CXCR3, nenhuma diferença foi observada nas subpopulações de TCD4 entre os grupos no leite, porém, no sangue, vimos uma menor frequência no TCD4 de memória do grupo I em relação ao grupo S (**Figura 6**).

Figura 6. Frequências de linfócitos T CD4⁺CXCR3⁺ *naive*, de memória e ativados do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Vale ressaltar que existe uma sobreposição de expressão dos receptores, ou seja, uma co-expressão, e entre os três analisados, a frequência de CCR5 foi prevalente em todas as subpopulações de linfócitos T CD4 no leite, principalmente nas de memória e ativadas, chegando a aproximadamente 90%, enquanto para o CCR6 e o CXCR3, as frequências ficaram entre 20 e 70%, em ambos os grupos.

Linfócitos T CD8 *naïve* e de memória

As frequências de TCD8 totais e de suas subpopulações no leite são semelhantes às do sangue e não há diferenças quando comparamos os grupos I e S (**Tabela 8**).

Tabela 8. Frequências de linfócitos TCD8 totais, *naïve* e de memória no sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S).

	SANGUE			LEITE			Grupo I	Grupo S
	I	S	p	I	S	p	Sg x LM (p)	Sg x LM (p)
Total[#]	38,2 (±1,3)	36,8 (±2,3)	-	35,0 (±3,2)	42,6 (±3,6)	-	-	-
Naïve	51,05 (±3,1)	54,3 (±2,8)	-	53,49 (±4,3)	59,85 (±4,4)	-	-	-
Memória	48,94 (±3,1)	45,7 (±2,8)	-	49,89 (±4,6)	42,54 (±4,9)	-	-	-

I: mães de lactentes com infecção; S: mães de lactentes saudáveis; Sg: sangue; LM: Leite materno; Resultados expressos em médias (± desvio padrão) e submetidos ao teste t de Student; [#] % referente aos linfócitos T (CD3) totais; - não significativa.

Em relação às frequências dos receptores de quimiocinas, os linfócitos TCD8 *naïve* CCR5⁺ estão em maior frequência no leite em relação ao sangue no grupo S, o que não ocorre no grupo I, devido a variabilidade dos resultados.

Por outro lado, as frequências de linfócitos TCD8 de memória CCR5⁺ no grupo S são iguais entre o leite e o sangue, todavia, no grupo I, as frequências tornam-se menores no leite em relação ao sangue (**Figura 7**).

Figura 7. Frequências de linfócitos T CD8⁺CCR5⁺ *naive* e de memória do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Com relação ao receptor CCR6 nas subpopulações de TCD8 observamos que, no grupo I, houve uma menor frequência de TCD8 *naive* CCR6⁺ no leite quando comparado ao grupo S e a frequência dessa subpopulação é menor no leite em relação ao sangue também somente no grupo I. Não foram detectadas diferenças na expressão desse receptor nas células TCD8 de memória em ambos os grupos (**Figura 8**).

Já as frequências de CXCR3 entre os grupos I e S são iguais no leite e no sangue na subpopulação TCD8 *naive*. Por outro lado, no TCD8 de memória houve diferença entre os grupos no sangue, sendo menor no grupo I. Já comparando-se leite e sangue, as frequências de TCD8 *naive* CXCR3⁺ são semelhantes para os dois grupos, enquanto nos TCD8 de memória, esse

receptor apresenta frequências menores nos leites em relação aos sangues, em ambos os grupos (**Figura 9**).

Figura 8. Frequências de linfócitos T CD8⁺CCR6⁺ *naive* e de memória do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 9. Frequências de linfócitos T CD8⁺CXCR3⁺ *naive* e de memória do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Assim como nos linfócitos T CD4, nas subpopulações de linfócitos T CD8 do leite, o receptor que apresentou maior frequência também foi o CCR5,

em torno de 65%, enquanto o CCR6 e o CXCR3 mostraram frequências entre 10 e 40%, em ambos os grupos.

4.3 Linfócitos B e plasmócitos

Em comparação ao sangue, o leite apresenta uma menor frequência de linfócitos B totais, tanto no grupo I, quanto no grupo S. Além disso, a infecção no lactente é capaz de aumentar o número de células B totais no leite materno (**Tabela 9**).

Em relação às suas subpopulações, quando os lactentes encontram-se saudáveis, não há diferença nas suas frequências entre o leite e o sangue, contudo, foi possível observar que durante a infecção no lactente, houve uma diminuição na frequência de B *naïve* e um aumento na frequência de células B de memória no leite em relação ao sangue. A comparação entre os grupos não revelou diferenças nos leites entre os grupos I e S nas subpopulações de linfócitos B *naïve* e de memória, já no sangue, no período de infecção do lactente, a frequência das células B *naïve* aumenta, enquanto a de memória diminui (**Tabela 9**).

A frequência de plasmócitos é muito maior no leite comparado ao sangue, independente da presença ou ausência de infecção, onde não foram detectadas diferenças entre os grupos I e S, tanto no leite, quanto no sangue (**Tabela 9**). É interessante ressaltar que as porcentagens observadas de plasmócitos no leite estão dentro da população de memória, pois ambas são delimitadas por CD27 e, portanto, praticamente todas as células de memória do leite são plasmócitos.

Tabela 9. Frequências de linfócitos B CD19⁺ totais, B *naïve*, B de memória e plasmócitos no sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S).

	SANGUE [#]			LEITE ^{##}			Grupo I	Grupo S
	I	S	p	I	S	p	Sg x LM (p)	Sg x LM (p)
Total	21,6 (±1,4)	17,5 (±1,9)	-	11,9 (±1,6)	6,1 (±0,7)	0,004	<0,0001	<0,0001
Naïve	44,6 (±2,7)	34,4 (±4,2)	0,038	27,6 (±3,0)	24,7 (±3,7)	-	<0,0001	-
Memória	55,1 (±2,7)	65,7 (±4,2)	0,031	72,3 (±3,0)	75,9 (±3,8)	-	<0,0001	-
Plasmócitos	0,73 (0,3 - 1,0)	0,56 (0,2 - 1,1)	-	71,7 (64,3 - 86,6)	84 (74,0 - 91,0)	-	<0,0001	<0,0001

I: mães de lactentes com infecção; S: mães de lactentes saudáveis; Sg: sangue; LM: Leite materno; Resultados expressos em médias ($\pm$ desvio padrão) e submetidos ao teste t de Student; Resultados expressos em medianas (intervalo de confiança entre 25% e 75%) e submetidos ao teste de *Mann-Whitney*; [#] % referente aos linfócitos totais do sangue; ^{##} % referente aos leucócitos CD45⁺ do leite; - não significativa.

Não foram encontradas diferenças estatísticas nas frequências de linfócitos B *naïve* e de memória CCR6⁺, CCR10⁺ e CXCR3⁺ no leite ou no sangue entre os dois grupos.

Figura 10. Frequências de linfócitos B *naïve* e de memória expressando os receptores CCR6 (A), CCR10 (B) e CXCR3 (C) em amostras de sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

A comparação das frequências de células B entre o leite e sangue dentro do mesmo grupo revelou que quando os lactentes estão saudáveis as frequências de CCR6 e CXCR3 nos linfócitos B de memória são semelhantes, todavia, quando os lactentes encontram-se infectados, as frequências desses dois receptores são menores no leite em relação ao sangue. Já nos linfócitos B *naive*, as frequências desses receptores comparando-se leite e sangue são semelhantes, tanto no grupo saudável, quanto no infectado. As frequências de células B *naive* e de memória CCR10⁺ são sempre maiores no leite em relação ao sangue, independente do estado de saúde dos lactentes (**Figura 10**). Devido à presença reduzida de plasmócitos no sangue, as frequências dos receptores de quimiocinas nessas células foram analisadas somente nas amostras de leite, observando-se alta frequência dos três receptores analisados, porém sem diferenças entre os grupos (dados não mostrados).

Diferente dos linfócitos T, de um modo geral para os dois grupos, no leite, nos linfócitos B *naive*, o receptor que apresentou maior frequência foi o CXCR3, aproximadamente 80%, enquanto o CCR6 e o CCR10 apresentaram, aproximadamente, 40 e 70%, respectivamente. Já nos linfócitos B de memória ou nos plasmócitos as frequências entre os três receptores são muito semelhantes, entre 80 e 100%, portanto revelando que essas células normalmente co-expressam os três receptores.

4.4 Monócitos e macrófagos

A **Tabela 10** mostra frequências equivalentes, entre os grupos, de monócitos totais e de monócitos CD16⁺ e CD16⁻ nas amostras de sangue. Em relação aos leites, mães de lactentes com infecção apresentaram maiores

frequências de macrófagos totais e CD16⁺/anti-inflamatório que mães de lactentes saudáveis, e menores frequências de macrófagos CD16⁻/inflamatório. Tal como esperado, em ambos os grupos, todas as amostras de leite apresentaram maiores frequências de macrófagos totais e CD16⁺ quando comparadas ao sangue, enquanto a frequência de CD16⁻ é menor no leite em relação ao sangue, em ambos os grupos ($p < 0,0001$).

Tabela 10. Frequências de monócitos (sangue) e macrófagos (leite) CD14⁺HLA-DR⁺, e suas subpopulações de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S).

	Sangue [#]			Leite ^{##}			Grupo I	Grupo S
	I	S	p	I	S	p	Sg X LM (p)	Sg X LM (p)
Total	2,0 (1,2-2,6)	2,0 (1,3-2,6)	-	51,7 (±2,9)	35,8 (±2,5)	0,001	<0,0001	<0,0001
CD16 ⁺	28,1 (±2,8)	26,3 (±2,8)	-	64,5 (±2,8)	55,5 (±2,9)	0,031	<0,0001	<0,0001
CD16 ⁻	71,6 (±2,8)	73,7 (±2,8)	-	35,2 (±2,8)	44,5 (±2,9)	0,026	<0,0001	<0,0001

I: mães de lactentes com infecção; S: mães de lactentes saudáveis; Sg: sangue; LM: Leite materno; Resultados expressos em médias ($\pm$ desvio padrão) e submetidos ao teste *t de Student*; Resultados expressos em medianas (intervalo de confiança entre 25% e 75%) e submetidos ao teste de *Mann-Whitney*; [#] % referente aos leucócitos totais do sangue; ^{##} % referente aos leucócitos CD45⁺ do leite; - não significativa.

Na **Figura 11**, a análise das células CD14⁺HLA-DR⁺CD16⁺ revelou que tanto nos macrófagos do leite, como nos monócitos do sangue, existe uma alta frequência de células CD16⁺CX3CR1⁺ e baixa frequência de CD16⁺CCR2⁺ em ambos os grupos. Nenhuma diferença foi observada nas frequências de monócitos/macrófagos CD16⁺CCR2⁺ entre o leite e o sangue ou entre os grupos. Também não foram observadas diferenças nas frequências de monócitos/macrófagos CD16⁺CX3CR1⁺ entre o leite e o sangue no grupo S,

porém, devido um aumento significativo dessas células no sangue materno no grupo I, nós podemos observar diferenças significativas entre o leite e o sangue no grupo I. A porcentagem de dupla marcação $CCR2^+CX3CR1^+$ na população de $CD16^+$ foi equivalente entre os grupos, mas é maior nos macrófagos do leite em comparação aos monócitos do sangue (**Figura 12**).

Figura 11. Frequências de monócitos/macrófagos $CD16^+$ (A) e $CD16^-$ (B) expressando os receptores CCR2 e CX3CR1 em amostras de sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Em relação à análise de população de $CD16^-$, a **Figura 11** também mostra frequências muito mais altas de monócitos sanguíneos $CD16^-CCR2^+$ quando comparados aos macrófagos do leite. Por outro lado, enquanto a frequência de $CD16^-CX3CR1^+$ no sangue fica em torno de 1%, no leite é 10 vezes maior, por volta de 10%, apesar de não ter sido encontrada nenhuma diferença nas frequências dessa subpopulação entre os grupos.

Além disso, foi observado um aumento da dupla marcação $CCR2^+CX3CR1^+$ nos macrófagos $CD16^-$ do leite no grupo I em comparação ao grupo S, mas não nos monócitos sanguíneos, resultando numa frequência semelhante da dupla marcação entre o leite e o sangue durante o período de infecção nos lactentes, o que não ocorreu no grupo de lactentes saudáveis, que manteve a frequência dessa dupla marcação menor no leite quando comparado ao respectivo sangue. Além disso, pudemos observar que a frequência da dupla marcação $CCR2^+CX3CR1^+$, tanto no leite quanto no sangue, é sempre maior na população de $CD16^+$ que na $CD16^-$ ($p < 0,0001$).

Figura 12. Frequências de dupla marcação dos receptores CCR2 e CX3CR1 em monócitos/macrófagos $CD16^+$ e $CD16^-$ do sangue e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.5 Concentrações das quimiocinas e citocinas no sangue e no leite materno

A dosagem dos níveis de quimiocinas no soro e no leite revelou que, com exceção de CCL5, todas as outras quimiocinas: CCL20, CCL28, CXCL10, CCL2 e CX3CL1 apresentaram concentrações mais altas no leite em relação ao soro, em ambos os grupos. Entre os grupos, no soro, somente a CXCL10 revelou diferenças, sendo o grupo I que apresentou maiores níveis. Já no leite, a infecção no lactente promoveu aumento nos níveis de CCL20, CXCL10, CCL2 e CX3CL1, enquanto os níveis de CCL28 estavam diminuídos. Já as concentrações de CCL5 não apresentaram alterações no soro ou no leite entre os grupos (**Figura 13**).

Figura 13. Concentrações de CCL20 (A), CCL28 (B), CXCL10 (C), CCL5 (D), CCL2 (E) e CX3CL1 (F) no soro e leite materno de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Dada a importância das citocinas na produção de quimiocinas na resposta imune, foi realizada a quantificação de citocinas anti e pró-inflamatórias. Os resultados mostraram que, em ambos os grupos, o leite

apresentou níveis de IL-8 maiores que o soro, e durante a infecção no lactente, os níveis de IL-8 são aumentados em relação ao leite do grupo de lactentes saudáveis. Já os níveis de IL-6 são aumentados no leite do grupo I em comparação ao grupo S e ao próprio sangue. Com relação ao IL-1 β , nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos ou entre o leite e o soro quando os lactentes estão saudáveis, porém, durante a infecção, os níveis foram maiores no leite em relação ao sangue. Já as concentrações de IL-10 foram equivalentes entre o leite e o soro e entre os grupos (**Figura 14**). Não foram encontradas diferenças nos níveis de TNF- α e IL-12 em todas as análises (dados não mostrados).

Figura 14. Concentrações de IL-8 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e IL-10 (D) no soro e leite de mães de lactentes infectados (I) e saudáveis (S). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

4.6 Correlações entre as quimiocinas e citocinas no leite e no sangue

As análises de correlações foram realizadas entre as concentrações de quimiocinas e citocinas nas amostras de soro e leite de ambos os grupos, I e S. As **Tabelas 11 e 12** ilustram as correlações positivas e negativas das quimiocinas estudadas com as citocinas IL-8, IL-6, IL-10 e IL-1 β , no soro e no leite, respectivamente.

Tabela 11. Índices de correlação entre quimiocinas e citocinas nos soros de mães de lactentes com infecção respiratória (I) e nos soros de mães de lactentes saudáveis (S).

	Grupo	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β
CCL5	I	-	-	-	-
	S	0,46*	-	-	-
CCL20	I	-	0,39*	-	-
	S	-	-	-	-
CCL28	I	-	-	-	-
	S	-	- 0,50*	-	-
CXCL10	I	-	-	-	-
	S	-	- 0,56*	-	-
CCL2	I	-	-	-	-
	S	-	-	-	-
CX3CL1	I	-	-	0,74****	0,57**
	S	-	-	0,63***	0,55**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; - não há correlação.

Podemos observar que nos soros, o CCL5 apresentou correlação positiva somente com a IL-6 e somente em mães de lactentes saudáveis. Já o IL-8, apresenta correlação positiva com CCL20 no grupo I e inversa com CCL28 e o CXCL10 no grupo S. O CX3CL1 apresentou correlações positivas com IL-10 e IL-1 β em ambos os grupos.

Tabela 12. Índices de correlação entre quimiocinas e citocinas nos leites de mães de lactentes com infecção respiratória (I) e nos leites de mães de lactentes saudáveis (S).

	Grupo	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β
CCL5	I	0,46*	0,52**		
	S	0,41*	-	-	-
CCL20	I	0,61***	0,49**	-	-
	S	-	-	-	-
CCL28	I		- 0,41*	-	-
	S	-	-	-	
CXCL10	I	0,73****	0,65***	-	-
	S	-	-	-	-
CCL2	I	0,43*	-	-	-
	S	0,62***	-	-	-
CX3CL1	I	0,40*	0,52**	0,48**	-
	S	0,69****	-	-	-

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; - não há correlação.

De um modo geral, nos leites, foram observadas muito mais correlações positivas significantes entre as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 e as quimiocinas no grupo I, quando comparado ao grupo S. Foi observada ainda, correlação inversa entre IL-8 e CCL28, porém só no grupo I.

5. DISCUSSÃO

As infecções respiratórias constituem uma das principais causas de morbimortalidade na infância e diversos estudos relatam o efeito protetor do leite materno para otite media aguda e prolongada (Beaudry et al., 1995; Cushing et al., 1998) e pneumonia (Victora et al., 1987; Cesar et al., 1999). Foi demonstrado que a taxa de doenças respiratórias graves que resultam em hospitalização em lactentes alimentados por fórmula foi três vezes maior do que nos que recebem leite materno (Bachrach et al., 2003).

Ao infectar o trato respiratório, os vírus colonizam o tecido mucoso presente neste local, penetrando nas células epiteliais e entrando em contato com o sistema imune altamente organizado presente neste local. Partículas virais são, então, identificadas por receptores de reconhecimento de padrões de patógenos (PRRs) presentes nas células, resultando na ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B, c-Jun e diferentes fatores de regulação de IFN (IRF). A ativação desses fatores de transcrição induz a produção de altas concentrações de citocinas inflamatórias como IFN do tipo I, IL-6, TNF- α , linfopoietina estromal tímica (TSLP) e quimiocinas, como CCL5, CCL2, CXCL8 e CXCL10 (Bueno et al., 2008). Tais fatores são produzidos não somente por DC, mas também por macrófagos alveolares residentes do trato respiratório (Goritzka et al., 2015). Todos estes fatores apresentam propriedades quimiotáticas e estão envolvidos no recrutamento de vários tipos de leucócitos como monócitos, neutrófilos, DC, células Th1, eosinófilos, e células NK para o sítio inflamatório (Carvajal et al., 2019).

Neste trabalho, analisamos a influência das infecções respiratórias no lactente sobre o perfil de leucócitos, especificamente dos linfócitos T e B e de macrófagos, das quimiocinas e de seus receptores no leite e no sangue de suas mães.

Em relação à nossa casuística, as diferenças observadas entre o grupo I e S, quanto à idade materna e número de gestações, é justificada pelos locais de coleta, pois grande parte das mães de lactentes saudáveis foi selecionada em uma clínica particular, enquanto a maioria das mães dos lactentes infectados era paciente do Hospital Universitário da USP, portanto com características sociodemográficas distintas.

Em relação ao maior número de meninos no grupo I em relação ao grupo S, embora não significativa, está bem descrita a diferença sexual na suscetibilidade a doenças infecciosas (Guerra-Silveira e Abad-Franch, 2013; Muenchhof e Goulder, 2014), na resposta vacinal em lactentes (abaixo de um ano de idade) e na primeira infância (1-4 anos de idade) (Klein e Flanagan, 2016), ou seja, bem antes da influência dos hormônios sexuais da puberdade, evidenciando que fatores genéticos e epigenéticos podem atuar na formação do dimorfismo sexual do sistema imunológico (Moreira-Filho et al., 2018).

Um estudo com 12.474 lactentes com bronquiolite viral aguda, dos quais 1.588 foram hospitalizados, demonstrou que o risco de hospitalização era maior nos pacientes do sexo masculino (Koeboorn et al., 2008) e esses ainda, apresentam maior risco de necessidade de oxigênio suplementar e ventilação mecânica quando comparados aos pacientes do sexo feminino (Semple et al., 2011).

Nossos resultados demonstraram aumento de linfócitos T e B totais e de macrófagos no leite das mães de lactentes com infecção. No sangue materno, apesar de não terem sido detectadas diferenças nas frequências de linfócitos T e B totais, ou monócitos, houve uma diminuição nas frequências de linfócitos T CD4 *naive* e aumento dos linfócitos T ativados e de memória durante a infecção no lactente. Em relação aos linfócitos B no sangue, foi visto o oposto, as frequências de B *naive* estavam aumentadas, enquanto as de memória estavam diminuídas no grupo I, comparado ao grupo S. Esses achados indicam que a infecção no lactente altera não somente a composição imunológica do leite materno, mas também da circulação sanguínea materna.

Além das análises das subpopulações de leucócitos, o presente trabalho, até onde sabemos, apresenta pela primeira vez as frequências dos receptores de quimiocinas nas subpopulações de células mononucleares do leite.

Nos linfócitos T CD4, a menor frequência das células *naive* CCR6⁺ no leite das mães do grupo I sugere que essas células tenham sido ativadas durante a infecção. Observamos que durante o estado de homeostase (grupo S), a frequência de linfócitos T CD4⁺CCR6⁺ de memória no sangue é mais alta que no leite e esse perfil se perde durante o período de infecção dos lactentes, sugerindo um maior influxo dessas células para o leite do grupo I, mesmo que os grupos não tenham apresentado diferenças significantes nos leites.

O mesmo acontece com os linfócitos T CD4⁺CCR6⁺ ativados, pois durante a homeostase, as frequências dessas células entre leite e sangue são equivalentes, porém durante a infecção, o leite apresenta maior frequência que

o sangue, mostrando maior influxo de linfócitos T CD4⁺CCR6⁺ ativados para o leite.

Em concordância, nossos resultados revelaram concentrações mais altas de CCL20, único ligante para o CCR6, no leite das mães do grupo I, o que pode ter contribuído para o maior influxo dessas células para o leite. O CCL20 é tipicamente expresso em baixo nível basal, como foi demonstrado nas amostras de soro das mães de ambos os grupos, mas pode ser fortemente induzido por citocinas pró-inflamatórias e agonistas de TLR e é notavelmente aumentado em doenças inflamatórias da pele e intestino, juntamente com a expressão de CCR6 em subpopulações específicas de T *helper*, como as Th17 (Schutyser et al., 2003; Sallusto, 2016). Camundongos CCR6 *knockout* não apresentam anormalidades em nenhum órgão (apenas Placas de Peyer subdesenvolvidas) ou população de leucócito. No entanto, o número das células T CD4 e CD8 encontra-se de 2 a 15 vezes aumentado na mucosa intestinal e a resposta imune humoral na mucosa em resposta a antígenos administrados por via oral é prejudicada, enquanto a resposta imune sistêmica a antígenos orais permanece inalterada (Cook et al., 2000).

As mesmas considerações são válidas para os linfócitos TCD4⁺CXCR3⁺, onde também observamos um aumento de CXCL10 no leite e no soro das mães de lactentes infectados. O eixo CXCR3/CXCL9, CXCL10 e CXCL11 tem sido extensivamente estudado na inflamação, doenças autoimunes e no câncer, por ser uma quimiocina altamente inflamatória (Groom e Luster, 2011). Embora o CXCR3 não seja detectado em tecidos linfoides em uma situação de homeostase, ele é altamente induzido por IFN- γ e IFN do tipo 1 durante a infecção, injúria ou respostas inflamatórias, como já foi relatado na esclerose

múltipla, inflamação da pele e mucosas e na bronquiolite (Belperio et al., 2002; Abron et al., 2018). No presente trabalho, os lactentes do grupo I manifestaram predominantemente infecções respiratórias e pneumonias e, uma vez que o CXCL10, também chamado de IP-10, assim como o receptor CXCR3 mencionado acima, são induzidos por IFN- γ e IFN do tipo 1 e também por lipopolissacarídeos e adenovírus via ativação do NF- κ B, é de se esperar que houvesse mais influxo de células com CXCR3 no leite (Luster et al., 1985; Farbe, 1990; Amichay et al., 1996; Borgland et al., 2000; Innocent et al., 2001). Vale ressaltar que, ao que parece, o CXCL10 se liga somente com o receptor CXCR3, que por sua vez, é expresso preferencialmente por células T efectoras do tipo Th1 (Kim et al., 2011).

Surpreendentemente, entre as quimiocinas analisadas neste estudo, a CCL5 foi a única que apresentou concentrações muito reduzidas nos leites de ambos os grupos, porém o seu receptor CCR5 foi o receptor mais frequente no leite, tanto no grupo I, quanto no grupo S, em torno de 90%, entre os três receptores analisados (CCR5, CCR6 e CXCR3) em todas as subpopulações de linfócitos T CD4⁺, o que indica uma co-expressão desses receptores nas células no leite. Isso significa que, provavelmente, essas células estavam sendo recrutadas para o leite por meio de CCL20 ou CXCL10 que estão em maiores concentrações no leite materno durante a infecção dos lactentes. Kourtis et al. (2007) fizeram uma caracterização ampla das células T CD4 do leite de mães com e sem HIV e mostraram que a maioria das células T CD4⁺ no leite materno expressa altos níveis de CCR5 e CXCR4. Além disso, mostraram que a maioria dessas células T CD4⁺CCR5⁺ têm um fenótipo

ativado, sem expressão de CD45RA, semelhante ao encontrado em outros locais da mucosa, como o trato gastrointestinal (Poles et al., 2001).

Já nos linfócitos TCD8⁺ de memória, a frequência de CCR5 também prevalece sobre os outros receptores, porém foi observada uma redução dessas células no leite de mães do grupo I em relação ao respectivo sangue, e uma tendência a menor frequência quando comparadas ao grupo S, o que pode indicar que essas células não estejam se direcionando para a mucosa da mama durante a inflamação local.

Um estudo mostrou que na infecção primária pelo vírus influenza, a análise da expressão do mRNA de quimiocinas revelou aumento na expressão de CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10, mas na análise de expressão dos receptores indicou que apenas o CXCR3 (o receptor do CXCL10) estava elevado nos pulmões no pico da resposta imune primária (Wareing et al., 2004). No entanto, neste estudo, as respostas imunes primárias à infecção pelo vírus influenza não foram afetadas em camundongos com deficiência de CXCR3, enquanto outro estudo identificou um papel importante para o CCR5 no resultado clínico da infecção por influenza (Dawson et al., 2000). No presente trabalho, os linfócitos T CD8 de memória do leite não apresentaram diferenças na expressão de CXCR3 entre os grupos, mas essas mesmas células no sangue revelaram frequências reduzidas no grupo I.

Os dados de Kohlmeier e colaboradores (2008) mostram que, embora a produção dos ligantes de CXCR3 e CCR5 seja rapidamente induzida após desafio secundário com vírus respiratório e, o CXCR3 seja altamente expresso em células específicas para o vírus, o pronto recrutamento de células T CD8⁺

de memória para as vias aéreas pulmonares foi inteiramente dependente da rápida expressão de CCR5 por essas células.

Uma limitação é que neste trabalho não foi possível analisar as frequências dos receptores em células T CD8⁺ ativadas, logo os resultados encontrados neste trabalho à respeito dos linfócitos T CD8⁺ não refletem totalmente a influência da infecção nos lactentes sobre essa população de células no leite e no sangue. Devemos levar em consideração também que, apesar das nossas mães do grupo I não apresentarem nenhum sintoma de infecção, elas viviam no mesmo ambiente e estavam em contato constante e direto com os lactentes. A falta de sintomas de infecção respiratória não implica que não exista um estímulo antigênico, especialmente nas mucosas das vias aéreas, no entanto essas mães possuem o sistema imune mais maduro que os lactentes, podendo assim combater os microrganismos antes do aparecimento dos sintomas. Dessa maneira, as maiores frequências de CCR5 e de CXCR3, no sangue em comparação ao leite, nos linfócitos T CD8⁺ de memória, podem estar refletindo um direcionamento para outros locais, como as vias aéreas, ou mesmo, para a glândula mamária, onde essas células podem estar retidas.

Está descrito que o leite contém menor frequência de linfócitos em relação aos fagócitos, sendo que dos linfócitos, 80% são células T e 4% a 6% são células B (Wirt et al., 1992). Esse pequeno número de células B reflete a natureza efêmera dessas células, que entram na lâmina própria da glândula mamária para se transformar em plasmócitos (Wilson e Ogra, 2011). Foi o que observamos em nossas análises, pois observamos 70 a 80% de plasmócitos no leite.

Quanto aos receptores de quimiocinas, em relação aos linfócitos B, embora as frequências, tanto de CCR6, quanto de CXCR3 tenham sido menores no leite em relação ao sangue nas células de memória no grupo I, os três receptores analisados (CCR6, CXCR3 e CCR10) apresentaram frequências bastante elevadas nessas células e nos plasmócitos, o que sugere que esses receptores são co-expressos nessas células, fazendo com que essas células sejam recrutadas para a mucosa mamária por qualquer um dos ligantes desses receptores.

Está descrito que a maioria das células B expressa CCR6 e sua ligação com CCL20 tem papel importante na homeostase de mucosas, atraindo não somente células B, mas também populações de DC imaturas e células T de memória sob condições normais, já que essas populações se direcionam preferencialmente para esses sítios de desafio antigênico contínuo (Schutyster et al., 2003).

Por sua vez, o CCR10 é altamente expresso em plasmablastos e plasmócitos produtores de IgA (Macpherson et al., 2008) e nossos resultados estão de acordo, tanto nas células B de memória, como nos plasmócitos do leite. Seu ligante, o CCL28 é altamente produzido pelas glândulas exócrinas, inclusive as glândulas mamárias (Pan et al., 2000). Esse fato justifica o motivo pelo qual, no presente projeto, o CCL28 foi a quimiocina com maiores concentrações no leite materno e seu nível é ainda mais elevado durante a infecção dos lactentes.

Foi demonstrado que a maioria das células B do leite materno exibe um fenótipo de células B de memória IgD⁻. Elas apresentam um perfil particular de moléculas de adesão (CD44⁺, CD62L⁻, $\alpha 4\beta 7^{+/-}$, $\alpha 4\beta 1^{+}$) sugerindo que estas

células podem ser provenientes do GALT (tecido linfóide associado ao intestino). A maior parte destas células está ativada e um trabalho mostrou que os plasmócitos presentes no leite materno produzem principalmente anticorpos IgG (Tuailon et al., 2009). Esses autores sugerem que o extravasamento de células B do epitélio mamário para o leite pode implicar um processo de seleção negativa operando no epitélio alveolar ou no ducto mamário. Pode-se supor que as células B de memória IgA⁺ são ancoradas mais fortemente no tecido da glândula mamária do que as células correspondentes IgG⁺, porque essas últimas apresentam uma atração mais fraca em resposta à quimiocina CCL28, permitindo o tráfego do tecido mamário para o leite materno (Macpherson et al., 2008). De fato, a alta frequência de células B de memória CXCR3⁺ no sangue e, até mesmo no leite das mães de ambos os grupos, sugere o direcionamento dessas células de memória, possivelmente plasmócitos IgG⁺, para a mucosa da mama e extravasamento para o leite. As dosagens de CXCL10 nas amostras de sangue e leite corroboram com esses resultados.

Em relação aos monócitos e macrófagos, está bem estabelecido que a maioria dos monócitos do sangue pertence a subpopulação de monócitos clássicos/inflamatórios (CD16⁻CD14⁺⁺) e o restante está descrito como intermediário (CD16⁺CD14⁺⁺) e não-clássico/anti-inflamatório (CD16⁺CD14^{lo}) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Enquanto os monócitos CD16⁻ são caracterizados pela expressão de CCR2^{high}CX3CR1^{low}, os CD16⁺ expressam o contrário, CCR2^{low}CX3CR1^{high} (Auffray et al., 2007). De acordo com a afirmação acima, nossos dados mostraram as mesmas frequências no sangue

e a presença de infecção no lactente não modificou as porcentagens dos monócitos.

No presente estudo a infecção induziu um aumento nas frequências totais de macrófagos no leite, conforme observado por Riskin et al. (2012) e esse aumento é provavelmente devido à maior frequência de macrófagos CD16⁺, portanto o não-clássico/anti-inflamatório. Ao analisar as frequências dos receptores de quimiocinas nos macrófagos de leite, observamos que a polarização clara de CCR2^{high}CX3CR1^{lo} no CD16⁻ e CCR2^{lo}CX3CR1^{high} no CD16⁺ observada no sangue, é perdida no leite, e a expressão do CCR2 não é prevalente, não apenas no CD16⁺, mas também no CD16⁻, enfatizando o papel não inflamatório dos macrófagos no leite.

A análise do perfil basal dos macrófagos do leite (visto no grupo S) mostrou que eles apresentam perfil predominantemente não inflamatório e a infecção no lactente acentuou ainda mais esse perfil, demonstrado pelas maiores frequências de CD16⁺CX3CR1⁺ e de dupla marcação CD16⁺CCR2⁺CX3CR1⁺ no leite do grupo I. O aumento da frequência de macrófagos anti-inflamatórios durante a infecção pode estar relacionado à capacidade diferencial de tolerar patógenos e a tolerância à infecção tem sido compreendida, nos últimos anos, como uma estratégia distinta de defesa do hospedeiro para evitar a imunopatologia (Medzhitov et al., 2012). Essa descoberta está de acordo com o conceito amplamente conhecido de que o leite materno, com seus fatores bioativos, protege sem causar reações inflamatórias desnecessárias (Palmeira e Carneiro-Sampaio, 2016).

Em relação à dupla marcação nos macrófagos, devemos levar em consideração a plasticidade do sistema de fagócitos mononucleares. As células

totalmente polarizadas, pró- versus anti-inflamatórias, são apenas extremos de várias populações intermediárias que mudam constantemente de perfil em resposta a diferentes estímulos e microambientes (Mantovani et al., 2004). O limite entre essas subpopulações pode ser difícil de determinar e, possivelmente, a dupla marcação pode refletir esse desafio; portanto, no leite, os macrófagos podem estar perdendo o CCR2 e aumentando a expressão do CX3CR1.

Foi descrito que os leucócitos do leite materno fazem parte da mucosa intestinal e a maioria dos macrófagos intestinais expressa altos níveis de CX3CR1 (Brandtzaeg, 2010). O CX3CR1 é o receptor da quimiocina CX3CL1, que é expressa pelas células epiteliais intestinais (Wang et al., 2019). No leite, observou-se que as concentrações de CX3CL1 são proporcionalmente muito maiores que os níveis de CCL2, independente do grupo. Este resultado pode justificar a maior presença de células CX3CR1⁺ no leite materno em comparação ao sangue. Além disso, a maior concentração de CX3CL1 e CCL2 no leite das mães do grupo I pode ter contribuído para a maior frequência de macrófagos CD16⁺ no leite, que poderiam ser recrutados não apenas pelo receptor CX3CR1, mas também via CCR2 na população de CD16⁺CCR2⁺CX3CR1⁺. O maior número de correlações positivas entre IL-6, IL-8 e IL-10 e a quimiocina CX3CL1 no grupo I, ao invés de CCL2, que apenas mostrou correlação com IL-6 nos leites de ambos os grupos, também poderia justificar a maior presença de macrófagos anti-inflamatórios no leite.

No presente estudo, a avaliação das citocinas foi realizada para investigar a associação entre a presença desses fatores inflamatórios e das quimiocinas no leite. Além disso, consideramos importante demonstrar que as

amostras de sangue materno, de ambos os grupos, não diferiram em termos de fatores inflamatórios que poderiam indicar a presença de uma infecção sistêmica materna.

Foi descrito na literatura que a maioria das quimiocinas, como IL-8 (CXCL8), CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL11 e CX3CL1 têm um padrão de expressão que aponta para um papel importante na inflamação e sua produção é induzida por citocinas pró-inflamatórias, particularmente TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IFN- γ ou por LPS bacteriano (Nishimura et al., 2009; Garofalo, 2010; Guerreiro et al., 2011). Além disso, a prolactina, o hormônio responsável pela indução da lactação, estimula a produção de CXCL8 (IL-8) pelas células epiteliais mamárias humanas em cultura e pode justificar os altos níveis de IL-8 observados em nossas amostras de leite, em comparação com o sangue de ambos os grupos. De fato, a IL-8 foi observada no leite humano por nós e por outros estudos, em concentrações suficientemente altas para explicar o recrutamento de leucócitos (Maheshwari et al., 2002), uma vez que foi descrito que altas concentrações de IL-8 e CCL5 no leite materno poderiam se ligar a proteoglicanos dos enterócitos (Webb et al., 1993), induzindo aderência e diapedese de leucócitos maternos no tecido intestinal (Michie e Harvey, 1995).

Nossos resultados mostram que no leite e, provavelmente, na mama, a produção das quimiocinas, CCL5, CXCL10, CCL20, CX3CL1 e CCL2 está fortemente correlacionada com IL-6 e, em menor grau, com IL-8, esse último somente no grupo I, mas não com IL-1 β ou TNF- α , como descrito na literatura.

Muitos estudos na literatura têm mostrado evidências convincentes que sugerem o tráfego de leucócitos da glândula mamária para as superfícies mucosas do lactente em camundongos e em outros modelos animais (Jain et

al., 1989; Arvola et al., 2000; Tuboly e Bernáth, 2002; Ma et al., 2008; Cabinian et al., 2016). Assim, uma questão que deve ser mencionada em relação aos leucócitos do leite humano é se eles teriam alguma função na mucosa gastrointestinal ou mesmo na maturação do sistema imunológico do lactente.

Células viáveis do leite materno já foram identificadas nas fezes dos bebês amamentados, sugerindo que elas permanecem funcionais na mucosa intestinal do lactente (Michie et al., 1998). Comparações entre crianças amamentadas e crianças alimentadas com fórmulas demonstram consistentemente uma proteção vacinal mais longa e com níveis de anticorpos mais altos em bebês amamentados (Hahn-Zoric et al., 1990; Hanson et al., 2003). Esses resultados são ainda mais sugestivos quando a resposta da vacina depende estritamente da função de células T, como a resposta à BCG (Pabst et al., 1989). Não obstante, o fato de a permeabilidade intestinal às macromoléculas e imunoglobulinas ocorrer apenas por um curto período após o nascimento em seres humanos em comparação com outras espécies de mamíferos, o processo de “fechamento” do intestino é bastante gradual nos primeiros anos de vida (Noone et al., 1986; Kalach et al., 2001). Recentemente, Molés e colaboradores (2018) apresentaram uma ampla discussão sobre como a amamentação pode induzir a maturação imune mediada por microquimerismo em lactentes. O implante dessas células maternas vivas nos tecidos do lactente pode estar envolvido na resposta imune efetiva, no reparo tecidual e na regulação da resposta imune neonatal e da tolerância imunológica.

6. CONCLUSÕES

Podemos concluir no presente trabalho que:

- O processo infeccioso respiratório no lactente promoveu aumento de linfócitos T, linfócitos B e de macrófagos com perfil anti-inflamatório e redução dos macrófagos com perfil inflamatório no leite materno;

- Nas amostras de leite materno de ambos os grupos, houve prevalência de expressão do receptor CCR5 em linfócitos T e de CX3CR1 nos macrófagos, enquanto nos linfócitos B observou-se co-expressão dos receptores CCR6, CCR10 e CXCR3;

- A infecção do lactente provocou aumento nos níveis de CCL20, CXCL10, CCL2 e CX3CL1 e redução dos níveis de CCL28, enquanto CCL5 foi praticamente indetectável no leite materno.

O presente estudo revelou que há mudanças dinâmicas no perfil imunológico do leite materno em relação ao sangue, o que pode nos indicar algum tipo de adaptação deste excepcional compartimento imunológico de forma a prover ao lactente enfermo componentes bioativos específicos de proteção frente à infecção.

7. Referências Bibliográficas

Abron JD, Singh NP, Murphy AE, Mishra MK, Price RL, Nagarkatti M, et al. Differential role of CXCR3 in inflammation and colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018;9(25):17928-36.

Alam R. Chemokines in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99(3):273-7.

Amichay D, Gazzinelli RT, Karupiah G, Moench TR, Sher A, Farber JM. Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo. *J Immunol*. 1996;157(10):4511-20.

Arvola M, Gustafsson E, Svensson L, Jansson L, Holmdahl R, Heyman B, et al. Immunoglobulin-secreting cells of maternal origin can be detected in B cell-deficient mice. *Biol Reprod*. 2000;63(6):1817-24.

Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elaine G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317(5838):666-70.

Bachrach VR, Schwarz E, Bachrach LR. Breastfeeding and the risk of hospitalization for respiratory disease in infancy: a meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003;157(3):237-43.

Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(1):49-74.

Barbarroja-Escudero J, Prieto-Martin A, Monserrat-Sanz J, Reyes-Martin E, Diaz-Martin D, Antolin-Amerigo D, et al. Abnormal chemokine receptor profile on circulating T lymphocytes from nonallergic asthma patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;164(3):228-36.

Barros MD, Carneiro-Sompaio MM. Milk composition of low birth weight infants' mothers. *Acta Paediatr Scand*. 1984;73(5):693-4.

Beaudry M, Dufour R, Marcoux S. Relation between infant feeding and infections during the first six months of life. *J Pediatr*. 1995;126(2):191-7.

Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lynch JP, 3rd, Xue YY, Li K, et al. Critical role for CXCR3 chemokine biology in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Immunol*. 2002;169(2):1037-49.

Bhattacharya D, Cheah MT, Franco CB, Hosen N, Pin CL, Sha WC, et al. Transcriptional profiling of antigen-dependent murine B cell differentiation and memory formation. *J Immunol*. 2007;179(10):6808-19.

Borgland SL, Bowen GP, Wong NC, Libermann TA, Muruve DA. Adenovirus vector-induced expression of the C-X-C chemokine IP-10 is mediated through capsid-dependent activation of NF-kappaB. *J Virol.* 2000;74(9):3941-7.

Böttcher MF, Jenmalm MC, Björkstén B, Garofalo RP. Chemoattractant factors in breast milk from allergic and nonallergic mothers. *Pediatr Res.* 2000;47(5):592-7.

Bourges D, Meurens F, Berri M, Chevaleyre C, Zanello G, Levast B, et al. New insights into the dual recruitment of IgA+ B cells in the developing mammary gland. *Mol Immunol.* 2008;45(12):3354-62.

Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr.* 2010;156(2 Suppl):S8-15.

Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev.* 2005;206:32-63.

Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol.* 2004;25(11):570-7.

Bueno SM, González PA, Pacheco R, Leiva ED, Cautivo KM, Tobar HE, et al. Host immunity during RSV pathogenesis. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(10):1320-9.

Cabinian A, Sinsimer D, Tang M, Zumba O, Mehta H, Toma A, et al. Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156762.

Carr R. Neutrophil production and function in newborn infants. *Br J Haematol.* 2000;110(1):18-28.

Carvajal JJ, Avellaneda AM, Salazar-Ardiles C, Maya JE, Kalergis AM, Lay MK. Host Components Contributing to Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *Front Immunol.* 2019;10:2152.

Castellote C, Casillas R, Ramírez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Castell M, Moretones MG, et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr.* 2011;141(6):1181-7.

César JA, Victora CG, Barros FC, Santos IS, Flores JA. Impact of breast feeding on admission for pneumonia during postneonatal period in Brazil: nested case-control study. *BMJ.* 1999;318(7194):1316-20.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354(6):610-21.

Corrêa-Silva S. Imunologia das interações materno-fetais na asma: padrões de reatividade imunológica no colostro e no sangue de mães asmáticas e no sangue de cordão de seus respectivos recém-nascidos [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

Cook DN, Prosser DM, Forster R, et al. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity*. 2000;12:495–503.

Crago SS, Prince SJ, Pretlow TG, McGhee JR, Mestecky J. Human colostral cells. I. Separation and characterization. *Clin Exp Immunol*. 1979;38(3):585-97.

Cushing AH, Samet JM, Lambert WE, Skipper BJ, Hunt WC, Young SA, et al. Breastfeeding reduces risk of respiratory illness in infants. *Am J Epidemiol*. 1998;147(9):863-70.

Dawson TC, Beck MA, Kuziel WA, Henderson F, Maeda N. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am J Pathol*. 2000;156:1951–9.

Farber JM. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(14):5238-42.

Francis JN, Sabroe I, Lloyd CM, Durham SR, Till SJ. Elevated CCR6+ CD4+ T lymphocytes in tissue compared with blood and induction of CCL20 during the asthmatic late response. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(3):440-7.

Fraticelli P, Sironi M, Bianchi G, D'Ambrosio D, Albanesi C, Stoppacciaro A, et al. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest*. 2001;107(9):1173-81.

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

Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.

Goldman AS. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. *Pediatr Infect Dis J*. 1993;12(8):664-71.

Goritzka M, Makris S, Kausar F, Durant LR, Pereira C, Kumagai Y, et al. Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *J Exp Med*. 2015;212(5):699-714.

Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*. 2011;317(5):620-31.

Grumach AS, Carmona RC, Lazarotti D, Ribeiro MA, Rozentraub RB, Racz ML, et al. Immunological factors in milk from Brazilian mothers delivering small-for-date term neonates. *Acta Paediatr*. 1993;82(3):284-90.

Guerra-Silveira F, Abad-Franch F. Sex bias in infectious disease epidemiology: patterns and processes. *PLoS One*. 2013;8(4):e62390.

Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira JM. [The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions]. *Acta Med Port*. 2011;24 Suppl 4:967-76.

Hahn-Zoric M, Carlsson B, Björkander J, Mellander L, Friman V, Padyukov L, et al. Variable increases of IgG and IgM antibodies in milk of IgA deficient women. *Pediatr Allergy Immunol*. 1997;8(3):127-33.

Hahn-Zoric M, Fulconis F, Minoli I, Moro G, Carlsson B, Böttiger M, et al. Antibody responses to parenteral and oral vaccines are impaired by conventional and low protein formulas as compared to breast-feeding. *Acta Paediatr Scand*. 1990;79(12):1137-42.

Hanson LA, Korotkova M, Lundin S, Håversen L, Silfverdal SA, Mattsby-Baltzer I, et al. The transfer of immunity from mother to child. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;987:199-206.

Hassiotou F, Hepworth AR, Metzger P, Tat Lai C, Trengove N, Hartmann PE, et al. Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clin Transl Immunology*. 2013;2(4):e3.

Helwig U, Lammers KM, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Uguccioni M. MCP-3 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2000;47(1):155.

Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(1):49-53.

Innocenti M, Svennerholm AM, Quiding-Järbrink M. Helicobacter pylori lipopolysaccharides preferentially induce CXC chemokine production in human monocytes. *Infect Immun*. 2001;69(6):3800-8.

Jain L, Vidyasagar D, Xanthou M, Ghai V, Shimada S, Blend M. In vivo distribution of human milk leucocytes after ingestion by newborn baboons. *Arch Dis Child*. 1989;64(7 Spec No):930-3.

Jenness R. The composition of human milk. *Semin Perinatol*. 1979;3(3):225-39.

Kalach N, Rocchiccioli F, de Boissieu D, Benhamou PH, Dupont C. Intestinal permeability in children: variation with age and reliability in the diagnosis of cow's milk allergy. *Acta Paediatr*. 2001;90(5):499-504.

Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, Genovese MC, Andrew DP, Wu L, et al. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest.* 2001;108(9):1331-9.

Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):626-38.

Koehoorn M, Karr CJ, Demers PA, Lencar C, Tamburic L, Brauer M. Descriptive epidemiological features of bronchiolitis in a population-based cohort. *Pediatrics.* 2008;122(6):1196-203.

Kohlmeier JE, Miller SC, Smith J, Lu B, Gerard C, Cookenham T, et al. The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8+ T cell response to respiratory virus infections. *Immunity.* 2008;29(1):101-13.

Kourtis AP, Ibegbu CC, Theiler R, Xu YX, Bansil P, Jamieson DJ, et al. Breast milk CD4+ T cells express high levels of C chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 4 and are preserved in HIV-infected mothers receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2007;195(7):965-72.

Krzysiek R, Lefevre EA, Bernard J, Foussat A, Galanaud P, Louache F, et al. Regulation of CCR6 chemokine receptor expression and responsiveness to macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in human B cells. *Blood.* 2000;96(7):2338-45.

Kulski JK, Hartmann PE. Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1981;59(1):101-14.

Kverka M, Burianova J, Lodinova-Zadnikova R, Kocourkova I, Cinova J, Tuckova L, et al. Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. *Clin Chem.* 2007;53(5):955-62.

Lin Y, Xia L, Turner JD, Zhao X. Morphologic observation of neutrophil diapedesis across bovine mammary gland epithelium in vitro. *Am J Vet Res.* 1995;56(2):203-7.

Liu H, Rohowsky-Kochan C. Regulation of IL-17 in human CCR6+ effector memory T cells. *J Immunol.* 2008;180(12):7948-57.

Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(6):1537S-43S.

Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature.* 1985;315(6021):672-6.

Ma LJ, Walter B, Deguzman A, Muller HK, Walker AM. Trans-epithelial immune cell transfer during suckling modulates delayed-type hypersensitivity in recipients as a function of gender. *PLoS One.* 2008;3(10):e3562.

Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 2008;1(1):11-22.

Maheshwari A, Lu W, Lacson A, Barileycorn AA, Nolan S, Christensen RD, et al. Effects of interleukin-8 on the developing human intestine. *Cytokine.* 2002;20(6):256-67.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-86.

Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. Disease tolerance as a defense strategy. *Science.* 2012;335(6071):936-41.

Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Monocyte chemotactic protein-3. *Eur Cytokine Netw.* 2001;12(4):554-60.

Michie CA, Harvey D. Maternal milk lymphocytes engraft the fetal gut. *Ped Res.* 1995;37:129A.

Michie CA, Tantscher E, Schall T, Rot A. Physiological secretion of chemokines in human breast milk. *Eur Cytokine Netw.* 1998;9(2):123-9.

Mo H, Monard S, Pollack H, Ip J, Rochford G, Wu L, et al. Expression patterns of the HIV type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on CD4+ T cells and monocytes from cord and adult blood. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998;14(7):607-17.

Moles JP, Tuaillon E, Kankasa C, Bedin AS, Nagot N, Marchant A, et al. Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatr Allergy Immunol.* 2018;29(2):133-43.

Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, et al. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(25):14470-5.

Moreira-Filho CA, Bando SY, Bertonha FB, Ferreira LR, Vinhas CF, Oliveira LHB, et al. Minipuberty and Sexual Dimorphism in the Infant Human Thymus. *Sci Rep.* 2018;8(1):13169.

Mowat AM, Bain CC. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *J Innate Immun.* 2011;3(6):550-64.

Muenchhoff M, Goulder PJ. Sex differences in pediatric infectious diseases. *J Infect Dis.* 2014;209 Suppl 3:S120-6.

Murphy PM. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):227-9.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52(1):145-76.

Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007;204(12):3037-47.

Nishimura M, Kuboi Y, Muramoto K, Kawano T, Imai T. Chemokines as novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173:350-6.

Noone C, Menzies IS, Banatvala JE, Scopes JW. Intestinal permeability and lactose hydrolysis in human rotaviral gastroenteritis assessed simultaneously by non-invasive differential sugar permeation. *Eur J Clin Invest.* 1986;16(3):217-25.

Pabst HF, Godel J, Grace M, Cho H, Spady DW. Effect of breast-feeding on immune response to BCG vaccination. *Lancet.* 1989;1(8633):295-7.

Palmeira P, Carneiro-Sampaio M. Immunology of breast milk. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2016;62(6):584-93.

Palmeira P, Costa-Carvalho BT, Arslanian C, Pontes GN, Nagao AT, Carneiro-Sampaio MM. Transfer of antibodies across the placenta and in breast milk from mothers on intravenous immunoglobulin. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20(6):528-35.

Pan J, Kunkel EJ, Gosslar U, Lazarus N, Langdon P, Broadwell K, et al. A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J Immunol.* 2000;165(6):2943-9.

Poles MA, Elliott J, Taing P, Anton PA, Chen IS. A preponderance of CCR5(+) CXCR4(+) mononuclear cells enhances gastrointestinal mucosal susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2001;75(18):8390-9.

Quinello C, Quintilio W, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P. Passive acquisition of protective antibodies reactive with *Bordetella pertussis* in newborns via placental transfer and breast-feeding. *Scand J Immunol.* 2010;72(1):66-73.

Radillo O, Norcio A, Addobbati R, Zauli G. Presence of CTAK/CCL27, MCP-3/CCL7 and LIF in human colostrum and breast milk. *Cytokine.* 2013;61(1):26-8.

Rainard P, Cunha P, Bougarn S, Fromageau A, Rossignol C, Gilbert FB, et al. T helper 17-associated cytokines are produced during antigen-specific inflammation in the mammary gland. *PLoS One.* 2013;8(5):e63471.

Richie ER, Steinmetz KD, Meistrich ML, Ramirez I, Hilliard JK. T lymphocytes in colostrum and peripheral blood differ in their capacity to form thermostable E-rosettes. *J Immunol*. 1980;125(5):2344-6.

Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol*. 2005;6(5):507-14.

Riskin A, Almog M, Peri R, Halasz K, Srugo I, Kessel A. Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatr Res*. 2012;71(2):220-5.

Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997;90(3):909-28.

Saint L, Smith M, Hartmann PE. The yield and nutrient content of colostrum and milk of women from giving birth to 1 month post-partum. *Br J Nutr*. 52. England 1984. p. 87-95.

Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol*. 2016;34:317-34.

Schutysse E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14:409–26.

Seelig LL, Beer AE. Intraepithelial leukocytes in the human mammary gland. *Biol Reprod*. 1981;24(5):1157-63.

Semple MG, Taylor-Robinson DC, Lane S, Smyth RL. Household tobacco smoke and admission weight predict severe bronchiolitis in infants independent of deprivation: prospective cohort study. *PLoS One*. 2011;6(7):e22425.

Sim TC, Reece LM, Hilsmeier KA, Grant JA, Alam R. Secretion of chemokines and other cytokines in allergen-induced nasal responses: inhibition by topical steroid treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(3):927-33.

Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol*. 2006;533(1-3):277-88.

Soldevila G, García-Zepeda EA. The role of the Jak-Stat pathway in chemokine mediated signaling in T lymphocytes. *Signal Transduct*. 2007;7:427-38.

Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, Campbell JJ. CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood*. 2003;101(5):1677-82.

Sullivan SE, Staba SL, Gersting JA, Hutson AD, Theriaque D, Christensen RD, et al. Circulating concentrations of chemokines in cord blood, neonates, and adults. *Pediatr Res*. 2002;51(5):653-7.

Takahata Y, Takada H, Nomura A, Nakayama H, Ohshima K, Hara T. Detection of interferon-gamma-inducible chemokines in human milk. *Acta Paediatr.* 2003;92(6):659-65.

Trend S, de Jong E, Lloyd ML, Kok CH, Richmond P, Doherty DA, et al. Leukocyte Populations in Human Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135580.

Trend S, Strunk T, Lloyd ML, Kok CH, Metcalfe J, Geddes DT, et al. Levels of innate immune factors in preterm and term mothers' breast milk during the 1st month postpartum. *Br J Nutr.* 2016;115(7):1178-93.

Tuaillon E, Valea D, Becquart P, Al Tabaa Y, Meda N, Bollore K, et al. Human milk-derived B cells: a highly activated switched memory cell population primed to secrete antibodies. *J Immunol.* 2009;182(11):7155-62.

Tuboly S, Bernáth S. Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn animals. *Adv Exp Med Biol.* 2002;503:107-14.

Victora CG, Smith PG, Vaughan JP, Nobre LC, Lombardi C, Teixeira AM, et al. Evidence for protection by breast-feeding against infant deaths from infectious diseases in Brazil. *Lancet.* 1987;2(8554):319-22.

Vidal K, Labéta MO, Schiffrin EJ, Donnet-Hughes A. Soluble CD14 in human breast milk and its role in innate immune responses. *Acta Odontol Scand.* 2001;59(5):330-4.

Viola A, Molon B, Contento RL. Chemokines: coded messages for T-cell missions. *Front Biosci.* 2008;13:6341-53.

Wallquist C, Paulson JM, Hylander B, Lundahl J, Jacobson SH. Increased accumulation of CD16+ monocytes at local sites of inflammation in patients with chronic kidney disease. *Scand J Immunol.* 2013;78(6):538-44.

Wang S, Ye Q, Zeng X, Qiao S. Functions of Macrophages in the Maintenance of Intestinal Homeostasis. *J Immunol Res.* 2019;2019:1512969.

Ward SG, Bacon K, Westwick J. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity.* 1998;9(1):1-11.

Wareing MD, Lyon AB, Lu B, Gerard C, Sarawar SR. Chemokine expression during the development and resolution of a pulmonary leukocyte response to influenza A virus infection in mice. *J Leukoc Biol.* 2004;76:886-95.

Webb LM, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Rot A. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(15):7158-62.

Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol.* 2000;67(5):699-704.

Wedemeyer J, Lorentz A, Göke M, Meier PN, Flemming P, Dahinden CA, et al. Enhanced production of monocyte chemotactic protein 3 in inflammatory bowel disease mucosa. *Gut.* 1999;44(5):629-35.

Williams IR. CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1072:52-61.

Wilson E, Butcher EC. CCL28 controls immunoglobulin (Ig)A plasma cell accumulation in the lactating mammary gland and IgA antibody transfer to the neonate. *J Exp Med.* 2004;200(6):805-9.

Wilson CB, Ogra PL. Human milk. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2011.p.191-220.

Wirt DP, Adkins LT, Palkowetz KH, Schmalstieg FC, Goldman AS. Activated and memory T lymphocytes in human milk. *Cytometry.* 1992;13(3):282-90.

World Health Organization (WHO). *Guideline: Protecting, Promoting and Supporting Breastfeeding in Facilities Providing Maternity and Newborn Services*, Geneva, Switzerland, 2017.

Zhou L, Yoshimura Y, Huang Y, Suzuki R, Yokoyama M, Okabe M, et al. Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. *Immunology.* 2000;101(4):570-80.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74-80.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO NO LACTENTE NA EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS E DE SEUS RECEPTORES ENVOLVIDOS NO HOMING DE LEUCÓCITOS PARA O LEITE MATERNO**

2. PESQUISADOR: PATRICIA PALMEIRA

CARGO/FUNÇÃO: PESQUISADORA CIENTÍFICA INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 18195/01-D

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA – LIM-36

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS

Rubrica da Mãe/ Responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

- 1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:** Convidamos a senhora para participar desta pesquisa que vai ser realizada para avaliar se ocorre um aumento na expressão das moléculas envolvidas na migração de células imunológicas, as células que protegem o nosso organismo contra infecções, do seu corpo para o leite materno, durante o período de infecção de seu bebê. Nós sabemos que o leite materno apresenta uma grande quantidade dessas células até o primeiro mês após o parto, mas que vai diminuindo à medida que o bebê cresce. Mas estudos recentes mostraram que o número dessas células no leite materno pode voltar a crescer momentaneamente durante o período de infecção do bebê, o que sugere que o leite materno é capaz de alterar a sua composição para oferecer mais proteção ao seu bebê contra infecções. Entretanto, ainda não se sabe direito como isso ocorre. A sua participação neste estudo nos permitirá um maior entendimento de como o leite materno protege seu filho (a) contra infecções. Se concordar em participar desta pesquisa será coletado um pouco do seu sangue e do seu leite neste momento em que seu bebê encontra-se doente, e depois, quando seu bebê estiver curado.
- 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Será coletado cerca de 10 ml de sangue de uma veia do braço, e 30 ml de leite será manualmente coletado de suas mamas. Não será coletado nada de seu bebê. As amostras de sangue e leite serão levadas para o Laboratório de Investigação Médica do Instituto da Criança (LIM-36) para estudarmos as células que protegem seu filho durante uma infecção. As coletas serão feitas apenas para o presente estudo.
- 3. Desconfortos e riscos esperados:** A coleta de sangue pode causar um pouco de dor e o local pode ficar roxinho, porém logo estará normal novamente e a coleta de leite não causará desconforto nenhum.
- 4. Benefícios que poderão ser obtidos:** Não há benefício direto para a participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que existe um aumento na expressão das moléculas envolvidas na migração de células imunológicas do seu corpo para o leite, durante o período de infecção de seu bebê. O benefício indireto será o melhor conhecimento da proteção passada da mãe para o filho pelo leite materno contra infecções.
- 5. Garantia de acesso:** Em qualquer etapa do estudo, você pode ter acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, sendo eles: Dra. Patricia Palmeira (investigador principal), Profa. Dra. Simone Corrêa-Silva e Yingying Zheng, que podem ser encontradas no endereço: Avenida Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647, 5º andar, no LIM-36. Tel: (11) 26618782. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP - 21º andar – sala 36 - CEP: 01246-000 - Tel: (11) 3893-4401/4407 - E-mail: cep.fm@usp.br, e com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (CEP-HU/USP): Av. Prof. Lineu Pestes, 2565 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP - Telefone: (11) 3091-9457 - E-mail: cep@hu.usp.br.
- 6. É garantida a liberdade** da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 7. Direito de confidencialidade** – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

Rubrica da Mãe/ Responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da infecção no lactente na expressão de quimiocinas e de seus receptores envolvidos no homing de leucócitos para o leite materno

Pesquisador: Patricia Palmeira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59633116.1.3001.0076

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.786.170

Apresentação do Projeto:

Serão coletadas 32 amostras de sangue periférico e de leite maduro de mães saudáveis em dois momentos: no momento de infecção de seus respectivos lactentes e após a referida infecção. Os leucócitos do sangue e do leite, assim como a expressão dos receptores de quimiocinas nessas células serão analisados por citometria de fluxo. As quimiocinas serão quantificadas por ensaio imunoenzimático. Os dados obtidos serão analisados com os testes estatísticos adequados para cada caso de acordo com a normalidade dos resultados e um limite de significância de 0,05 será utilizado para todos os testes

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Nossa hipótese é que lactentes infectados são capazes de induzir uma resposta imune local nas mamas de suas mães, promovendo um aumento e possível modificação da expressão de quimiocinas produzidas localmente, o que pode acarretar no aumento do influxo de leucócitos e mudança do perfil dessas células nas glândulas mamárias durante o período da infecção aguda.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2565

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-9457

Fax: (11)3091-9452

E-mail: cep@hu.usp.br

Continuação do Parecer: 1.786.170

Objetivo Primário:

O objetivo deste estudo é investigar possíveis alterações no perfil de expressão das moléculas envolvidas no homing de leucócitos para o leite materno em resposta a infecções presentes nos lactentes.

Objetivo Secundário:

Avaliar no sangue e no leite maduro de mães saudáveis nos períodos durante e após a infecção de seus respectivos lactentes:

- a) As subpopulações de linfócitos, T e B, e macrófagos;
- b) Os níveis das quimiocinas envolvidas no homing das subpopulações de linfócitos T, B, e macrófagos para o leite;
- c) A expressão dos receptores envolvidos no homing nas subpopulações de T, B e macrófagos para o leite.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue pode causar um pouco de dor e o local pode ficar levemente roxo, porém logo voltará ao estado normal e a coleta de leite não causará desconforto nenhum.

Benefícios:

Não há benefício direto para os participantes. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que existe um aumento na expressão das moléculas envolvidas na migração de células imunológicas do corpo materno para o leite, durante o período de infecção do lactente. O benefício indireto será o melhor conhecimento da proteção passada da mãe para o filho pelo leite materno contra infecções.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há, mas tema de relevância

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Faltou identificação do CEP HU

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Única pendência é o endereço e telefone que deve constar no TCLE

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2565

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-9457

Fax: (11)3091-9452

E-mail: cep@hu.usp.br

Continuação do Parecer: 1.786.170

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto foi apresentado e aprovado na reunião de hoje. Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios parciais e final, de acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, inciso XI.2, letra "d".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_772715.pdf	01/09/2016 14:52:37		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Mestrado Ying_Final_ICR.pdf	01/09/2016 14:41:35	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Exequibilidade_final.pdf	01/09/2016 14:33:29	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Cadastro_online_HCassinado.pdf	01/09/2016 14:33:04	Patricia Palmeira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FM.pdf	01/09/2016 14:32:39	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Anuência CPesq_HU_Palmeira.pdf	01/09/2016 14:29:40	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Anuência Pediatria_HU_Palmeira.pdf	01/09/2016 14:28:36	Patricia Palmeira	Aceito
Folha de Rosto	Plataformabrasilassinada_Ying.pdf	01/09/2016 12:00:29	Patricia Palmeira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Decl_Infraestrutura_HU_Palmeira.pdf	01/09/2016 11:58:21	Patricia Palmeira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Outubro de 2016

Assinado por:
Mauricio Seckler
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2565

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-9457

Fax: (11)3091-9452

E-mail: cep@hu.usp.br

USP - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.786.170

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2565

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-9457

Fax: (11)3091-9452

E-mail: cep@hu.usp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da infecção no lactente na expressão de quimiocinas e de seus receptores envolvidos no homing de leucócitos para o leite materno

Pesquisador: Patricia Palmeira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59633116.1.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.754.872

Apresentação do Projeto:

O leite humano, além de seu valor nutricional, apresenta diversos fatores de proteção com ação anti-infecciosa que interagem entre si e com as mucosas dos tratos digestivo e respiratório superior do recém-nascido, conferindo, além da imunidade passiva, estímulo ao desenvolvimento e maturação do sistema imunológico. É conhecido que a concentração dos componentes imunológicos do leite humano diminui no decorrer do tempo após o parto, porém, alguns estudos têm mostrado que também pode sofrer alterações durante o período de infecção do lactente, o que sugere que sua composição imunológica pode estar vinculada às necessidades imunológicas do lactente. As quimiocinas possuem um papel fundamental no processo de migração das células para os tecidos e, seguramente, influenciam na presença dos leucócitos no leite materno. O objetivo deste estudo, então, é investigar possíveis alterações no perfil de expressão das moléculas envolvidas no homing de leucócitos para o leite materno em resposta a infecções presentes nos lactentes, especificamente: i. as subpopulações de linfócitos, T e B, e macrófagos; ii. os níveis das quimiocinas envolvidas no homing dessas subpopulações para o leite e; iii. a expressão dos receptores envolvidos no homing dessas subpopulações para o leite. Para isso serão coletadas 32 amostras de sangue periférico e de leite maduro de mães saudáveis em dois momentos: no momento de infecção de seus respectivos lactentes e após a referida infecção. Os

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.754.872

leucócitos do sangue e do leite, assim como a expressão dos receptores de quimiocinas nessas células serão analisados por citometria de fluxo. As quimiocinas serão quantificadas por ensaio imunoenzimático. Os dados obtidos serão analisados com os testes estatísticos adequados para cada caso de acordo com a normalidade dos resultados e um limite de significância de 0,05 será utilizado para todos os testes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo deste estudo é investigar possíveis alterações no perfil de expressão das moléculas envolvidas no homing de leucócitos para o leite materno em resposta a infecções presentes nos lactentes.

Objetivo Secundário:

Avaliar no sangue e no leite maduro de mães saudáveis nos períodos durante e após a infecção de seus respectivos lactentes:

a) As subpopulações de linfócitos, T e B, e macrófagos; b) Os níveis das quimiocinas envolvidas no homing das subpopulações de linfócitos T, B, e macrófagos para o leite; c) A expressão dos receptores envolvidos no homing nas subpopulações de T, B e macrófagos para o leite

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

baixos - coleta de sangue periférico

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com desenho de estudo adequado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado

Recomendações:

Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.754.872

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_772715.pdf	01/09/2016 14:52:37		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Mestrado Ying_Final_ICR.pdf	01/09/2016 14:41:35	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Exequibilidade_final.pdf	01/09/2016 14:33:29	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Cadastro_online_HC_assinado.pdf	01/09/2016 14:33:04	Patricia Palmeira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FM.pdf	01/09/2016 14:32:39	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Anuencia CPesq_HU_Palmeira.pdf	01/09/2016 14:29:40	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Anuencia_Pediatria_HU_Palmeira.pdf	01/09/2016 14:28:36	Patricia Palmeira	Aceito
Folha de Rosto	Plataformabrasil_assinada_Ying.pdf	01/09/2016 12:00:29	Patricia Palmeira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Decl_Infraestrutura_HU_Palmeira.pdf	01/09/2016 11:58:21	Patricia Palmeira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 27 de Setembro de 2016

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

Hospital Universitário da USP

Caso nº:	
Data da entrada no HU:	
Data da 1ª Coleta (Lactente doente): Horário da 1ª Coleta - Sangue: - Leite: Tempo após a última mamada:	Data da 2ª Coleta (Lactente saudável): Horário da 2ª Coleta: - Sangue: - Leite: Tempo após a última mamada:

Dados da Mãe

Nome:						
Endereço:						
Nº	Complemento:		Bairro:		CEP:	
Telefones:						
Nº de Gestações:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(+5)
Escolaridade até:	(1) Fundamental	(2) Ensino médio	(3) Técnico	(4) Superior	(5) Pós graduação	

Estado de saúde Materna na 1ª coleta (Lactente doente)

Hipertireoidismo	(0) Ausente	(1) Presente
Hipotireoidismo	(0) Ausente	(1) Presente
Diabete Melito	(0) Ausente	(1) Presente
Diabete gestacional	(0) Ausente	(1) Presente
Tuberculose	(0) Ausente	(1) Presente
Doença de Chagas	(0) Ausente	(1) Presente
Doença Hipertensiva Específica da Gestação	(0) Ausente	(1) Presente
Hipertensão Arterial Sistêmica	(0) Ausente	(1) Presente
Lúpus Eritematoso Sistêmico	(0) Ausente	(1) Presente
Artrite Reumatoide	(0) Ausente	(1) Presente
Polimiosite/Dermatomiosite	(0) Ausente	(1) Presente
Poliarterite Nodosa	(0) Ausente	(1) Presente
Outras Doenças autoimunes	(0) Ausente	(1) Presente
Citar:		
Soro positivo para TORCHS	(0) Não (1) Sim	O quê?
Alergias	(0) Não (1) Sim	O quê?
Medicamentos fixos:	(0) Não (1) Sim	Quais?
Medicamentos temporários:	(0) Não (1) Sim	Quais?
Suplementos vitamínicos/ Minerais	(0) Não (1) Sim	Quais?
	Momento da coleta	
	Últimos 3 meses	
Febre	(0) Não (1) Sim Cº	(0) Não (1) Sim Cº
Secreção nasal	(0) Não (1) Sim	(0) Não (1) Sim
Tosse	(0) Não (1) Sim () Seca () Produtiva	(0) Não (1) Sim () Seca () Produtiva
Pneumonia	(0) Não (1) Sim	(0) Não (1) Sim
Diarreia	(0) Não (1) Sim	(0) Não (1) Sim

Vômitos	(0) Não	(1) Sim		(0) Não	(1) Sim	
Mastite	(0) Não	(1) Sim		(0) Não	(1) Sim	
Alergia	(0) Não	(1) Sim	Qual?	(0) Não	(1) Sim	Qual?
Tabagismo	(0) Não	(1) Sim	nº cigarros:			
Álcool	(0) Não	(1) Sim	nº doses:			
Drogas ilícitas	(0) Não	(1) Sim	Qual?			
Manifestação de doença nos últimos 3 meses?						

Estado de saúde Materna na 2ª coleta (Lactente Saudável)						
Hipertireoidismo	(0) Ausente			(1) Presente		
Hipotireoidismo	(0) Ausente			(1) Presente		
Diabete Melito	(0) Ausente			(1) Presente		
Diabete gestacional	(0) Ausente			(1) Presente		
Tuberculose	(0) Ausente			(1) Presente		
Doença de Chagas	(0) Ausente			(1) Presente		
Doença Hipertensiva Específica da Gestação	(0) Ausente			(1) Presente		
Hipertensão Arterial Sistêmica	(0) Ausente			(1) Presente		
Lúpus Eritematoso Sistêmico	(0) Ausente			(1) Presente		
Artrite Reumatoide	(0) Ausente			(1) Presente		
Polimiosite/Dermatomiosite	(0) Ausente			(1) Presente		
Poliarterite Nodosa	(0) Ausente			(1) Presente		
Outras Doenças autoimunes	(0) Ausente			(1) Presente		
Citar:						
Soro positivo para TORCHS	(0) Não	(1) Sim	O quê?			
Alergias	(0) Não	(1) Sim	O quê?			
Medicamentos fixos:	(0) Não	(1) Sim	Quais?			
Medicamentos temporários:	(0) Não	(1) Sim	Quais?			
Suplementos vitamínicos/ Minerais	(0) Não	(1) Sim	Quais?			
	Momento da coleta			Últimos 3 meses		
Febre	(0) Não	(1) Sim	Cº	(0) Não	(1) Sim	Cº
Secreção nasal	(0) Não	(1) Sim		(0) Não	(1) Sim	
Tosse	(0) Não	(1) Sim	() Seca () Produtiva	(0) Não	(1) Sim	() Seca () Produtiva
Pneumonia	(0) Não	(1) Sim		(0) Não	(1) Sim	
Diarreia	(0) Não	(1) Sim		(0) Não	(1) Sim	
Vômitos	(0) Não	(1) Sim		(0) Não	(1) Sim	
Mastite	(0) Não	(1) Sim		(0) Não	(1) Sim	
Alergia	(0) Não	(1) Sim	Qual?	(0) Não	(1) Sim	Qual?
Tabagismo	(0) Não	(1) Sim	nº cigarros:			
Álcool	(0) Não	(1) Sim	nº doses:			
Drogas ilícitas	(0) Não	(1) Sim	Qual?			
Manifestação de doença nos últimos 3 meses?						

Dados do Lactente

Data do nascimento:		Idade (meses):	
Gênero:	(1) Masc	(2) Fem	(3) Indeterm
Peso de Nascimento (PN):		Comprimento de Nascimento (CN):	
Tipo de Parto:	(1) Cesária	(2) Normal	Tempo de gestação:
Intercorrência durante o parto?	(0) Não	(1) Sim	O quê?
Intercorrência durante a gestação?	(0) Não	(1) Sim	O quê?
Classificação RN:			
Idade Gestacional	(1) Pré-termo	(2) Termo	(3) Pós-termo
Class. Gestacional	(1) PIG	(2) AIG	(3) GIG
Class. Peso	(1) Baixo Peso	(2) Normal	(3) Macrossômico

Dados clínicos e laboratoriais do lactente

1ª coleta (Lactente doente)						
Aleitamento materno exclusivo?	(1) Sim	(0) Não	Por quanto tempo?			
Frequência da mamada (x/dia):			Tempo de cada mamada (min/mamada):			
Alimentação complementar:						
Início dos sintomas (dias):						
	Momento da coleta			Últimos 3 meses		
Febre	(0) Não	(1) Sim	Quando e Cº?	(0) Não	(1) Sim	Quando e Cº?
Secreção nasal	(0) Não	(1) Sim		(0) Não	(1) Sim	
Tosse	(0) Não	(1) Sim	() Seca () Produtiva	(0) Não	(1) Sim	() Seca () Produtiva
Diarreia	(0) Não	(1) Sim	(x/dia):	(0) Não	(1) Sim	(x/dia):
Vômitos	(0) Não	(1) Sim	(x/dia):	(0) Não	(1) Sim	(x/dia):
Alergia	(0) Não	(1) Sim	Qual?	(0) Não	(1) Sim	Qual?
Manifestação de doença nos últimos 3 meses?						
Exames laboratoriais						
Leucócitos:			Neutrófilos:			
Linfócitos:			Monócitos:			
Eosinófilos:			Plaquetas:			
Proteína C Reativa (PCR):			Hemácias:			
Pesquisa de microorganismo? Virus ou Bactéria?						

Raio X torácico?
Diagnóstico inicial:
Diagnóstico Final:
Medicamentos no HU:
Medicamentos antes da coleta? Por quanto tempo? Desde quando?

2ª coleta (Lactente saudável)						
Aleitamento materno exclusivo?	(1) Sim	(0) Não	Por quanto tempo?			
Frequência da mamada (x/dia):			Tempo de cada mamada (min/mamada):			
Alimentação complementar:						
	Momento da coleta			Últimos 3 meses		
Febre	(0) Não	(1) Sim	Quando e Cº?	(0) Não	(1) Sim	Quando e Cº?
Secreção nasal	(0) Não	(1) Sim		(0) Não	(1) Sim	
Tosse	(0) Não	(1) Sim	() Seca () Produtiva	(0) Não	(1) Sim	() Seca () Produtiva
Diarreia	(0) Não	(1) Sim	(x/dia):	(0) Não	(1) Sim	(x/dia):
Vômitos	(0) Não	(1) Sim	(x/dia):	(0) Não	(1) Sim	(x/dia):
Alergia	(0) Não	(1) Sim	Qual?	(0) Não	(1) Sim	Qual?
Manifestação de doença nos últimos 3 meses?						

Classificação dos Termos		
Pré-Termo: abaixo de 37ª semanas	Termo: entre 37ª e 42ª semanas	Pós-Termo: acima 42ª semana
PIG: abaixo do percentil 10	AIG: entre os percentis 10 e 90	GIG: acima do percentil 90
Baixo Peso: < 2.500g	Normal: > 2. 501g e < 4000g	Macrossômico: > 4.001g

Referências hemograma	
Leucócitos:	Neutrófilos:
Linfócitos:	Monócitos:
Eosinófilos:	Plaquetas:
Proteína C Reativa (PCR):	Hemácias: