Letícia Fuganti Campos

**A influência da aditivação do leite humano no crescimento bacteriano
*in vitro***

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

**Programa de Pediatria.
Orientador: Mário Cícero
Falcão**

**São Paulo
2012**

Letícia Fuganti Campos

**A influência da aditivação do leite humano no crescimento bacteriano
*in vitro***

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

**Programa de Pediatria.
Orientador: Mário Cícero
Falcão**

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Campos, Letícia Fuganti

A influência da aditivação do leite humano no crescimento bacteriano *in vitro* / Letícia Fuganti Campos. -- São Paulo, 2012.

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

Programa de Pediatria.

Orientador: Mário Cicero Falcão.

Descritores: 1.Leite humano 2.Aditivos alimentares 3.Lactoferrina

USP/FM/DBD-402/12

Agradecimentos

À Deus, por me dar força e me suprir em todas as minhas necessidades;

Ao meu orientador, Dr. Mário Cícero Falcão, por acreditar em mim, pelo apoio fundamental e dedicação, e por me mostrar o caminho da ciência;

Ao microbiologista Dr João Carlos Repka, pela ajuda incansável que possibilitou a execução deste trabalho;

À minha família, pelo incentivo, carinho e paciência;

Ao meu pai, Antônio Carlos L Campos, pelo incentivo, apoio, contribuição para meu crescimento profissional, ajuda técnica e pelo exemplo de profissional;

À todas as participantes deste trabalho, que doaram voluntariamente amostras de leite humano;

Ao Hospital Angelina Caron, pela disponibilização da coleta de amostras e utilização de suas instalações, além de doação de materiais utilizados no laboratório;

Ao Programa de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por me aceitar como aluna, pelo apoio técnico e pela excepcional recepção;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro que possibilitou a conclusão desta pesquisa.

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

Resumo

Abstract

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1 Importância do leite materno no recém nascido a termo e no pré-termo	11
2.2 Composição do leite materno.....	14
2.3 Aditivos de leite materno	17
2.4 Lactoferrina	21
2.5 Microbiota intestinal.....	25
2.6 Microrganismos patogênicos.....	29
3 OBJETIVO	32
4 METÓDOS.....	33
4.1 Coleta de leite materno	33
4.2 Prova de esterilidade.....	36
4.3 Avaliação qualitativa da capacidade bactericida	36
4.3.1 Materiais.....	36
4.3.2 Preparação das cepas de bactérias	38
4.3.3 Teste qualitativo com leite materno puro.....	38
4.3.4 Teste qualitativo com leite materno aditivado.....	38
4.4 Avaliação quantitativa da capacidade bactericida	40
4.4.1 Materiais.....	40
4.4.2 Preparação das cepas de bactérias	41
4.4.3 Teste quantitativo com leite materno puro.....	41
4.4.4 Teste quantitativo com leite materno aditivado	41
4.5 Cálculo amostral	42
4.6 Análise Estatística	43
4.7 Custos	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Avaliação qualitativa da capacidade bactericida	44
5.2 Avaliação quantitativa da capacidade bactericida	44
6 DISCUSSÃO.....	48

7 CONCLUSÃO	54
8 ANEXOS	55
9 REFERENCIAS	58

Resumo

INTRODUÇÃO: A lactoferrina disponível no leite materno desempenha função imunológica e protege recém-nascidos de infecções por se ligar ao ferro e privá-lo de bactérias patogênicas, o que resulta em atividade bacteriostática contra organismos patogênicos ferro dependentes. A utilização de aditivo de leite materno suplementado com ferro poderia prejudicar os efeitos protetores da lactoferrina e aumentar os riscos de infecção em recém-nascidos. **OBJETIVO:** Comparar o crescimento bacteriano no colostro puro *versus* colostro com aditivo de leite materno suplementado com ferro. **MÉTODO:** O crescimento bacteriano de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foi comparado em 78 amostras de colostro puro ou colostro com aditivo do leite humano suplementado com ferro. Para análise qualitativa, discos de papel filtro foram imergidos nas amostras de leite materno puro ou leite materno com aditivo suplementado de ferro e incubados por 48 horas em placas de Petri contendo 10^1 Unidades Formadoras de Colônia por ml (UFC/ml) de cada cepa de bactérias. Para a análise quantitativa, 1ml de cada cepa de bactérias contendo 10^7 UFC/ml foi homogeneizado com 1ml de colostro puro ou colostro com aditivo do leite humano suplementado com ferro e semeado em placa de Petri. O número de UFC/ml foi contado após 24 horas de incubação a 37°C. **RESULTADOS:** A análise qualitativa não mostrou diferença no crescimento bacteriano. Na avaliação quantitativa, o crescimento de *Escherichia coli* no colostro puro foi de $29.4 \pm 9.7 \times 10^6$ CFU/ml e no colostro com aditivo de leite materno suplementado de ferro foi de $31.2 \pm 10.8 \times 10^6$ CFU/ml, com diferença na média de crescimento de $1.9 \pm 4.9 \times 10^6$ CFU/ml ($p = 0,001$). O crescimento bacteriano nas cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* no colostro puro e no colostro com aditivo de leite materno não apresentou diferença estatística. **CONCLUSÃO:** O acréscimo de aditivo de leite materno suplementado com ferro nesta concentração reduziu a ação bacteriostática contra *Escherichia coli*.

DESCRIPTORIOS: Leite humano; aditivo de leite humano; lactoferrina.

Abstract

BACKGROUND: Lactoferrin in human breast milk has been shown to protect newborns from infection by binding to iron and depriving it from pathologic bacteria that need iron to proliferate. If iron-enriched fortifier is added to breast milk, it might impair the protective effect of lactoferrin and increase the risk of infection in newborns. **OBJECTIVE:** To compare bacterial growth in pure colostrum versus colostrum with human milk fortifier containing iron. **METHODS:** The growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in 78 samples of pure colostrum or of colostrum with added human milk fortifier containing iron was compared. For qualitative analysis, filter paper discs were immersed in samples from each group and incubated for 48 hours with 10^1 Colony Forming Units/ml of each strain. For quantitative assessment, 1 ml of each strain containing 10^7 Colony Forming Units/ml was homogenized with 1 ml of either colostrum or colostrum with human milk fortifier, seeded into a Petri dish, and incubated at 37°C. Twenty-four hours later the number of Colony Forming Units was counted. **RESULTS:** Qualitative analysis showed no difference in bacterial growth. In the quantitative evaluation, *Escherichia coli* growth in the pure colostrum group was $29.4 \pm 9.7 \times 10^6$ CFU/ml while in the human milk fortifier group it was $31.2 \pm 10.8 \times 10^6$ CFU/ml; the difference between average growth was $1.9 \pm 4.9 \times 10^6$ CFU/ml ($p = 0.001$). There were no differences in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* growth. **CONCLUSION:** Addition of iron at this concentration reduced breast milk bacteriostatic action against *Escherichia coli*.

KEYWORDS: breastfeeding; human milk fortifier; lactoferrin.

1 INTRODUÇÃO

O Leite Materno (LM) é o alimento ideal para ser ofertado ao recém-nascido (RN) devido aos seus benefícios no crescimento e desenvolvimento e de seus fatores imunológicos. O LM também é considerado o alimento ideal para RN prematuros. Entretanto, devido à necessidade nutricional aumentada deste grupo, o LM como fonte exclusiva de nutrição muitas vezes é insuficiente para atender às necessidades nutricionais, principalmente em RN prematuros com peso inferior a 1500g (Schanler, 2011; American Academy of Pediatrics, 2012; Cohen e McCallie, 2012; Higgins et al., 2012). Referido grupo de RN pré-termo pode se beneficiar da adição de calorias, proteína, cálcio, fósforo, ferro e sódio no LM, que pode ser feita com o uso de aditivo de LM, mantendo todas as vantagens do mesmo (Chan, 2003; Santiago et al., 2005; Ovali et al., 2006; Chan et al., 2007; Morales e Shanler, 2007). O único aditivo de LM disponível no Brasil durante a realização da presente pesquisa foi modificado recentemente para aumentar o conteúdo de ferro (0,28g de Fe por grama de produto).

O LM promove benefícios imunológicos, entre os quais se destaca a capacidade bacteriostática da lactoferrina, que é uma proteína capaz de se ligar ao ferro com atividade contra bactérias, vírus e fungos; efeito no sistema imunológico (imunomoduladora) e na função imune da mucosa intestinal e ainda efeitos antioxidantes e anti-carcinogênicos (Lönnerdal, 2003; Lönnerdal, 2009; Burrow et al., 2011; Adamkin, 2012; Ochoa et al., 2012).

A lactoferrina disponível no LM age na mucosa dos RN protegendo-os contra infecções por se ligar ao ferro, privando-o de bactérias patogênicas que necessitam de ferro para se proliferar. Para que seja possível manter esta capacidade bacteriostática, entretanto, a lactoferrina necessita de um meio com baixa concentração de ferro. Alguns estudos mostraram que a adição de ferro exógeno no LM pode comprometer os benefícios da lactoferrina, o que poderia aumentar o risco de infecção em RN (Chan, 2003; Chan et al., 2007; Santiago et al., 2005), enquanto outro estudo mostrou crescimento semelhante para o LM com ou sem aditivo, sem alteração nas

propriedades intrínsecas de defesa do LM com adição de ferro (Ovali et al., 2006).

Devido à importância do tema e à ausência de resultados conclusivos quanto à influência da adição de aditivos suplementados com ferro ao LM em relação ao crescimento bacteriano, este estudo visou comparar *in vitro* o crescimento de bactérias patogênicas em LM aditivado e não aditivado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância do leite materno no recém-nascido a termo e no pré-termo

A importância do LM para o RN como fonte nutricional, os benefícios imunológicos, emocionais e sócio-culturais encontram-se bem estabelecidos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) fornece base para proteção, promoção e apoio ao aleitamento materno como prioridade de Saúde Pública (Centers for Disease Control and Prevention, 2010; American Academy of Pediatrics, 2012; World Health Organization - WHO, 2012).

O LM é o único alimento energético, nutricional e imunologicamente completo que deve ser consumido pelo RN. O aleitamento materno fortalece a imunidade, mantém o crescimento e desenvolvimento normal, melhora o processo digestivo, favorece o vínculo mãe-filho e facilita o desenvolvimento emocional, cognitivo e do sistema nervoso central (American Academy of Pediatrics, 2012; Neville et al., 2012; WHO, 2012).

O LM reduz o risco de infecções no trato respiratório, gastrointestinal, enterocolite necrosante, síndrome da morte súbita, doenças alérgicas, doença celíaca, doenças inflamatórias intestinais, obesidade, diabetes, e leucemia e linfoma na infância. O LM promove benefícios durante a internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e também após a alta hospitalar, o que reflete em um número menor de reinternações. Ainda, o aleitamento exclusivo promove benefícios em longo prazo, como prevenção de obesidade, síndrome metabólica, hipertensão e diabetes (American Academy of Pediatrics, 2012; Higgins et al., 2012; Neville et al., 2012).

As propriedades imunológicas do LM são essenciais para os RN pré-termo, que apresentam imaturidade imunológica. O LM é composto por fatores hormonais que protegem o RN contra infecções por meio de componentes bactericidas (Sisk et al., 2006; Morales e Schanler, 2007; Schanler, 2011; Cohen e McCallie, 2012).

Amamentar exclusivamente até o sexto mês de vida tornou-se recomendação da OMS baseada em revisão extensa da literatura, incluindo

2.668 trabalhos publicados sobre o tema. Segundo a Academia Americana de Pediatria, o LM é o substrato ideal para nutrir tanto RN de termo como prematuro (American Academy of Pediatrics, 1977).

Além das propriedades imunológicas do LM, alguns dos seus constituintes promovem a colonização intestinal com lactobacilos e bifidobactérias, que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal no processo de colonização dos RN (Brandt et al., 2006; Boehm e Stahl, 2007).

A OMS (1998) e a United Nations Children's Found (UNICEF) (2002) recomendam a iniciação precoce da amamentação, na primeira hora de vida, por estimular a produção de leite e aumentar a contratilidade uterina – o que reduz o risco de hemorragia e infecção. A amamentação deve ainda ser exclusiva; mães que relatam amamentação parcial (aleitamento com suplementação de fórmula) são mais propensas a não manter o aleitamento por seis meses (Thompson et al., 2010).

O LM é também o alimento ideal para os RN pré-termo, por ser composto por constituintes que respondem às peculiaridades, especificidades e necessidades destes RN. O LM fornece nutrientes eficientemente absorvidos devido à digestão facilitada pela presença de enzimas do próprio leite. O leite da mãe de RN pré-termo é especialmente produzido de forma a responder à imaturidade do trato gastrointestinal e à incapacidade de produção enzimática. O LM é espécie-específico, sendo adaptado durante a evolução para atingir as necessidades nutricionais dos RN (ANVISA, 2007; Bathia, 2007; American Academy of Pediatrics, 2012).

Na última década, muitos estudos documentaram melhor prognóstico para RN de muito baixo peso (peso de nascimento < 1500g) quando alimentados com LM, com redução na incidência de infecções, sepse e enterocolite necrosante no período neonatal, quando comparados aos RN alimentados com fórmulas (Morales e Schanler, 2007; Schanler, 2011; Cohen e McCallie, 2012; Ghandehari et al., 2012; Torres et al., 2012).

A utilização do leite da própria mãe, ordenhado para o RN pré-termo hospitalizado em unidade neonatal, é o método ideal para oferta de LM. Se o leite da mãe não estiver disponível, o leite processado em bancos de leite humano pode ser ofertado. Os benefícios biológicos do LM são mantidos,

mesmo com eventuais perdas de nutrientes decorrentes da coleta, processamento, estocagem e do método utilizado para a oferta do leite. Os usuais receptores de leite humano doado são os RN pré-termo com < 32 semanas de gestação ou < 1500g (Nascimento e Issler, 2004; Morales e Schanler, 2007; American Academy of Pediatrics, 2012; Torres et al., 2012).

A nutrição do RN pré-termo de muito baixo peso ao nascer ainda constitui importante desafio. O aumento no número de RN pré-termo nas últimas décadas, com pesos cada vez menores e com aumento da sobrevivência, permitiu que fossem realizados estudos sobre o seu metabolismo. Esses estudos concluíram que o crescimento fetal deve ser a meta para o crescimento dos RN pré-termo, tanto com relação à velocidade de crescimento como com relação à composição corporal (Cruz et al., 2006; ANVISA, 2007; Ziegler, 2011; Higgins et al., 2012).

Entretanto, o crescimento intrauterino se deve a condições favoráveis e ideais para que o feto chegue ao término da gestação e nasça com o peso, o comprimento e o perímetro cefálico adequados e definidos como padrão. Esperar que o crescimento pós-natal seja igual no RN prematuro, internado em um ambiente contaminado e estressante como o da UTI neonatal, pode ser considerado como meta difícil de ser atingida (Cruz et al., 2006; ANVISA, 2007; Thompson et al, 2010).

Nascer prematuramente também coloca o RN em condição de grande risco nutricional porque é no terceiro trimestre que ocorre o depósito de nutrientes. Além disso, o rápido crescimento, característico dessa fase da vida, as doenças que aumentam as necessidades nutricionais, a redução da tolerância alimentar, as dificuldades de via para a alimentação, as situações clínicas que impõem restrição fluida e a imaturidade fisiológica são fatores que contribuem, isoladamente ou em conjunto, para expor o RN de baixo peso ao risco nutricional (Yu, 2005; Oliveira et al., 2008; Higgins et al., 2012).

O déficit de nutrientes resulta em retardo no crescimento pós-natal, pois a nutrição é essencial para a manutenção da homeostase fisiológica e crescimento dos RN. É importante destacar que, nesse período da vida, distúrbios do crescimento podem acarretar sequelas em longo prazo por erro

na programação biológica (Cruz et al., 2006; Brock e Falcão, 2008; Schanler, 2011; Ziegler, 2011; Higgins et al., 2012).

Os RN pré-termo muitas vezes não atingem o peso médio de nascimento ao chegarem à idade gestacional de nascimento; mesmo que alguns nasçam dentro de um canal normal de crescimento, o peso é considerado insuficiente após o nascimento. Alguns RN fazem *catch-up*, mas a taxa e tempo de *catch-up* diferem, e alguns estudos correlacionam esse rápido período de crescimento com ganho excessivo de tecido adiposo, o que poderia ter consequências, em longo prazo, relacionadas à obesidade, síndrome metabólica e doenças crônicas, como diabetes mellitus (Brock e Falcão, 2008; Fewtrell, 2011; Ramel et al., 2011; Schanler, 2011; Griffin e Cooke, 2012; Higgins et al., 2012).

Quanto menor o RN pré-termo, maior é a sua necessidade proteica e de minerais. Esses RN apresentam prejuízo na absorção dos minerais, importantes para formação óssea, por nascerem no período mais importante para o depósito desses minerais, resultando em déficit ao nascimento. Ainda, muitas vezes há subsequente carência no consumo desses minerais após o nascimento. O LM recentemente foi associado com benefícios em longo prazo na saúde óssea de RN pré-termo, possivelmente por fatores não-nutricionais (Fewtrell, 2011; Ziegler, 2011; Cohen e McCallie, 2012).

A imaturidade conhecida do RN pré-termo é traduzida por múltiplas deficiências enzimáticas, que causam modificações nas funções gástricas e pancreáticas, na síntese de ácidos biliares, nas conversões de metionina em cistina, fenilalanina em tirosina e amônia em ureia. Existe ainda capacidade reduzida para excreção de sódio, de sobrecargas osmóticas e de íons hidrogênio. O LM, devido às peculiaridades de sua composição nutricional, é o alimento mais adequado para superar tais deficiências, permitindo ao RN ótima adaptação (Silva et al., 2007).

2.2 Composição do Leite Materno

O LM é composto, em grande parte, por gordura, quer representa cerca de 50% do valor calórico total, principalmente na forma de

triglicerídeos, além de colesterol e ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados. O conteúdo proteico do LM é composto principalmente por caseínas e proteínas do soro, sendo que a relação caseína/proteína do soro varia nas diferentes fases da lactação. A baixa concentração de caseína, nos primeiros dias de lactação, resulta na formação de coágulo gástrico mais leve, com flóculos de mais fácil digestão e com reduzido tempo de esvaziamento gástrico (Lonnerdal, 2003; Bortozolo et al., 2004; Morales e Schanler, 2007).

A fração proteica contém grandes concentrações de aminoácidos condicionalmente essenciais para o RN pré-termo, de alto valor biológico, como a cistina e a taurina, que são fundamentais ao desenvolvimento do sistema nervoso central. Isso é particularmente importante para os prematuros, que não conseguem sintetizar os referidos aminoácidos a partir de outros aminoácidos por deficiências enzimáticas. As proteínas presentes no LM também facilitam a absorção de nutrientes (Bortozolo et al., 2004). A principal fonte de carboidratos é a lactose, que fornece galactose e é fundamental na absorção de minerais como cálcio e ferro, e sua concentração parece não ser influenciada pela dieta materna.

A composição do LM varia nas primeiras semanas de lactação. O primeiro produto da secreção láctea da nutriz é o colostro, produzido nos primeiros sete dias após o parto. Do sétimo ao 14º dia passa a ser denominado leite de transição, para posteriormente ser chamado de leite maduro. O colostro tem composição nutricional distinta do leite maduro, com concentrações mais elevadas de proteínas, minerais e vitaminas lipossolúveis, bem como menores teores de lactose, gorduras e vitaminas do complexo B (ANVISA, 2007; Castellote et al., 2011).

O conteúdo energético do colostro oscila ao redor de 58 kcal/100 ml, em contraste com as 61 a 71 kcal/100 ml existentes no leite maduro, e a quantidade excretada oscila entre 2 e 20 ml por mamada nos três primeiros dias. O volume de leite produzido na lactação já estabelecida varia de acordo com a demanda da criança, chegando, em média, a 850 ml por dia na amamentação exclusiva (Almeida et al., 2005; Castellote et al., 2011).

O colostro é rico em fatores de defesa, particularmente imunoglobulinas e leucócitos. As imunoglobulinas representam grande parte de sua fração proteica, constituindo elementos importantes na proteção do RN contra microrganismos. Os níveis de anticorpos sofrem rápido e acentuado declínio nos primeiros dias de pós-parto (Orlando, 1995; Silva et al., 2007; Hurley e Theil, 2011).

A transferência placentária de IgA e IgM é mínima ou inexistente, o que coloca o RN em maior risco para infecções. Como o colostro tem leucócitos viáveis em número equivalente ao do sangue periférico, as primeiras mamadas devem funcionar como pequenas transfusões sanguíneas para o neonato. A função digestiva do RN é imatura, as células do colostro não são destruídas no estômago e continuam viáveis nas porções superiores do intestino, fato que permite especular se essas células poderiam ter papel protetor no intestino, liberando IgA, lisozima, lactoferrina, e realizando fagocitose (Orlando, 1995; Shashiraj et al., 2006; Neville et al., 2012).

O LM também apresenta diferenças de composição dependendo do momento da ordenha. No início há predomínio da fração hidrossolúvel e na fase intermediária aumenta a concentração de caseína, com predomínio da fração suspensão. No estágio final da ordenha ocorre aumento dos constituintes lipossolúveis. A concentração de proteína diminui durante a lactação, enquanto a quantidade de gordura não varia significativamente (ANVISA, 2007; Castellote et al., 2011).

Os constituintes lipossolúveis, que integram a fração emulsão se correlacionam de forma inversamente proporcional com as proteínas do soro do leite, o que permite afirmar que, quanto maior o conteúdo de gordura, maior será o aporte energético e menor será a concentração de fatores imunológicos. A gordura, além de ser fonte de colesterol e ácidos graxos essenciais, possibilita a absorção de vitaminas lipossolúveis (Silva et al., 2007; Castellote et al., 2011).

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA), principalmente o ácido araquidônico (AA) e o ácido docosaexaenoico (DHA), são fundamentais para a maturação do cérebro e a função visual;

inclusive com redução do risco de retinopatia e aumento no quociente de inteligência. A concentração desses ácidos no LM varia dependendo do consumo alimentar da nutriz. Apesar de algumas fórmulas infantis serem suplementadas com LC-PUFA, faltam estudos em longo termo mostrando efeitos positivos no desenvolvimento cognitivo dos RN com esta suplementação (Nascimento e Issler, 2004; American Academy of Pediatrics, 2012; Neville, 2012).

O LM parece também apresentar variação diurna, com menor concentração de gordura pela manhã quando comparada ao final do dia. Já o teor de ferro tende a ser mais baixo no início da manhã com relação ao final da tarde. Os valores de ferro encontrados no LM variam na literatura (0,1-1,6 mg/l) dependendo da amostra e estágio da lactação. O teor de ferro parece ser mais elevado de colostro (0,86-0,89mg/l) do que do LM 14 dias após o parto (0,33-0,34mg/l), ou 6 meses após o parto (0,26-0,27mg/l). Os valores relatados em diferentes estudos se devem em parte às diferenças na amostragem. Alguns estudos sugerem que a quantidade de ferro no LM não é suficiente durante os primeiros 6 meses de vida (Raj et al., 2008; Mills e Davies, 2012).

Os benefícios do LM são inquestionáveis para RN a termo, e especialmente úteis para o prematuro. Entretanto, o LM apresenta algumas inadequações nutricionais para o RN pré-termo com menos de 1500g, devido à necessidade nutricional elevada – que deveria ser supridas na vida intra-uterina por meio da transferência materno-fetal (ANVISA, 2007; Morales e Schanler, 2007; Schanler, 2011; Zeigler, 2011; American Academy of Pediatrics, 2012; Cohen e McCallie, 2012; Higgins et al., 2012; Neville, 2012).

2.3 Aditivos de Leite Materno

O LM é o alimento ideal para os RN pré-termo, entretanto deve ser suplementado para garantir oferta nutricional para RN com menos de 1500g. O aditivo de LM aumenta a oferta de energia, proteína, cálcio, magnésio, ferro, sódio, cobre, fósforo, zinco e vitaminas B12, B6, C, D, E e K e ácido

fólico (ANVISA, 2007; Bathia, 2007; Morales e Schanler, 2007; Schanler, 2011; Zeigler, 2011; Cohen e McCallie, 2012; Higgins et al., 2012; Neville et al., 2012).

A aceleração do crescimento dos RN de muito baixo peso ao nascer pode ser alcançada com fórmula para RN pré-termo, entretanto o LM é o alimento ideal para estes RN por todos os inúmeros benefícios descritos. (Zachariassen et al., 2011). Os aditivos de LM têm o objetivo de suplementar o LM, a fim de torná-lo mais adequado às necessidades dos RN pré-termo. Dessa maneira, obtêm-se as vantagens imunológicas e a qualidade nutricional do LM com a oferta de nutrientes em maiores concentrações (Mataloum et al., 2004; Morales e Schanler, 2007; Schanler, 2011; Zeigler, 2011; Cohen e McCallie, 2012; Higgins et al., 2012; Neville et al., 2012).

Os aditivos disponíveis no mercado geralmente são derivados do leite de vaca, mas existe também a possibilidade de suplementar o LM com o próprio leite humano, com tecnologia aplicada em banco de leite humano. Esta tecnologia resulta em LM exclusivo, com quantidades adequadas de nutrientes, o que pode ser mais benéfico para o RN pré-termo (Moody et al., 2000; Sullivan et al., 2010).

O acréscimo de aditivos promove crescimento quantitativo e qualitativo, já que o RN pré-termo nasce em um período no qual o crescimento intrauterino é acelerado e o depósito de nutrientes é acentuado. A adição de proteína ao LM resulta em ganho de peso, crescimento do perímetro cefálico e do comprimento; a adição de sódio diminui o risco de hiponatremia; a adição de cálcio e fósforo diminui o risco da doença metabólica óssea e de fraturas (Bathia, 2007; Morales e Schanler, 2007; Zeigler, 2011; Cohen e McCallie, 2012; Higgins et al., 2012).

A metanálise *Cochrane* de Kuschel CA e Harding JE (2000) que incluiu mais de 500 RN que receberam LM aditivado versus LM puro, mostrou que o grupo que recebeu LM aditivado apresentou maior ganho de peso, comprimento e perímetro cefálico e melhor grau de mineralização óssea, sem aumento do risco de enterocolite necrosante. O estudo anterior de Lucas (1996), com 275 RN prematuros, demonstrou que os aditivos de

LM melhoram o crescimento de RN prematuros em curto prazo, mas não comprovou benefícios no desenvolvimento em longo prazo.

O fornecimento calórico dos aditivos de LM é na forma de carboidratos e lipídios, com a vantagem de aumentar a densidade calórica do LM. A quantidade de proteínas encontrada nos aditivos de LM muitas vezes é insuficiente para o RN pré-termo, fazendo com que o LM, mesmo que aditivado, nem sempre consiga atingir a meta proteica. O conteúdo final do LM aditivado depende da quantidade de proteína presente no LM antes da aditivação (Ziegler, 2011).

Como a composição do LM é variável, alguns autores sugeriram que o ideal seria analisar nutricionalmente o leite da mãe ou do banco de leite humano para suplementar com aditivo de LM de maneira mais específica, porque ao suplementar sem analisar o LM, o conteúdo final do LM mais aditivo pode não atingir ou exceder a quantidade de macro ou micronutrientes necessária para o adequado desenvolvimento do RN (Arslanoglu et al., 2006; Bathia, 2007; Ziegler, 2011).

Preconiza-se a oferta de aditivos quando o RN tolera o LM em volume mínimo de 100 ml/Kg/dia. É recomendado para RN com peso ao nascimento < 1500g ou com idade gestacional < 30-32 semanas e deve ser mantido até a criança atingir peso de 1800 a 2000g. A adição deve ser introduzida lentamente até chegar à quantidade total, observando o ganho de peso e a evolução clínica do RN. As concentrações máximas não deverão exceder de 4% a 5% (Santiago et al., 2005; Ziegler, 2011; American Academy of Pediatrics, 2012).

Os aditivos de LM oferecem benefício adicional em casos de RN com restrição de fluídos, pois alcançam as necessidades nutricionais com menor volume de LM. A restrição hídrica é comum em RN com doenças cardíacas congênitas e displasia broncopulmonar. Para atingir a necessidade protéica diária, por exemplo, o RN precisa ingerir em torno de 180-210ml/kg/dia, o que pode ser difícil nessas doenças (Bathia, 2007; Ziegler, 2011).

O uso de aditivos ao LM leva à modificação na osmolaridade, provável redução na qualidade para absorção e redução na tolerância do LM, por retardar o esvaziamento gástrico. Entretanto, foi demonstrado que o

uso de aditivo de LM aumentou o volume residual gástrico, mas que a ingestão de LM também estava aumentada e que o resíduo gástrico não atrasou a oferta de LM e nem refletiu em efeito adverso para o RN (Moody et al., 2000; ANVISA, 2007).

Durante a internação hospitalar, o uso de aditivos de LM é bem documentado e, recentemente, estudo realizado por Zachariassen et al (2011) demonstrou que o uso de aditivos após a alta também é seguro e não reduziu o tempo de aleitamento, apesar de não mostrar diferença no crescimento do RN no primeiro ano de vida quando comparado aos RN que receberam aleitamento exclusivo.

O aumento na sobrevivência do RN de muito baixo peso fez com que a engenharia alimentar buscasse alterações nas fórmulas dos aditivos, visando atender às necessidades desses prematuros. Sabendo-se da demanda aumentada de ferro diário desse grupo de RN, a indústria reformulou alguns destes aditivos e adicionou ferro na sua composição (Berseth et al., 2004). Esta adição de ferro é particularmente importante para os RN prematuros, pois é somente após a 30^a semana de gestação que ocorre a maior transferência de ferro para o feto (Paesano et al., 2010).

O estudo de Berseth et al. (2004), com 181 RN pré-termos, mostrou que tanto o aditivo de LM quanto o aditivo de LM suplementado com ferro foram seguros, bem tolerados e promoveram crescimento adequado. Ainda, a adição de ferro reduziu a necessidade de transfusão sanguínea neste estudo. Baixas taxas de sepse e enterocolite necrosante foram observadas nos dois grupos, confrontando a premissa de que a inclusão de ferro nos aditivos de LM possa aumentar a incidência dessas doenças.

Na época da realização da presente pesquisa, o único aditivo de LM disponível no Brasil, o FM 85[®] (Nestlé), utilizado nos principais serviços de neonatologia do país, foi reformulado recentemente, com adição de ferro, antes inexistente em sua fórmula, em uma proporção de 0,28mg de ferro por grama de aditivo.

2.4 Lactoferrina

O benefício dos aminoácidos do LM no crescimento de RN amamentados é bem documentado, mas é importante destacar que as proteínas também exercem papel importante na função imunológica, na defesa contra microrganismos patogênicos e também no desenvolvimento da flora intestinal e suas funções (Lonnerdal, 2003; Neville, 2012).

Esses benefícios se baseiam principalmente nas imunoglobulinas, caseína, lactoalbuminas, lisosima e lactoferrina. A lactoferrina tem papel importante nesta função, com propriedade bacteriostática e imunomoduladora (Nascimento e Issler, 2003; Lonnerdal, 2009; Neville, 2012; Ochoa et al., 2012). É uma das principais proteínas do soro do LM e, portanto, está presente em maior quantidade no colostro do que no LM maduro; pertence ao grupo das transferrinas e possui coloração vermelha (Chan, 2003; Kayakawa, 2009; Lonnerdal, 2009; Manzoni et al., 2010).

A lactoferrina pode também ser encontrada em outras secreções exógenas, como na lágrima, saliva, mucosa intestinal e secreções genitais. No LM representa a segunda proteína mais abundante (Ochoa et al., 2012). Os níveis de lactoferrina dependem do estágio da amamentação, com cerca de 5 a 7mg/ml no colostro, redução para em torno de 2,8-3,5mg/dl nos primeiros 15 dias de lactação e depois para 0,7 a 1,4mg/ml no leite maduro. Os níveis também variam dependendo do momento da mamada, horário do dia e alguns estudos investigam inclusive interferências dependendo do estado nutricional, nacionalidade e raça da mãe (Sashi et al., 2008; Adamkin, 2012).

A lactoferrina desempenha função bacteriostática importante na superfície da mucosa por se ligar ao ferro e privá-lo dos microrganismos. Ainda, a lactoferrina está envolvida na imunidade inata e modula a inflamação, sendo considerada imunomoduladora local e também sistêmica (Artym e Zimecki, 2005; Lonnerdal, 2009; Adamkin, 2012; Kamiya et al., 2012). Além do papel imunomodulador por meio da homeostase do ferro, a lactoferrina parece se ligar às endotoxinas das bactérias, regulando citocinas inflamatórias, e também parece reduzir a produção de radicais livres, por sequestrar ferro do foco da inflamação (Brock, 2002; Ochoa et al., 2012).

A lactoferrina bovina isolada e a lactoferrina humana recombinada podem ser adicionadas em fórmulas infantis e podem ser benéficas para a proteção e a melhora da resposta imunológica de RN. Ainda, podem ser adicionadas no próprio LM, sendo especialmente úteis para os RN que não podem receber colostro da mãe e recebem LM maduro de banco de leite humano, com concentração inferior de lactoferrina. Também é útil para o RN pré-termo que necessitam de suporte imunológico por tempo prolongado e não apenas durante os dias de produção de colostro (Lonnerdal, 2002; Artym and Zimecki, 2005; Lonnerdal, 2009; Pammi e Abrams, 2011; Adamkin, 2012; Hernell e Ochoa et al., 2012; Kamiya, 2012).

A lactoferrina estimula a proliferação das células endoteliais do intestino, o que sugere a possibilidade de aplicá-la em RN pré-termo e em pacientes com danos na mucosa intestinal. Estudos experimentais sugerem que a lactoferrina possa inibir a atividade de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e formas reativas de oxigênio; promover a diferenciação de células T e B; e, ainda, contribuir para absorção de nutrientes, principalmente ferro, magnésio, zinco e carboidratos (Artym e Zimecki, 2005; Manzoni et al., 2010; Vogel, 2012).

Com relação à absorção de nutrientes, a lactoferrina é captada por via única, mediada por receptores, que carregam os íons metálicos como ferro, manganês e zinco e facilitam a absorção de açúcares. A quantidade de ferro no LM é baixa, mas a lactoferrina é responsável por sua alta biodisponibilidade. Por ser um componente seguro e eficaz, a lactoferrina tem sido estudada como suplemento por via oral para pacientes que necessitem de maior aporte de ferro (Artym e Zimecki, 2005; Lonnerdal, 2009; Paesano, 2010; Ochoa et al., 2012).

Alguns estudos clínicos com lactoferrina bovina adicionada às formulas infantis não mostraram efeito na absorção de ferro, provavelmente porque a lactoferrina bovina não se ligue ao receptor de lactoferrina humana ou porque o efeito benéfico da lactoferrina exista apenas na presença de LM por outros componentes existentes. Outros estudos, entretanto, sugerem que a lactoferrina não possui papel direto na absorção de ferro no RN (Lonnerdal, 2003; Paesano et al., 2006; Frazer et al., 2011; Brock, 2012).

O processo infeccioso depende das condições encontradas no hospedeiro colonizado, dentre elas a disponibilidade de nutrientes essenciais para o desenvolvimento dos microrganismos. O ferro é essencial para o crescimento da maioria das bactérias, sendo indispensável a disponibilidade extracelular desse mineral em quantidades substanciais para que as bactérias se multipliquem. Existindo necessidade de ferro, tanto para o hospedeiro como para as bactérias, ocorre a competição entre as proteínas humanas ligadoras de ferro e os mecanismos de captação do mesmo pelas bactérias (Dall'Agnol e Martinez, 1999; Jonhson e Wessling-Resnick, 2012).

Ao privar os microrganismos de ferro na superfície da mucosa, a lactoferrina atua com propriedade bacteriostática e antiviral, podendo inibir a proliferação de bactérias Gram negativas e Gram positivas, citomegalovírus, HIV 12, *C. albicans*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* e principalmente *Escherichia coli*. No entanto esse não é o único mecanismo de ação da lactoferrina, o que pode ser comprovado pelo elevado poder bacteriostático independente do grau de saturação desta (Lonnerdal, 2003; Nascimento e Issler, 2003; Lonnerdal, 2009; Pierce et al., 2009; Kamiya et al., 2012; Vogel, 2012; Ochoa et al., 2012).

A oferta de lactoferrina para crianças pode atenuar infecções entéricas (Ochoa et al.; 2012). Estudo com 298 crianças japonesas mostrou que a adição de lactoferrina reduziu a duração da contaminação por rotavírus e também levou à diminuição da frequência de vômitos (Egashira et al., 2007). Outro estudo com 140 crianças peruanas mostrou que a adição de lactoferrina humana e lisozima reduziu a duração e a recorrência de diarreia (Zavaleta et al., 2007). O estudo de Manzoni (2009), que incluiu 472 RN, mostrou menor incidência de sepse neonatal e mortalidade por sepse nos grupos que receberam lactoferrina bovina; além da redução na incidência de enterocolite necrosante e retinopatia da prematuridade.

A lactoferrina age no trato gastrointestinal quando é liberada no meio por exocitose, e a sua capacidade bacteriostática é devida ao peptídeo resultante da sua digestão, a lactoferricina. Esse peptídeo correspondente ao grupo amino-terminal da lactoferrina e possui capacidade bacteriostática ainda mais potente por se unir ao DNA. A lactoferricina entra no núcleo

celular através da membrana nuclear e atua como fator de transcrição, modulando a expressão de citocinas, além de efeito antimicrobiano direto, por destruir a parede celular e desintegrar a membrana de patógenos (Togawa et al., 2002; Artym e Zimecki, 2005; Gifford et al., 2005; Manzoni et al., 2010; Brock, 2012; Legrand, 2012; Vogel, 2012).

Alguns estudos mostraram que a lactoferrina é capaz de inibir a secreção de IL-6, mas necessita da ação sinérgica da IgA-S. O efeito da lactoferrina na função imune da mucosa intestinal parece estar associado com células mediadas por via de receptor único e por afetar a transcrição de genes. A lactoferrina também modula o sistema imune por sequestrar lipopolissacarídeos e evitar a ativação da via pró-inflamatória, sepse e dano tecidual. Além disso, por estimular proliferação e diferenciação de células intestinais, a lactoferrina pode causar expansão de massa tecidual e da capacidade absorptiva (Hernell e Lonnerdal, 2002; Lonnerdal, 2003; Lonnerdal, 2009; Legrand e Mazurier, 2010; Latorre et al., 2012; Legrand, 2012;).

Tal efeito mitogênico da lactoferrina pode ser responsável pelo rápido desenvolvimento da mucosa intestinal de lactentes RN. O ganho de peso em crianças alimentadas com fórmulas suplementadas com lactoferrina bovina tem se mostrado maior do que em crianças alimentadas com fórmulas padrão, o que está de acordo com esta proposta função mitogênica da lactoferrina (Nichols et al., 1987; Hernell e Lonnerdal, 2002; Lonnerdal, 2009; Ochoa et al., 2012).

O consumo de ferro é extremamente importante para a prevenção de anemia; a meta-análise recente de Long (2012) mostrou que a suplementação de ferro em RN com menos de 1500g melhorou indicadores hematológicos de níveis de ferro e também anemia por deficiência de ferro. Entretanto, os dados sobre os efeitos do ferro na mucosa do RN e os efeitos adversos ainda são insuficientes, o que exige cuidado na suplementação de ferro durante essa fase. Deve-se manter um balanço normal de ferro, para que o organismo obtenha quantidade suficiente de ferro para permitir resposta imune adequada e, ao mesmo tempo, que não exceda o ferro

disponível às bactérias para sua multiplicação (Leong *et al.*, 2003; Collard, 2009; Long *et al.*, 2012,).

A lactoferrina se liga ao ferro somente no estado férrico, no entanto no momento em que o ferro entra em contato com o LM, a oxidação do íon ferroso para o estado férrico ocorre de imediato. O íon ferroso é oxidado ativamente em solução. A baixa presença de antioxidantes no LM facilita a oxidação do íon ferroso (Chan, 2003).

Desde 1999 o Comitê de Nutrição da Academia Americana de Pediatria considera o risco teórico de suplementar o LM com fórmulas fortificadas com ferro. O Comitê alertou, nesta data, que a adição de ferro pode saturar a ação da lactoferrina, que protege o crescimento intestinal de *Escherichia coli*. O Comitê concluiu, porém, que os estudos não mostraram que a maior prevalência de *Escherichia coli* estava associada ao maior risco de diarreia e, como o risco de anemia é inaceitável, defendiam o uso dessas fórmulas suplementadas (American Academy of Pediatrics, 1999).

A disponibilidade de ferro no LM é muito inferior à quantidade de lactoferrina, o que faz com que somente uma pequena fração da lactoferrina seja ligada ao ferro do LM. Contudo, a adição de ferro exógeno, entretanto, pode alterar esta proporção e reduzir a disponibilidade de lactoferrina para atuação bacteriostática, o que poderia aumentar os riscos de infecção nos RN (Chan, 2003; Bathia, 2007; Lonnerdal *et al.*, 2011).

2.5 Microbiota Intestinal

Ao nascimento os RN são estéreis, sem flora microbiana, e consequentemente expostos ao risco de infecção pelo desenvolvimento insuficiente dos mecanismos de defesa. Após o nascimento, as bactérias da mãe e do meio ambiente os colonizam. O RN desenvolve população heterogênea de bactérias no trato gastrointestinal, sob a influência de fatores relacionados ao hospedeiro, às bactérias e a outros fatores externos, como alimentação, tipo de parto, uso de medicamentos, a e contaminação

ambiental (Brandt et al., 2006; Salminen e Isolauri, 2008; Bezirtzoglou e Stavropoulou, 2011; Veereman-Wauters et al., 2012).

As crianças nascidas de parto vaginal amamentadas ou alimentadas com fórmula têm o mesmo padrão de colonização bacteriana nas primeiras 48 horas de vida. No entanto, no sétimo dia a microbiota intestinal já começa a ser definida, e durante as primeiras semanas de vida as crianças em amamentação exclusiva desenvolvem microbiota intestinal ideal devido ao colostro e ao LM, ricos em como fatores bifidogênicos, oligossacarídeos e substâncias bioativas (Manzoni et al., 2011; American Academy of Pediatrics, 2012; Veereman-Wauters et al., 2012).

A microbiota intestinal constitui um ecossistema complexo envolvido em funções fisiológicas essenciais para a vida. Os microrganismos benéficos regulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios e carboidratos, com influencia no fornecimento de nutrientes. São também estímulo fundamental para a proliferação e diferenciação das células intestinais e maturação adequada do sistema imune, o que contribui para reduzir as infecções e respostas imunes anormais. A colonização microbiana do intestino do RN reduz a susceptibilidade a infecções, a hipersensibilização a antígenos e a obesidade (Sanz, 2011; Turróni et al., 2011; Grzeskowiak et al., 2012).

A qualidade da colonização inicial do intestino pode ter papel importante no processo de seleção entre os diferentes gêneros de bactérias. Há fatores intervenientes do hospedeiro que selecionam a microflora bacteriana intestinal desde a sua instalação. O desenvolvimento da microflora intestinal nos RN está estreitamente relacionado ao tipo de alimentação (Brandt et al., 2006; Veereman-Wauters et al., 2012).

Crianças exclusivamente amamentadas apresentam flora intestinal adequada, com maior quantidade de bifidobactérias e lactobacillus e menos *Clostridium difficile* e *Escherichia coli*. Há décadas existem registros de diferenças na composição da microflora intestinal de crianças amamentadas em comparação a crianças desmamadas (Brandt et al., 2006; Toma e Rea, 2008; Vael e Desager, 2009; Hascoet et al., 2012; Veereman-Wauters et al., 2012).

As bifidobactérias são os componentes principais da microbiota intestinal das crianças amamentadas até a iniciação do consumo de alimentos sólidos. Nessas crianças, de 60-70% da microbiota é composta por bifidobactérias, e as espécies mais predominantes são: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium breve*. As bifidobactérias somadas aos lactobacilos representam 90% da constituição da microbiota intestinal dos lactentes amamentados, enquanto nos que recebem aleitamento artificial essas bactérias correspondem de 40 a 60% da microbiota (Grzeskowiak et al., 2012; Veereman-Wauters et al., 2012).

As bifidobactérias e os lactobacilos atuam em diferentes níveis ao mesmo tempo no intestino, e podem prevenir a colonização de patógenos pela competição na adesão às células intestinais, bem como interagir com a mucosa intestinal, promovendo atividade imunomoduladora, e promoverem a motilidade intestinal (Manzoni, 2011). A microbiota composta por menor quantidade de bactérias anaeróbicas pode inibir a maturação normal do sistema imune intestinal, com menor produção de citocinas anti-inflamatórias (Vael e Desager, 2009).

Os microrganismos benéficos aumentam a atividade das células NK, linfócitos T e macrófagos, como também promovem a produção de imunoglobulinas (Artym e Zimecki, 2005; Veereman-Wauters et al., 2012). O GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*) é considerado o maior órgão imune; em estudos experimentais ratos *germ-free*, com pouco desenvolvimento do GALT, apresentaram número reduzido de imunoglobulinas e linfócitos B e T (Vael e Desager, 2009; Bezirtzoglou e Stavropoulou, 2011).

A composição da microflora não se altera significativamente após a infância. O sistema de defesa da mucosa intestinal é parte integrante de rede sofisticada de auto-regulação que inclui a flora intestinal. O reconhecimento de antígenos e não-antígenos começa no início da vida, possivelmente ainda no período intrauterino, e é significativamente influenciado por eventos que ocorrem no sistema digestivo logo após o nascimento (American Academy of Pediatrics, 2012; Veereman-Wauters et al., 2012).

O contato com prebióticos e probióticos logo após o nascimento modula a composição da microbiota e pode ser utilizado como estratégia para reduzir risco de diversas doenças. As bactérias são transmitidas da mãe para o RN por meio do contato direto com a microbiota materna durante o parto e do fornecimento de bactérias presentes no LM durante a lactação. A oferta de probióticos no período perinatal e na lactação favorece a colonização do intestino do RN com bactérias potencialmente benéficas. O contato com a pele da mãe durante o aleitamento materno também parece ser importante pelo contato com bactérias (Salminen e Isolauri, 2008; Sanz, 2011).

O LM contém prebióticos, na forma de oligossacarídeos, e probióticos (10^3 de bifidobactérias por ml de LM). Os prebióticos não são digeridos pelos humanos, e sua presença no sistema digestivo aumenta seletivamente a proliferação de bactérias probióticas no cólon, especialmente espécies de bifidobactérias, que conseguem digerir os oligossacarídeos. O LM contém em torno de 10- 14 g/L de oligossacarídeos (Bezirtzoglou e Stavropoulou, 2011; Turróni et al., 2011; Veereman-Wauters et al., 2012).

Os mecanismos responsáveis pelas diferenças encontradas na flora dos RN que recebem LM incluem a grande quantidade de lactose e a baixa quantidade de caseína do LM e, principalmente, os fatores imunológicos, como a IgA secretora, a lisozima, a lactoferrina e os nucleotídeos, que inibem o desenvolvimento da flora patogênica. O baixo pH intestinal das crianças amamentadas também favorece o crescimento das bifidobactérias, que são mais tolerantes ao meio ácido (Brandt et al., 2006; Salminen e Isolauri, 2008; Bezirtzoglou e Stavropoulou, 2011; Maga et al., 2012).

A lactoferrina afeta a colonização intestinal por modular a homeostase do ferro, que é importante para o predomínio das bifidobactérias. A baixa concentração de ferro no LM, sua alta biodisponibilidade e a absorção favorecida pela lactoferrina resultam em pouco ferro na luz intestinal para as bactérias. Em contraste com outras bactérias, as bifidobactérias não necessitam do ferro para proliferar, o que faz com a lactoferrina não impeça o crescimento destas (Penna e Nicoli, 2001; Artym e Zimecki, 2005; Brandt et al., 2006; Hanson, 2007; Cernat e Scott, 2012).

Os RN pré-termo em UTI neonatal apresentam maior risco de desenvolver doenças intestinais devido à proliferação de microbiota intestinal patogênica, pelo tratamento com antibióticos, uso de nutrição parenteral e incubadoras que atrasam a colonização intestinal. A lactoferrina é fundamental para esse grupo de neonatos, para promover flora predominante de bactérias comensais benéficas, como as bifidobactérias e os lactobacilos (Cernat e Scott, 2012).

A lactoferrina parece promover o crescimento de bifidobactérias por outros mecanismos além da quelação do ferro. Estudo *in vitro* não demonstrou diferença no crescimento de algumas cepas de bifidobactérias dependendo da saturação da lactoferrina, entretanto esses dados não foram conclusivos (Petschow et al., 1999; Hanson, 2007).

A colonização precoce com microbiota adequada, assim como sua manutenção, parecem ser fatores determinantes para a formação de barreira intestinal adequada para a prevenção de diversas doenças. A microbiota intestinal é parte fundamental na proteção de RN contra a invasão de microrganismos patogênicos, e alterações na dieta dos RN podem alterar esta microbiota, aumentando o risco de infecções (Bezirtzoglou e Stavropoulou, 2011; Veereman-Wauters et al., 2012).

2.6 Microrganismos Patogênicos

As doenças infecciosas representam a principal causa de mortalidade entre crianças (68%), resultando em 5,9 milhões de óbitos por ano em todo mundo. Para os RN pré-termo, a sepse também lidera como uma das principais causas de mortalidade (Ochoa et al., 2012).

A habilidade dos microrganismos patogênicos de sobreviverem e se proliferarem no trato gastrointestinal depende de fatores relacionados com a flora do hospedeiro. A dieta do hospedeiro parece ser determinante, pois além do impacto nutricional, a dieta também modula a flora intestinal. Alguns componentes da dieta podem inibir diretamente o crescimento de bactérias patogênicas pela atividade inibitória de alguns componentes, ou indiretamente por beneficiar o crescimento de bactérias não patogênicas

(Petschow, 1999; Bezirtzoglou e Stavropoulou, 2011; Veereman-Wauters et al., 2012).

Um grande número de bactérias patogênicas podem predispor sepse precoce e tardia em UTI neonatal. Estudo mostrou que para o RN a termo, a principal causa de sepse foi *Staphylococcus* (2,4/1000) e em seguida *B Streptococcus* (1,9/1000). Para os RN pré-termo, *Staphylococcus* (2,5/1000) e *Escherichia coli* (2,6/1000) foram as bactérias mais causadoras de sepse (Sgro, 2011).

A lactoferrina protege as crianças amamentadas contra o crescimento de *Escherichia coli* direta e indiretamente, mas a adição de ferro pode saturar a ação da lactoferrina e prejudicar esta proteção. Crianças que recebem fórmulas enriquecidas com ferro, amamentadas com suplementação de ferro ou crianças amamentadas que recebem também fórmula suplementada com ferro apresentam maior prevalência de *Escherichia coli* na flora fecal quando comparadas às crianças em LM exclusivo sem suplementação (American Academy of Pediatrics, 1999; Brock, 2012).

Escherichia coli é uma das principais bactéria Gram negativa causadora de sepse neonatal (Muhammad et al., 2010; Cohen-Wolkowicz et al., 2011; Chagas de Freitas et al., 2012). É também o microrganismo mais relacionado com a diarreia aguda em RN prematuros – *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC). A *Escherichia coli* é frequentemente encontrada na flora, e desde que em quantidades pequenas, pode ser considerada comensal, mas em quantidades maiores produz toxinas que lesam as células. Grande parte das meningites em RN são causadas por essa bactéria (Brandão et al., 2005).

O *Staphylococcus aureus* está entre os patógenos hospitalares mais importantes em pacientes de UTI neonatal, principalmente em infecções da corrente sanguínea. Está entre as principais bactérias Gram positivas relacionadas com sepse neonatal (Muhammad et al., 2010; Cohen-Wolkowicz et al., 2011). A infecção secundária do mamilo lesionado é bastante comum, e o microrganismo responsável é, sobretudo, o *Staphylococcus aureus*. Um estudo demonstrou que 54% das mães com

crianças menores de 1 mês, com mamilos fissurados e com dor moderada a grave tinham cultura positiva para esta bactéria Gram positiva no mamilo (Giugliane, 2004).

A *Pseudomonas aeruginosa* também é uma bactéria gram-negativa de grande destaque; é considerada oportunista por se estabelecer em indivíduos doentes, gerando quadro de infecção. Essa característica, associada à sua resistência a antibióticos, a torna importante causa de infecção hospitalar.

Estudo realizado em UTI neonatal no Brasil para listar agentes causadores de sepse em RN mostrou que dos 15038 RN internados, 1704 (11,3%) foram diagnosticados com sepse neonatal precoce ou tardia. Destes, 39,2% apresentavam peso entre 1501 e 2500g. O agente etiológico mais prevalente em todos os pacientes diagnosticados com sepse neonatal foi *Pseudomonas aeruginosa* (4,2%), já o agente mais prevalente na sepse tardia, neste mesmo, estudo foi *Escherichia coli* (7,4%). A taxa de letalidade média encontrada foi de 53,3/100 pacientes com sepse neonatal (Silva et al., 2009). Chagas de Freitas (2012) também apontou a *Escherichia coli* como agente etiológico mais associado à sepse tardia em RN pré-termo.

Estudo mostrou capacidade bactericida do LM contra o crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismos responsáveis por grande parte das infecções em RN, sendo que a indicação da utilização do LM para a prevenção de infecções causadas por essas bactérias, em especial para RN prematuros, se torna evidente (Ovali, 2006).

Para que o LM mantenha este papel protetor, entretanto, é importante que seus fatores imunológicos se mantenham preservados.

3 OBJETIVO

Comparar o crescimento bacteriano de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa in vitro* no leite humano puro e no leite materno com aditivo acrescido de ferro, coletado até o sétimo dia pós parto.

4 MÉTODOS

Trata-se de estudo prospectivo de uma série de casos, realizado no Hospital e Maternidade Angelina Caron, em Campina Grande do Sul, região metropolitana de Curitiba.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Pesquisa e Ética do Hospital Angelina Caron e pela Comissão de Pesquisa e Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq/FMUSP) número 1094/09. Todas as doadoras participantes assinaram o termo de consentimento esclarecido.

As pacientes foram abordadas pela pesquisadora executante, acompanhada pelos médicos-residentes do Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do próprio hospital, na oportunidade das consultas pós-parto.

Critérios de inclusão:

- pacientes brancas, internadas no Hospital Angelina Caron após parto normal de RN a termo, com menos de 7 dias pós-parto.

Critérios de exclusão:

- parto cesariano;
- nutrízes em uso de antibióticos e/ou com complicações no pós-parto;
- fumantes;
- nutrízes com suspeita de doenças infecciosas.

4.1 Coleta de amostras

A coleta do LM foi realizada no Hospital Angelina Caron. Foram coletados os primeiros 10 ml do leite de mães de RN de termo, para obtenção do leite de início. A coleta aconteceu em até 7 dias após o parto, colostro segundo a ANVISA (2009). O período de coleta foi de agosto de 2010 a março de 2011.

As participantes foram orientadas verbalmente quanto à antissepsia das mãos e condutas de higiene para coleta, bem como orientações que facilitaram o esgotamento. A ordenha foi realizada manualmente ou com

bomba de sucção manual Lillo®, de acordo com a preferência da mãe. As mães que optaram pelo uso de bomba de sucção receberam a bomba esterilizada com óxido de etileno, contendo frasco graduado e tubo de polipropileno e êmbolo de látex.

As participantes eram orientadas verbalmente da seguinte maneira:

Instruções para ordenha manual:

- Lavar as mãos e antebraços com água corrente e sabão até os cotovelos; as unhas devem estar limpas e de preferência curtas;
- Prender obrigatoriamente os cabelos com gorro, touca de banho ou pano amarrado e proteger a boca e narinas com máscara;
- Caso a lavagem das mamas seja realizada, utilizar apenas água;
- Evitar conversas durante a ordenha;
- Usar luvas se a ordenha não for feita pela própria nutriz;
- Procurar posição confortável e manter os ombros relaxados;
- Apoiar a mama com uma das mãos e com a outra posicionar os dedos indicador e médio na região areolar e iniciar massagens circulares até chegar à base da mama, próxima às costelas;
- Inclinar-se levemente para frente, para iniciar a retirada do leite;
- Colocar o dedo polegar no limite superior da aréola e o indicador no limite inferior, pressionando a mama em direção ao tórax;
- Aproximar a ponta dos dedos polegar e indicador, pressionando de modo intermitente os reservatórios de leite
- Desprezar os primeiros jatos de leite (0,5 a 1 ml);
- Durante a ordenha, evitar puxar ou comprimir o mamilo, fazer movimentos de deslizar ou de esfregar a mama, para não lesar a pele e o tecido mamário;

(Adaptado de ANVISA, 2007)

Instruções para uso da bomba de sucção manual:

- Abrir a embalagem entregue pela pesquisadora com a bomba esterilizada;
- Inserir o tubo com o êmbolo de látex no frasco mais longo, até o fim;
- Apoiar e pressionar a bomba contra a mama, encaixando o bico no centro do tubo;
- Puxar o frasco lentamente para fora, o que provoca a saída do leite;
- Observar a marcação de 10ml no frasco.

(Adaptado de LILLO®, 2011)

As amostras foram coletadas em vidros esterilizados e fechados com tampas de borracha, igualmente esterilizadas. Para as mães que utilizaram bomba de sucção manual o LM foi armazenado no frasco acoplado à bomba, fechado com tampa de polipropileno. No laboratório o leite foi transferido para o frasco padrão para ser armazenado. Os frascos foram identificados com etiqueta contendo número da amostra, data e horário de coleta.

A pesquisadora executante, acompanhada dos médicos-residentes, se responsabilizou pelo esclarecimento da pesquisa, coleta da amostra, solicitação do preenchimento do termo de consentimento esclarecido e ficha de coleta de dados, contendo as seguintes informações:

- idade da mãe
- peso pré-gestacional

As amostras foram armazenadas e analisadas no Laboratório de Microbiologia do Hospital Angelina Caron, sendo armazenadas sob refrigeração (entre 4 e 6° C), e analisadas em até 72 horas após a coleta.

O aditivo foi acrescentado nas amostras de LM somente no momento da análise, e a quantidade acrescida foi de 5%, conforme indicação de uso do fabricante. O aditivo de LM foi fracionado nas quantidades exatas, pesadas em balança analítica de precisão (Metler®), e armazenado em frascos esterilizados.

4.2 Prova de Esterilidade

As amostras foram avaliadas conforme a metodologia proposta por Almeida & Novak (1995).

As amostras foram semeadas em caldo de tioglicolato e em caldo de tripticaseína de soja, conforme a seguinte metodologia:

- Selecionar o material a ser utilizado;
- Realizar higienização prévia das bancadas;
- Utilizar os procedimentos de precaução universais (gorro, máscara, óculos e luvas de procedimento);
- Coletar 0,4 ml de LM com pipeta automática Gilson® e ponteiros esterilizados e semear em 10 ml de caldo de tioglicolato;
- Coletar 0,4 ml de LM com pipeta automática Gilson® e ponteiros esterilizados e semear em 10 ml de caldo de tripticaseína de soja;
- Incubar o meio de cultura em estufa microbiológica, à temperatura de 36,5°C, durante 48 horas;
- Proceder à leitura das análises após 24 e 48 horas.

4.3 Avaliação qualitativa da capacidade bactericida

As amostras foram avaliadas conforme a metodologia proposta pela Isenberg (1998) e por Chan (2003).

4.3.1 Materiais:

- Discos de papel filtro com 12 mm de diâmetro esterilizados;
- Placas de Petri esterilizadas;
- Preparo dos discos de papel filtro esterilizados por autoclavação;
- Cepas das seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, obtidas de isolamentos clínicos do próprio hospital Angelina Caron, sob cultivo de 18 a 24 horas em agar BHI;
- Ágar de cérebro e coração – Ágar BHI (Brain Heart Infusion Broth – BHI Merck artigo 1.10493.0500) em placas;
- Pipetas automáticas Gilson® de 1000µl com ponteiros esterilizados;
- Frascos de vidro com tampas de silicone esterilizados;
- Frascos com solução fisiológica esterilizados;

- Escala de Mac-Farland;
- Estufa bacteriológica a 37°C.

Figura1 - materiais utilizados para o teste de avaliação da capacidade bactericida do LM

Legenda:

A= amostras identificadas, **B=** cepas das bactérias ressuspendidas a 10^1 UFC/ml (unidades formadoras de colônias/ml), **C=** discos de papel filtro esterilizados, **D=** placas de Petri com agar BHI semeadas e marcadas para a disposição dos discos, **E=** placas de Petri com agar BHI semeadas com as amostras e com os discos embebidos nas amostras, **F=** aspecto geral da execução do experimento em fluxo laminar.

4.3.2 Preparação das cepas de bactérias:

- Para cada uma das cepas a serem utilizadas, prepararam-se cultivos a 37°C na placa de ágar BHI;
- Selecionou-se uma colônia e ressuspendeu-se em solução fisiológica;
- Diluiu-se até a concentração desejada (10^1 UFC/ml) frente ao tubo padrão da escala de Mac-Farland.

Para cada uma das amostras de leite foram separados dois frascos esterilizados com 5ml de leite, identificados com o número da amostra, seguido das identificações N (normal) e FM (aditivado), no qual foi adicionado 0,25g do aditivo FM85® (Nestlé), conforme demonstrado na figura 3.

4.3.3 Teste qualitativo com LM puro

- Prepararam-se para cada cepa de bactéria, duas placas de Petri contendo Agar BHI e, individualmente, semeou-se com 10^1 UFC/ml de cada cepa, devidamente identificadas com a cepa, número da amostra e a identificação da mãe;
- Imergiram-se os discos de papel filtro esterilizados nas amostras de LM;
- Colocaram-se os discos umedecidos com LM nas placas de Petri conforme esquema da figura 1;
- Incubou-se por 48 horas para depois medir os halos de inibição.
- Em cada placa de Petri foram colocados 4 discos de papel filtro, em locais determinados segundo modelo padrão, respeitando-se a mesma distância em toda amostra.

4.3.4 Teste qualitativo com LM aditivado

- Para esta amostra foram pesados em balança de precisão 0,25g do aditivo FM 85® em frascos esterilizados, mantendo-se a proporção de 1g de FM 85® para cada 20 ml de leite (figura 2);

Figura 2 - Demonstrativo das alíquotas do aditivo FM85®

- Prepararam-se, para cada cepa de bactéria, duas placas de Petri contendo Agar BHI e individualmente semeou-se com 10^1 UFC/ml de cada cepa, devidamente identificadas com a cepa, número da amostra e a identificação do grupo FM (com aditivo de LM);
- Imergiram-se os discos de papel filtro esterilizados nas amostras de LM com aditivo;
- Colocaram-se os discos umedecidos com LM nas placas de Petri conforme esquema da figura 3;
- Incubou-se por 48 horas e mediram-se os halos de inibição;
- Em cada placa de Petri foram colocados 4 discos, em locais determinados segundo modelo padrão, respeitando-se a mesma distância em toda amostra.

Figura 3 - Diagrama ilustrativo da metodologia para avaliação da capacidade bactericida do LM puro e aditivado

Observação: para o teste com leite aditivado 0,25g do aditivo FM85® era acrescentado na amostra de 5ml de leite

4.4 Avaliação quantitativa da capacidade bactericida

Para o estudo quantitativo da capacidade bactericida as amostras foram avaliadas conforme a metodologia proposta por Hernandez et al. (1979).

4.4.1 Materiais

- Foram utilizadas as cepas das seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, obtidas de isolamentos clínicos do próprio hospital Angelina Caron, sob cultivo de 18 a 24 horas em ágar BHI;
- Infusão de cérebro e coração – Caldo BHI (Brain Heart Infusion – BHI Difco código 0037-17/237500) em tubos;
- Pipetas automáticas Gilson® de 1000µl, com ponteiros esterilizados;
- Frascos de vidro com tampas de silicone esterilizados;
- Frascos com solução fisiológica esterilizados;
- Escala de Mac-Farland;

- Estufa bacteriológica a 37°C.

4.4.2 Preparação das cepas de bactérias

- Para cada uma das cepas a ser utilizada, prepararam-se cultivos a 37°C em placa de ágar BHI;
- Selecionou-se uma colônia e ressuspendeu-se em solução fisiológica;
- Diluiu-se até a concentração desejada (10^7 UFC/ml) frente ao tubo padrão da escala de Mac-Farland.

Foram utilizadas alíquotas das mesmas amostras de LM da avaliação qualitativa, separadas em frascos esterilizados com 5ml de leite LM e identificados com o número da amostra, seguido das identificações N (normal) e FM (aditivado), contendo 0,25g do aditivo FM85®, conforme demonstrado na figura 4.

4.4.3 Teste quantitativo com LM puro

- Preparou-se para cada cepa de bactéria um tubo contendo 10^7 UFC/ml em solução fisiológica de cada cepa, devidamente identificadas com a cepa, número da amostra e a letra N;
- Colocou-se 1ml de cada suspensão de bactéria em 1 ml de LM que foram homogeneizados em agitador magnético;
- Pipetou-se 1ml da mistura anterior e semeou-se em placas de Petri com ágar BHI e incubou-se a 37°C por 24 horas;
- Após o período de incubação o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi contado.

4.4.4 Teste quantitativo com LM aditivado

- Preparou-se para cada cepa de bactéria um tubo contendo 10^7 UFC/ml em solução fisiológica de cada cepa, devidamente identificada com a cepa, número da amostra e a identificação do grupo FM (com aditivo de LM);
- Colocou-se 1ml de cada suspensão de bactéria em 1 ml de LM aditivado, conforme descrito na metodologia anterior (4.3.4), que foram homogeneizados em agitador magnético;

- Pipetou-se 1ml da mistura anterior e semeou-se em placas de Petri com ágar BHI, incubado a 37°C por 24 horas;
- Após o período de incubação, o número de unidades formadoras de (UFC) foi contado.

Figura 4 - diagrama ilustrativo da metodologia para determinar a capacidade de inibição de crescimento bacteriano do LM e LM aditivado

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

4.5 Cálculo Amostral

O tamanho da amostra foi determinado pelo programa SIGMA, aceitando um erro de 5% e variação do crescimento bacteriano de 10%, o qual determinou um n de no mínimo 40 amostras.

4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias e desvios padrões (variáveis quantitativas) ou por frequências e percentuais (variáveis qualitativas). Para comparação do LM puro com o LM com aditivo FM85® em relação ao número de bactérias, foi considerado o teste t de Student para amostras pareadas. Para a avaliação da correlação entre os dois tipos de leite foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson. Esse mesmo coeficiente foi estimado para avaliar a correlação entre o número de bactérias e as variáveis idade e peso. Valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

4.7 Custos

Todo o material utilizado na pesquisa foi fornecido pelo Hospital Angelina Caron, situado na região metropolitana de Curitiba. Os demais custos do projeto foram de responsabilidade da autora do trabalho. O custo do aditivo foi absorvido pela autora do trabalho, visto que a pesquisa foi livre de qualquer vínculo com empresas comerciais. Não há, portanto, qualquer conflito de interesse entre a pesquisa e o fabricante ou empresas concorrentes. A pesquisadora recebeu bolsa de apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior), o que possibilitou o afastamento parcial de suas atividades profissionais para execução desta pesquisa.

5 RESULTADOS

Foram coletadas 78 amostras de LM. Apenas três mães se recusaram a doar leite, e os motivos alegados foram dor no momento da coleta de leite em dois casos e uma mãe referiu: "razões pessoais".

A idade média das participantes foi de $25,2 \pm 6,6$ anos e a média de peso pré-gestacional foi de $60,6 \pm 10,1$ kg.

A prova de esterilidade comprovou que nenhuma amostra estava contaminada.

5.1 Avaliação qualitativa da capacidade bactericida

A análise qualitativa mostrou que em todas as amostras, tanto com LM puro como com LM+FM85® houve crescimento bacteriano semelhante. Não foi possível observar halo de inibição de crescimento bacteriano próximo aos confetes contendo as amostras de LM puro ou aditivado em nenhum caso.

5.2 Avaliação quantitativa da capacidade bactericida

A avaliação quantitativa mostrou média de crescimento bacteriano para *Escherichia coli* no grupo controle de $29,4 \pm 9,7 \times 10^6$ UFC/ ml e $31,2 \pm 10,8 \times 10^6$ UFC/ml para o grupo aditivado. A diferença entre a média de crescimento no LM puro e aditivado foi de $1,9 \pm 4,9 \times 10^6$ UFC/ml ($p=0,001$) (Tabela 1 e Gráfico 1).

Para *Staphylococcus aureus* o grupo controle obteve média de $43 \pm 11,6 \times 10^6$ UFC/ml e o grupo aditivado média de $43,2 \pm 12,6 \times 10^6$ UFC/ml. A diferença da média entre os dois grupos foi de $0,3 \pm 4,5 \times 10^6$ UFC/ml ($p=0,614$) (Tabela 1 e Gráfico 2).

A média do grupo controle com *Pseudomonas aeruginosa* foi de $51,1 \pm 12,1 \times 10^6$ UFC/ml e a do grupo aditivado foi de $51,5 \pm 12 \times 10^6$ UFC/ml. A diferença da média entre as amostras dos dois grupos foi de $0,4 \pm 3 \times 10^6$ UFC/ml ($p=0,285$) (Tabela 1 e Gráfico 3).

Tabela 1 - Crescimento bacteriano no LM puro e no LM com aditivo FM85®

Variável	Tipo	Número de bactérias ($\times 10^6$)/ml		
		n	M $\pm$ DP	Valor de p*
EC	C	78	29,4 $\pm$ 9,7	
	FM85	78	31,2 $\pm$ 10,8	
	dif (FM85-C)	78	1,9 $\pm$ 4,9	0,001
SA	C	78	43,0 $\pm$ 11,6	
	FM85	78	43,2 $\pm$ 12,6	
	dif (FM85-C)	78	0,3 $\pm$ 4,5	0,614
PA	C	78	51,1 $\pm$ 12,1	
	FM85	78	51,5 $\pm$ 12,0	
	dif (FM85-C)	78	0,4 $\pm$ 3,0	0,285

M $\pm$ DM: Média $\pm$ Desvio Padrão

EC: *Escherichia coli*; SA: *Staphylococcus aureus*; PA: *Pseudomonas aeruginosa*

C: Grupo controle (LM puro); FM85: Grupo de LM + aditivo FM85; dif (FM85-C): diferença de crescimento entre o grupo controle e o grupo FM85.

Gráfico 1 - Crescimento de *Escherichia coli* no LM puro e no LM com aditivo FM85®

CEC: Crescimento bacteriano de *Escherichia coli* no grupo controle (LM puro)

FM85 EC: Crescimento bacteriano de *Escherichia coli* no grupo FM 85 (LM + FM85)
($p=0,001$)

Gráfico 2 - Crescimento de *Staphylococcus aureus* no LM puro e no LM com aditivo FM85®

CSA: Crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* no grupo controle (LM puro)

FM85 SA: Crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* no grupo FM 85 (LM + FM85)

(p=0,614)

Gráfico 3 - Crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* no LM puro e no LM com aditivo FM85®

CPA: Crescimento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* no grupo controle (LM puro)

FM85 SA: Crescimento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* no grupo FM 85 (LM + FM85)

(p=0,285)

Não houve correlação entre as variáveis peso e idade das mães com o crescimento bacteriano (coeficiente de correlação para todas as cepas foi de $p > 0,05$).

Para cada bactéria estimou-se o coeficiente de correlação entre o número de bactérias no LM puro e o número de bactérias no LM+FM85®. O coeficiente de correlação entre *Escherichia coli* controle e *Escherichia coli* + FM85® foi de 0,89 ($p < 0,001$); entre *Staphylococcus aureus* controle e *Staphylococcus aureus* + FM85® foi de 0,93 ($p < 0,001$) e entre *Pseudomonas aeruginosa* controle e *Pseudomonas aeruginosa* + FM85® de 0,97 ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Coeficiente de correlação entre o número de bactérias no LM puro e o número de bactérias no LM com aditivo FM85®

	Coeficiente de correlação	Valor de p
EC C x EC FM85	0,89	<0,001
SA C x SA FM85	0,94	<0,001
PA C x PA FM85	0,97	<0,001

ES FM85: Crescimento bacteriano de *Escherichia coli* no grupo FM 85 (LM + FM85)

ECC: Crescimento bacteriano de *Escherichia coli* no grupo controle (LM puro)

SA FM85: Crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* no grupo FM 85 (LM + FM85)

SAC: Crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* no grupo controle (LM puro)

PA FM85: Crescimento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* no grupo FM 85 (LM + FM85)

PAC: Crescimento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* no grupo controle (LM puro)

6 DISCUSSÃO

As mães foram abordadas nas consultas pós-parto, em até dois dias após o parto. Em três ocasiões não houve possibilidade de coleta de amostras por recusa das mães.

Em nenhuma amostra houve crescimento bacteriano ou fúngico, tanto na coleta quanto no armazenamento, o que valida a metodologia aplicada.

A variável peso materno pré-gestacional não mostrou correlação com crescimento bacteriano. O peso foi o único parâmetro nutricional avaliado neste estudo.

Collado et al (2012) correlacionaram o potencial imunomodulatório do LM com o peso materno e com excesso de ganho de peso na gestação e mostrou menores níveis de TGF-B2 e CD14 no LM de mães com sobrepeso quando comparadas às mães eutróficas. O peso materno parece influenciar também a microbiota dos RN, com níveis menores de *Staphylococcus* e outras bactérias patogênicas nos RN que recebem LM de mães eutróficas e com ganho de peso adequado durante a gestação, além de níveis maiores de Bifidobactérias (Collado et al., 2010; Collado et al., 2012).

Estudos anteriores não encontraram relação entre ferro e lactoferrina no LM com relação aos valores de hemoglobina e ferro das mães (Shashiraj, 2006; Shashi, 2008). Por outro lado, outros estudos correlacionaram o estado nutricional das mães com a composição do LM (Miranda et al., 1983; Chang, 1990; Mello-Neto et al., 2010; Correia-Santos et al., 2011; Makela et al., 2012; Neville et al., 2012;).

Rompeu-se portanto, recentemente, o conceito de que deficiências nutricionais são raras em RN amamentados, pela inquestionável qualidade do LM. A influencia do peso e ganho de peso na gestação e dos níveis de micronutrientes maternos interfere na qualidade de macro e micronutrientes do LM (Allen, 2005; Chapman e Nommsen-Rivers, 2012).

A idade das mães (25,2±6,6 anos) mostrou que a população do estudo foi composta por mães adultas, o que possivelmente fez com este parâmetro não fosse correlacionado com o crescimento bacteriano. O LM de mães adolescentes pode apresentar deficiência de nutrientes, devido ao

período de rápido crescimento das mães durante esta fase da vida (Rogol et al., 2000; Hall Moran, 2007; Hall Moran et al.; 2010).

A análise qualitativa utilizada não foi capaz de demonstrar o efeito bactericida do leite, pois não houve formação de halo de inibição de crescimento bacteriano, se contrapondo aos resultados de Chan (2003) e Chan et al (2007).

Chan encontrou, em seus estudos, inibição do crescimento bacteriano no LM puro e no LM com aditivo sem adição de ferro – Similac Human Milk Fortifier, Abbott (Illinois, EUA) – contendo 0,4mg de ferro em 100ml de LM aditivado na proporção indicada pelo fabricante (2003); ou com aditivo de LM Prolact +4, Prolacta Bioscience (Califórnia, EUA), que contém 0,2mg de ferro para 100ml de LM aditivado na proporção indicada pelo fabricante (2007). Entretanto, Chan encontrou redução da capacidade bacteriostática quando o LM foi suplementado com aditivo de LM acrescido de ferro – Enfamil® Human Milk Fortifier, Mead Johnson (Evansville, EUA), contendo 1,5mg de ferro para 100ml de LM na proporção indicada pelo fabricante (2003 e 2007).

Santiago et al (2005) compararam o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em LM adicionado com os mesmos aditivos de LM utilizados por Chan e chegaram a resultados opostos. Os autores realizaram contagem total de colônias bacterianas nas amostras congeladas nos tempos 0, 24 e 72 horas com e sem aditivo e encontraram redução semelhante em ambos os grupos. O estudo objetivou comprovar que a adição de aditivo de leite humano não interfere na atividade bactericida das amostra de leite armazenadas. Os autores concluíram que mesmo que o aditivo comprometa a ação bactericida, as atividade do LM compensam esta possível interferência, e que a utilização de aditivo de LM com ferro para otimizar o suporte nutricional é uma prática segura. Vale ressaltar que no Brasil, o protocolo da maioria das UTI neonatais preconiza o acréscimo do aditivo no momento da administração do leite humano.

Yuen et al (2012) analisaram 25 amostras de colostro e 11 amostras de LM maduro após refrigeração a 4° C e a -20° C e concluíram que os fatores nutricionais e imunológicos foram amplamente preservados após 3 dias de refrigeração. Estes estudos validam a metodologia de armazenamento

aplicada nesta presente pesquisa.

Ovali et al (2006), entretanto, compararam a capacidade bactericida no LM puro, LM com aditivo sem adição de ferro (Eoprotin – Nutricia, The Netherlands), e LM + sulfato ferroso (0,38mg em 30ml de LM), utilizando a mesma metodologia proposta por Chan, com cepas de bactérias de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, similar ao presente estudo. Os autores concluíram que a adição de sulfato ferroso nesta concentração inibiu a capacidade bactericida em todas as cepas de bactérias, ao contrário do presente estudo, no qual apenas o crescimento de *Escherichia coli* apresentou diferença.

É importante destacar que nos estudos referidos foram utilizadas amostras de colostro de mães de RN pré-termo, ao contrário deste estudo. Sabe-se que o LM de mães de RN pré-termo tem maiores teores de lactoferrina. A incidência de partos de RN pré-termo no Hospital Maternidade onde o estudo foi realizado é pequena, o que dificultaria a coleta do n amostral calculado dentro do prazo. Por isso optou-se por utilizar amostras de LM de mães de RN de termo.

Vale ressaltar, também, que em nenhum dos estudos prévios, os autores analisaram o crescimento bacteriano com FM85®, aditivo utilizado no Brasil, que contém 0,29mg de ferro para 100ml de LM (proporção indicada pelo fabricante). Também é importante considerar que nos estudos de Chan as bactérias analisadas foram, além de *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Enterobacter sakazakii* e *Streptococcus* do Grupo B.

Ao analisar o crescimento quantitativo de *Escherichia coli*, este se mostrou maior no LM com aditivo suplementado com ferro, assim como nos estudos de Chan. As demais bactérias avaliadas no presente estudo, nas quais o aditivo de LM não influenciou o crescimento quantitativo, não foram analisadas por esse autor em seus trabalhos. As cepas de bactérias utilizadas neste trabalho foram selecionadas por serem as mais frequentes reportadas pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do hospital onde o estudo foi realizado.

As amostras de LM foram coletadas em populações distintas em todos os trabalhos citados. Lien (2004) avaliou a quantidade de lactoferrina

no LM de mães de 9 países e encontrou níveis que variavam de 1,37 a 2,12g/L entre os diferentes países. Sashi (2008) também relatou diferença no teor de lactoferrina dependendo da etnia e raça das mães. Diferenças na quantidade de lactoferrina das amostras podem ter interferido nos resultados, entretanto em nenhum desses estudos a quantidade de lactoferrina das amostras foi dosada, assim como no presente trabalho.

Nós decidimos coletar colostro, similar aos demais estudos, pela maior concentração de lactoferrina, e também para padronizar a concentração de lactoferrina nas amostras. A coleta de colostro, logo após o parto, facilitou a coleta de amostras devido à internação hospitalar, com redução na perda de coleta por não-disponibilidade das mães e pela perda de contato com estas.

Os coeficientes de correlação entre as amostras controle e amostras com FM85® foram significativas para todas as cepas de bactérias, o que mostra crescimento bacteriano similar entre todas as amostras puras quando comparadas às amostras aditivadas, ou seja, que o crescimento bacteriano nas amostras com LM aditivado seguiram o mesmo padrão de crescimento das amostras de LM puro.

O mecanismo de inibição do crescimento bacteriano da lactoferrina ainda não está completamente definido. A capacidade bactericida da lactoferrina é frequentemente atribuída à sua capacidade de quelar ferro, restringindo esse nutriente que é essencial para bactérias patogênicas. Entretanto, este não é o único mecanismo de ação da lactoferrina, o que pode ser comprovado pelo elevado poder bacteriostático independente do grau de saturação desta pelo ferro (Lonnerdal, 2003; Nascimento e Issler, 2003; Lonnerdal, 2009; Pierce et al., 2009; Kamiya, 2012; Ochoa et al., Vogel, 2012; 2012).

A capacidade bacteriostática é atribuída aos receptores de lactoferrina, sendo que a ligação da lactoferrina aos receptores pode levar à desestabilização da membrana externa, aumentando a permeabilidade celular, o que poderia ser outro mecanismo antibacteriano, importante principalmente para as bactérias Gram-negativas. Tal mecanismo pode explicar a interferência no crescimento de *Escherichia coli*, por ser uma

bactéria Gram-negativa, porém não explica a não interferência no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, também Gram-negativa (Petschow, 1999; Shashiraj et al., 2006; Jensen e Hancock, 2009).

Apesar dos resultados deste estudo mostrarem maior crescimento de *Escherichia coli* nas amostras de LM com aditivo de LM suplementado com ferro, o Comitê de Nutrição da Academia Americana de Pediatria considera o risco dessa suplementação desde 1999, mas afirmou nesta data que os estudos não mostraram que a maior prevalência de *Escherichia coli* estava associada a maior risco de diarreia até a data, e como o risco de anemia é inaceitável, defendiam o uso de fórmulas suplementadas com ferro.

É importante destacar que os estudos tem mostrado que a lactoferrina tem mecanismos de atuação contra diversos patógenos, que não depende da quantidade de ferro disponível nem do grau de saturação da lactoferrina. Como a lactoferrina afeta o sistema imune e a função imune da mucosa intestinal, o ideal seria também avaliar a interferência do ferro nestes mecanismos. Como o presente estudo foi *in vitro* não foi possível avaliar estas funções.

A maioria das propriedades encontradas no LM é estudada *in vitro*, dadas às dificuldades de ordem ética e metodológica que um estudo *in vivo* poderia envolver. Apesar de apresentar limitações, os estudos *in vitro* são importantes para alicerçar as bases de futuros estudos em humanos.

É difícil saber como extrapolar os resultados encontrados neste estudo para a prática clínica. *In vitro*, a aditivação do leite materno com aditivo suplementado com ferro parece aumentar a proliferação de *Escherichia coli*. Estudos *in vivo* são necessários para testar a significância clínica destes resultados.

O efeito bacteriostático *in vitro* da lactoferrina contra *Escherichia coli* foi demonstrado por Buellen já em 1972, e está bem estabelecido até a presente data, mesmo sem o entendimento de todos os mecanismos bacteriostáticos do LM. Novos estudos, ainda com poucas evidências, vem demonstrando os benefícios da lactoferrina *in vivo* (Buellen, 1972; Zavaletta, 2007; Brock, 2012;).

Resultados contraditórios encontrados nos estudos citados podem ser interpretados pela diferença na composição do LM, que varia na dependência da etnia, raça, idade gestacional do RN no momento do parto, maturidade do LM, horário da coleta e momento da ordenha em que o leite foi coletado. Os estudos divergem ainda na quantidade de ferro adicionada às amostras e nas cepas de bactérias analisadas.

Mais estudos são necessários para identificar qual a quantidade de ferro que interfere na capacidade bacteriostática para cada cepa de bactéria, para cada composição de LM, já que a função bacteriostática parece estar relacionada com todos estes fatores.

7 CONCLUSÃO

O acréscimo de aditivo de LM suplementado com ferro na proporção de 0,28mg por grama de aditivo reduziu *in vitro* a ação bacteriostática contra *Escherichia coli*, entretanto este efeito não foi encontrado para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em amostras de leite materno coletadas até o sétimo dia pós-parto. Mais estudos são necessários para saber como extrapolar estes resultados para prática clínica.

8 ANEXOS

ANEXO A

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,,
de livre e espontânea vontade aceitei participar do estudo intitulado **“A INFLUÊNCIA DA ADITIVAÇÃO DO LEITE HUMANO NO CRESCIMENTO BACTERIANO IN VITRO”** coordenado pela nutricionista Letícia Fuganti Campos.

Declaro que entendi claramente o objetivo do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus possíveis desconfortos e que não há riscos; e me proponho a coletar pessoalmente a amostra de leite e doá-la para os testes laboratoriais. Eu não receberei dinheiro ou indenização para doação. Recebi a informação necessária para realizar a coleta de leite e compreendi como fazê-la.

Fui informada de que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso ao tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Ficam claras também as garantias de confidencialidade, que as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente; de esclarecimentos permanentes e divulgação sobre os resultados parciais da pesquisa, caso solicitados.

Declaro que fui informado e esclarecido sobre o que consta acima e concordo em participar da pesquisa.

Campina Grande do Sul, de de

Assinatura:

Nome por extenso:

Amostra número:

* O investigador executante é a nutricionista Letícia Fuganti Campos, que pode ser encontrada no endereço: Rua Bruno Filgueira, 2495, Curitiba (Clínica Nutropar), Telefone 33390370.

** Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

ANEXO B

HOSPITAL E MATERNIDADE ANGELINA CARON
Comitê de Ética em Pesquisa

OF CEP HAC 013/08
Campina Grande do Sul, 31 de julho de 2008

Para
Nutricionista Leticia Fuganti Campos

Referência:

Projeto:
**A INFLUÊNCIA DA ADITIVAÇÃO DO LEITE HUMANO NO CRESCIMENTO
BACTERIANO *IN VITRO***

Comunicamos a aprovação na reunião ordinária de 31 de julho de 2008, pelo Comitê de Ética em Pesquisa deste hospital, do documento acima citado, referente ao estudo clínico supra mencionado.

Atenciosamente

Dr. Pedro Ernesto Caron
CEP-HAC

Membros do CEP:

Adriane de Fátima Kulibaba
Ana Cristina Hansaul
Antonio Celso Albuquerque
Beatriz de Souza Baternoster
Celso Soares do Nascimento (presidente)

Elimar Cândido Kasper
José Roberto Tenedine
Jurema de Fátima Arruda
João Carlos Domingues Repka
José Messias Almeida Santos

Marilu de Fátima Sandi
Matheus Martin Macri
Meire Cristiane dos Reis
Ricardo José Cavilha
Sunilda W. C. Marmanillo

ANEXO C

APROVAÇÃO

A Comissão 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, em sessão de 04/11/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1094/09**, intitulado: **"A INFLUÊNCIA DA ADITIVAÇÃO DO LEITE HUMANO NO CRESCIMENTO BACTERIANO IN VITRO"** apresentado pelo Departamento de **PEDIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, Inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Mário Cícero Falcão**

Pesquisador (a) Executante: **Letícia Fuganti Campos**

CAPPesq, 05 de Novembro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

9 REFERENCIAS

Adamkin DH. Mother's Milk, Feeding Strategies, and Lactoferrin to Prevent Necrotizing Enterocolitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012; 36 (1):25-9.

Aguila ALAO; Brock JH. Lactoferrin: Antimicrobial and Diagnostic Properties. *Biotecnología Aplicada.* 2001;18(2):76-83.

Allen LH. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1): 206-12.

Almeida JAG, Novak FR. **O leite humano: qualidade e controle.** In: Fisiologia e Patologia da Lactação (Santos Jr., org.). Natal: Ed. Sociedade Brasileira de Mastologia, 1995.

Almeida JPG, Guimarães V, Novak FR. Seleção e Classificação do Leite Humano Ordenhado Cru. In: Centro de Referência Nacional para Bancos de Leite Humano – Instituto Fernandes Figueira / Fundação Oswaldo Cruz / Ministério da Saúde, 2005.

American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition. Nutritional needs of low birth weight infants. *Pediatrics*; 1977; 60: 519-30.

American Academy of Pediatrics. Section on Breastfeeding. Policy Statement. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2012; 129(3):827-41.

ANVISA - Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2007.

Almeida JPG, Guimarães V, Novak FR. Seleção e Classificação do Leite Humano Ordenhado Cru. In: Centro de Referência Nacional para Bancos de Leite Humano – Instituto Fernandes Figueira / Fundação Oswaldo Cruz /

Ministério da Saúde, 2005.

Arslanoglu S; Moro GE; Ziegler EE. Adjustable fortification of human milk fed to preterm infants: does it make a difference? *J Perinatol*. 2006; 26:614-21.

Artym J; Zimecki M. The role of lactoferrin in the proper development of newborns. *Postepy Hig Med Dosw*. 2005; 59:421-32.

Bathia J. Human milk and the premature infant. *J Perinatol*. 2007; 27: 71-4.

Berseth CL, Van Aerde JE, Gross S, Stolz SI, Harris CL, Hensen JW. Growth, Efficacy, and Safety of Feeding an Iron-Fortified Human Milk Fortifier. *Pediatrics*. 2004; 114 (6):699-706.

Bezirtzoglou E, Stavropoulou E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe*. 2011; 17(6): 369-74.

Boehm G, Stahl BJ. Oligosaccharides from milk. *J Nutr*; 2007. 137(3):847-49.

Thompson JF, Heal LJ, Roberts CL, Ellwood DA. Women's breastfeeding experiences following a significant primary postpartum haemorrhage: A multicentre cohort study. *International Breastfeeding Journal*. 2010; 5(5): 1-12.

Bortolozo EAFQ, Tiboni EB, Cândido LMB. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo peso: análise nutricional e proposta de um novo complement. *Rev Panam Salud Publica*. 2004; 16 (3):199-205.

Brandão MB; Lopes CE; Morcillo AM; Baracat ECE. Risk factors of death in children with diarrhea and shock admitted to the intensive care unit. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2005; 51(4):237-40.

Brandt KG, Sampaio MC, Miuki CJ. Importância da microflora intestinal. *Pediatrics*. 2006; 28:117-27.

Brock, JH. Lactoferrin - 50 years on. *Biochem Cell Biol*. 2012; 90(3): 245-51.

Brock, JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol*. 2002; 80(1): 1–6.

Brock RS, Falcão MC. Avaliação nutricional do recém-nascido: limitações dos métodos atuais e novas perspectivas. *Rev. paul. Pediatr*. 2008; 26(1): 76-83.

Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh L. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infections in infants. *Br Med J*. 1972 1(5792): 69–75.

Burrow H; Kanwar RK, Kanwar JR. Antioxidant enzyme activities of iron saturated bovin lactoferrin in human gut epithelial cells under oxidative stress. *Med Chem*. 2011;7(3):224-30.

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

Centers for Disease Control – CDC. Breastfeeding promotion [on-line]. 2010. Available from: <http://www.cdc.gov/breastfeeding/promotion/index.htm>.

Cernat RC, Scott KP. Evaluation of novel assays to assess the influence of different iron sources on the growth of *Clostridium difficile*. *Anaerobe*. 2012; 18(3): 298-304.

Chagas de Freitas BA, Peloso M, Manella LD, Franceschini CC, Longo GZ, gomes AP, Siqueira-Batista R. Sepsis tardia em pré-termos de uma unidade de terapia intensiva neonatal: análise de três anos. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2012; 24(1): 79-85.

Chan, GM. Effects of Powdered Human Milk Fortifiers on the Antibacterial Actions of Human Milk. *J Perinatol*. 2003;23:620-3.

Chan GM, Martin LL, Rechtman DJ. Effects of a Human Milk-Derived Human Milk Fortifier on the Antibacterial Actions of Human Milk. *Breastfeeding Medicine*. 2007;2;205-8.

Chang, SJ. Antimicrobial proteins of maternal and cord sera and milk in relation to maternal nutritional status. *Am J Clin Nutr*. 1990; 51(5):183–7.

Chapman DJ, Nommsen-Rivers L. Impact of Maternal Nutritional Status on Human Milk Quality and Infant Outcomes: An Update on Key Nutrients. *Adv Nutr*. 2012; 3:351-2.

Cohen RS and McCallie KR. Feeding premature infants: Why, when, and what to add to human milk. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2012;36 (1):20-4.

Cohen-Wolkowicz M, Moran C, Benjamin DK, Cotten CM, Clark RH, Benjamin DK Jr, Smith PB. Early and late onset sepsis in late preterm infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2009; 28(12): 1052-6.

Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92(5): 1023-30.

Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk. *Pediatr Res*. 2012; 72(1): 77-85

Collard KJ. Iron Homeostasis in the neonate. *Pediatrics*. 2009; 123(4): 1298-16.

Correia-Santos AM, Bolognini KP, Erthal SR, Teles BG, Blondet de Azeredo V. Dietary supplements for the lactating adolescent mother: influence on plasma micronutrients. *Nutr Hosp.* 2011; 26(2): 392-8.

Cruz ACR, Falcão MC, Ramos JLA. Análise crítica do uso de curvas de crescimento intra-uterino no período neonatal. *Rev Bras Nutr Clin.* 2006; 21:198-203.

Dall'Agnol M; Martinez MB. Uptake of iron from different compounds by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Rev. Microbiol.* 1999; 30 (2):149-52.

Egashira M, Takayanagi T, Moriuchi M, Moriuchi H. Does daily intake of bovine lactoferrin-containing products ameliorate rotaviral gastroenteritis? *Acta Paediatr.* 2007; 96(8): 1242–44.

Fewtrell, M. Does early nutrition program later bone health in preterm infants? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011; 14(3):297-301.

Frazer DM, Darshan D, Anderson GJ. Intestinal iron absorption during suckling in mammals. *Biometals.* 2011; 24(3): 567-74.

Ghandehari H, Lee ML, Rechtman DJ. An Exclusive Human Milk-Based Diet in Extremely Premature Infants Reduces the Probability of Remaining on Total Parenteral Nutrition: A reanalysis of the data. *BMC Res Notes*; 2012; 5: 1:188 [Epub ahead of print].

Giugliani, ERJ. Problemas comuns na lactação e seu manejo. *J Pediatr.* 2004; 80(5):147-54.

Griffin IJ, Cooke RJ. Development of whole body adiposity in preterm infants. *Early Hum Dev.* 2012; 88 (1):19-24.

Grzeskowiak L, Gronlund MM, Beckmann C, Salminen S, von Berg A, Isolauri E. The impact of perinatal probiotic intervention on gut microbiota:

Double-blind placebo-controlled trials in Finland and Germany. *Anaerobe*. 2012; 18(1): 7-13.

Hall Moran V. Nutritional status in pregnant adolescents: a systematic review of biochemical markers. *Matern Child Nutr*. 2007; 3(2): 74–93.

Hall Moran V, Lowe N, Crossland N, Berti C, Cetin I, Hermoso M, Koletzko B, Dykes F. Nutritional requirements during lactation. Towards European alignment of reference values: the EURRECA network. *Matern Child Nutr*. 2010; 6(2): 39-54.

Hanson LA. Symposium on ‘Nutrition in early life: new horizons in a new century. Session 1: Feeding and infant development Breast-feeding and immune function. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2007; 66:384–96.

Hascoet JM, Hubert C, Rochat F, Legagneur H, Gaga, S, Emady-Azar S, Steenhout PG. Effect of Formula Composition on the Development of Infant Gut Microbiota. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011; 52(6): 756-62.

Hayakawa T; Jin CX; KO SBH; Kitagawa M; Ishiguro H. Lactoferrin in Gastrointestinal Disease. *Inter Med*. 2009; 48:1251-4.

Hernell O, Lonnerdal B. Iron status of infants fed low-iron formula: no effect of added bovine lactoferrin or nucleotides. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76(4): 858-64.

Higgins RD, Devaskar S, Hay Jr WW, Ehrenkranz RA, Greer FR, Kennedy K, Meier P, Papile L, Sherman MP. Executive Summary of the Workshop “Nutritional Challenges in the High Risk Infant”. *The Journal of Pediatrics*. 2012; 60(3):511-16.

Hurley WL, Theil PK. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients*. 2011;3 (4): 442–74

Isenberg HD. ***Essential procedures for clinical Microbiology American Society for Microbiology***, Washington 1998.

Jenssen H e Hancock REW. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*. 2009; 91: 19-29.

Johnson EE, Wessling-Resnick M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes Infect*. 2012; 3(4): 442-74.

Kamiya H, Ehara T, Matsumoto T. Inhibitory effects of lactoferrin on biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother*. 2012; 18(1): 47-52.

Kuschel CA, Harding JE. Multicomponent fortified human milk for promoting growth in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004; 2.

Latorre D, Berlutti F, Valenti P, Gessani S, Puddu P. LF immunomodulatory strategies: mastering bacterial endotoxin. *Biochem Cell Biol*. 2012; 90(3): 269-78.

Laurindo VM, Calil T, Leone CR, Ramos JLA. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II - Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação - Vantagens em relação ao leite de vaca. *Revisões e Ensaio*s. 1991; 24-9.

Legrand D. Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes. *Biochem Cell Biol*. 2012; 90 (3):252-68.

Legrand D, Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals*. 2010; 23(3): 365–76.

Lepage P, Van de Perre P. The Immune System of Breast Milk: Antimicrobial and Anti-inflammatory Properties. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012; 743 (3):121-37.

Leong WI, Bowlus CL, Tallkvist J, Lonnerdal B. Iron supplementation during infancy—effects on expression of iron transporters, iron absorption, and iron utilization in rat pups. *Am J Clin Nutr*. 2003; 78 (6): 1203-11.

Lien E, Jackson J, Kuhlman C, Pramuk K, Lonnerdal B, Janszen D. Variation in concentration of lactoferrin in human milk : A nine country survey. *Adv Exp Med Biol*. 2004, 554:423-6.

Long H, Yi JM, Hu PL, Li ZB, Qiu WY, Wang F, Zhu, A. Benefits of Iron supplementation for low birth weight infants: A systematic review. *BMC Pediatr*. 2012; 12(1):99.

Lonnerdal B, Jiang R, DU X. Bovine lactoferrin can be taken up by the human intestinal lactoferrin receptor and exert bioactivities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;53(6):606-14.

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

Lönnerdal B. Nutritional roles of lactoferrin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009;12 (3):293-7.

Lucas A, Fewtrell MS, Morley R, Lucas PJ, Baker BA, Lister G, Bishop NJ. Randomized outcome trial of human milk fortification and developmental outcome in preterm infant. *Am J Clin Nutr*. 1996, 64 (2): 142-51.

Maga EA, Desai PT, Weimer BC, Dao N, Kultz D, Murray JD. Consumption of lysozyme-rich milk can alter microbial fecal populations. *Appl Environ*

Microbiol. 2012 Jun 29 [Epub ahead of print].

Manzoni P, Decembrino L, Stolfi I, Pagni L, Rinaldi M, Cattani S, Romeo MG, Messner H, Laforgia N, Vagnarelli F, Memo L, Bordignon L, Saia OS, Maule M, Gallo E, Mostert M, Magnani C, Quercia M, Bollani L, Pedicino R, Renzullo L, Betta P, Ferrari F, Magaldi R, Mosca F, Stronati M, Farina D. Lactoferrin and prevention of late-onset sepsis in the pre-term neonates. *Early Hum Dev.* 2010; 86(1): 59-61.

Manzoni P, Rizzollo S, Vain N, Mostert M, Stronati M, Tarnow-Mordi W, Farina D. Probiotics use in preterm neonates: What further evidence is needed? *Early Hum Dev.* 2011; 87(1): 3-4.

Makela J, Linderborg K, Niinikoski H, Yang B, Lagstrim H. Breast milk fatty acid composition differs between overweight and normal weight women: the STEPS Study. *Eur J Nutr.* 2012 May 26. [Epub ahead of print].

Mataloun MMGB, Leone CR, Ono N, Vaz FAC. Repercussões neonatais do uso de leite materno com aditivos e fórmula para pré-termo em recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer. *Pediatrics.* 2004; 26 (5): 247-56.

Mello-Neto J, Rodonó PH, Morgano MA, Oshiiwa M, Santos ML, Oliveira JM. Iron Concentrations in Breast Milk and Selected Maternal Factors of Human Milk Bank Donors. *J Hum Lact.* 2010;26(2): 175-9.

Mills RJ, Davies MW. Enteral iron supplementation in preterm and low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Mar 14; 3.

Miranda R, Saravia NG, Ackerman R, Murphy N, Berman S, McMurray DN. . Effect of maternal nutritional status on immunological substances in human colostrum and milk. *Am J Clin Nutr.* 1983; 37(4):632–640.

Moody GJ, Schanler RJ, Lau C, Shulman RJ. Feeding Tolerance in Premature Infants Fed Fortified Human Milk. *Journal of Pediatric*

Gastroenterology & Nutrition. 2000; 30 (4):,408-12.

Morales Y and Schanler RJ. Human Milk and Clinical Outcomes in VLBW Infants: How Compelling Is the Evidence of Benefit? *Seminars in Perinatology*. 2007; 31(2):83-8.

Muhammad Z, Ahmed A, Hayat U, Wazir MS, Rafiyatullah, Wagas H. Neonatal sepsis: causative bacteria and their resistance to antibiotics. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2010; 22(4):33-6.

Nascimento MB, Issler H. Aleitamento materno em prematuros: manejo clínico hospitalar. Aleitamento materno em prematuros: manejo clínico hospitalar. *J Pediatr*. 2004; 80:163-72.

Neville MC, Anderson SM, McManaman JL, Badger TM, Bunik M, Contractor N, Crume T, Dabelea D, Donovan SM, Forman N, Frank DN, Friedman JE, German JB, Goldman A, Hadsell D, Hambidge M, Hinde K, Horseman ND, Hovey RC, Janoff E, Krebs NF, Lebrilla CB, Lemay DG, MacLean PS, Meier P, Morrow AL, Neu J, Nommsen-Rivers LA, Raiten DJ, Rijnkels M, Seewaldt V, Shur BD, VanHouten J, Williamson P. Lactation and Neonatal Nutrition: Defining and Refining the Critical Questions. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2012; Jul 1. [Epub ahead of print].

Nichols BL, McKee KS, Henry JF, Putman M. Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr Res*. 1987; 21(6): 563-7.

Ochoa TJ, Chea-Woo E, Campos M, Pecho I, Prada A, McMahon RJ, Cleary TG Impact of lactoferrin supplementation on growth and prevalence of Giardia colonization in children. *Clin. Infect*. 2008; 46(12): 1881–3.

Oliveira AG, Siqueira PP, Abreu LC. Cuidados nutricionais no recém-nascido de muito baixo peso. *Rev. bras. crescimento desenvolv. hum*. 2008; 18 (2): 148-54.

Orlando S. The immunologic significance of breast milk. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 1995; 24 (7):678-83.

Ovali F, Çiftçi IH, Çetinkaya Z; Bükülmez A. Effects of Human Milk Fortifier on the antimicrobial properties of human milk. *Journal of Perinatology.* 2006;26:761-3

Paesano R, Torcia F, Berlutti F, Pacifici E, Ebano V, Moscarini M, Valenti P. Oral administration of lactoferrin increases hemoglobin and total serum iron in pregnant women. *Biochem Cell Biol.* 2006; 84(3): 377–80.

Paesano R, Berlutti F, Peitropaoli M, Pantanella F, Pacifici E, Goolsbee W, Valenti P. Lactoferrin efficacy versus ferrous sulfate in curing iron deficiency and iron deficiency anemia in pregnant women. *Biometals.* 2010; 23(3): 411-7.

Pammi M, Abrams SA. Oral lactoferrin for the prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;10.

Petschow BW, Talbott RD, Batema RP. Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium* spp. *in vitro* is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *J. Med. Microbiol.* 1999; 48:541-9.

Pierce A, Legrand D, Mazurier J. La lactoferrine: une protéine multifonctionnelle. *Med. Sci. (Paris).* 2009; 25(4): 361-9.

Rahman MM, Kim WS, Ito T, Kumura , Shimazaki K. Growth promotion and cell binding ability of bovine lactoferrin to *Bifidobacterium longum*. *Anaerobe.* 2009; 15:133–7.

Raj S, Faridi MMA, Rusia U, Singh O. A prospective study of iron status in exclusively breastfed term infants up to 6 months of age. *Int Breastfeed J.* 2008; 3: 3.

Ramel SE, Gray HL, Ode KL, Younge N, Georgieff MK, Demerath EW. Body composition changes in preterm infants following hospital discharge: comparison with term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;53 (3):333-8.

Salminen A, Isolauri E. Opportunities for improving the health and nutrition of the human infant by probiotics. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program. 2008; 62:223-33; discussion 233-7.

Rogol AD, Clark PA, Roemmich JN. Growth and pubertal development in children and adolescents: effects of diet and physical activity. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(2):521–8.

Salminen S, Isolauri E. Opportunities for improving the health and nutrition of the human infant by probiotics. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program. 2008; 62: 223-33; discussion 233-7.

Santiago MS, Champa NC, Potak DC, Schanler RJ. Effect of Human Milk Fortifiers on Bacterial Growth in Human Milk. *Journal of Perinatology.* 2005;25:647-9.

Sanz Y. Gut microbiota and probiotics in maternal and infant health. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94 (6): 2000-5.

Schanler RJ. Outcomes of Human Milk-Fed Premature Infants. *Seminars of Perinatology.* 2011; 35:29-33.

Sgro M, Shas PS, Campbell D, Tenuta A, Shivanda S, Lee SK, Canadian Neonatal Network. Early-onset neonatal sepsis: rate and organism pattern between 2003 and 2008. *J Perinatol.* 31(12): 794.8.

Shashi R, Faridi MMA, Russia U, Singh O. A prospective study of iron status in exclusively breastfed term infants up to 6 months of age. *Int Breastfeed J*. 2008; 1(3): 3.

Shashiraj MM, Faridi A, Singh O, Rusia A. Mother's iron status, breastmilk iron and lactoferrin – are they related? *Eur J Clin Nutr*. 2006; 6: 903–8.

Silva EHLS, Vasconcelos MF, Gomes NJB, Farias DC, Malveira SS, Chermont AG. Etiologia da sepse em uma unidade neonatal pública de referência. *Rev para med*. 2009; 23(3).

Silva RC, Escobedo JP, Gioiell LA. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. *Quím. Nova*. 2007; 30 (7):1535-38.

Sisk PM, Lovelady CA, Robert GD, Gruber KJ. Lactation Counseling for Mothers of Very Low Birth Weight Infants: Effect on Maternal Anxiety and Infant Intake of Human Milk. *Pediatrics*; 2006. 117(1):67-75.

Sullivan S, Shanler RJ, Kim JH, Patel AL, Trawöger R, Kiechl-Kohlendorfer U, Chan GM, Blanco CL, Abrams S, Cotton M, Laroia N, Ehrenkranz RA, Dudell G, Cristofalo EA, Meier P, Lee ML, Rechtman DJ, Lucas, A. An Exclusively Human Milk-Based Diet Is Associated with a Lower Rate of Necrotizing Enterocolitis than a Diet of Human Milk and Bovine Milk-Based Products. *J Pediatr*. 2010; 156 (4): 562-7.

Thompson JF, Heal LJ, Roberts CL, Eliwood DA. Women's breastfeeding experiences following a significant primary postpartum hemorrhage: A multicenter cohort study. *Int Breastfeed J*. 2010; 27 (5): 5.

Togawa, J; Nagase, H; Tanaka, K; Inamori, M; Nakajima, A; Ueno, N, Salito T, Sekihara H. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002; 17(12): 1291-8.

Toma TS, Rea MF. Benefits of breastfeeding for maternal and child health: an essay on the scientific evidence. *Cad. Saúde Pública*. 2008;24(2): 235-46.

Torres MIU, López CM, Román SV, Díaz A, Cruz-Rojo J, Cooke, EF, Alonso CRP. Does opening a milk bank in a neonatal unit change infant feeding practices? A before and after study. *International Breastfeeding Journal*. 2012;5: 4.

Turroni F, van Sinderen D, Ventura M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol*. 2011; 149(1): 37-44.

United Nations Children's Fund – UNICEF: *Facts for Life*. 3rd ed. New York: United Nations Children's Fund; 2002.

Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr*. 2009; 21(6): 794-800.

Veereman-Wauters G, Staelens S, Van de Broek H, Plaskie K, Wesling F, Roger LC, McCartney AL, Assam P. Physiological and Bifidogenic Effects of Prebiotic Supplements in Infant Formulae. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011; 52: 763-71

Vogel HJ. Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem Cell Biol*. 2012; 90 (3): 233-44.

World Health Organization – WHO. Infant and Young Child Nutrition: Global Strategy on infant and young child feeding [on-line]; 2012, Available from: http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA55/ea5515.pdf.

World Health Organization, WHO. [on-line]; 2011. Available from: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2011/breastfeeding_20110115/en/

World Health Organization, WHO: *Evidence for the ten steps to successful breastfeeding*. Geneva: World Health Organization; 1998.

Yu VY. Extrauterine growth restriction in preterm infants: importance of optimizing nutrition in neonatal intensive care units. *Croat Med J*. 2005; 46 (5):737-43.

Yuen JWM, Loke AY, Gohel MDI. Nutritional and immunological characteristics of fresh and refrigerated stored human milk in Hong Kong: A pilot study. *Clin Chim Acta*. 2012; 413(19-20): 1549-54.

Zacharissen G, Faerk J, Grytter C, Esberg BH, Hieltborg J, Mortensen S, Thybo Christesen H, Halken S. Nutrient Enrichment of Mother's Milk and Growth of Very Preterm Infants After Hospital Discharge. *Pediatrics*. 2011; 27(4): 955-1003.

Zavaletta N, Figueroa D, Rivera J, Sánchez J, Alfaro S, Lönnnerdal B. Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant human lactoferrin and lysozyme in Peruvian children with acute diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 2007; 44(2): 258–64.

Zeigler EE. Meeting the Nutritional Needs of the Low-Birth-Weight Infant. *Ann Nutr Metab*. 2011; 58(1):8–18.