

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARIA CAROLINA ACHCAR FEIH

**Nutrição de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso utilizando um concentrado com liofilizado de leite humano: Estudo de fase 1 segurança e tolerabilidade**

Ribeirão Preto

2022

MARIA CAROLINA ACHCAR FEIH

**Nutrição de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso utilizando um concentrado com liofilizado de leite humano: Estudo de fase 1 segurança e tolerabilidade**

**Versão Corrigida**

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Opção: Investigação em Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Dr. José Simon Camelo Junior

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Feih Achcar, Maria Carolina

Nutrição de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso utilizando um concentrado com liofilizado de leite humano: Estudo de fase 1 segurança e tolerabilidade. Ribeirão Preto, 2022.

91 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Camelo Junior, José Simon.

1. Leite humano. 2. Banco de leite humano. 3. Recém-nascido prematuro. 4. Liofilizado. 5. Recém-nascidos de muito baixo peso. 6. Enterocolite necrosante.

Nome: FEIH ACHCAR, Maria Carolina

**Nutrição de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso utilizando um concentrado com liofilizado de leite humano: Estudo de fase 1 segurança e tolerabilidade**

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

Aprovado em: 06 de maio de 2022.

Banca Examinadora

Prof. Dr.: José Simon Camelo Junior.

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Julgamento: Favorável.

Profa. Dra.: Cristina Cardonyi Carvalheiro

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Julgamento: Favorável.

Profa. Dra.: Daniela Marques de Lima Mota Ferreira.

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia.

Julgamento: Favorável.

*Dedico este trabalho aquele que me trouxe até aqui,  
Luciano, meu filho amado.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha mãe Ana, ao meu pai Salvador e a minha irmã Isabel por nunca me deixarem sozinha.

Ao meu companheiro Rafael por semear a ideia da minha candidatura à Pós-Graduação e pelo constante incentivo.

À Prof. Dra. Selma Freire de Carvalho da Cunha por abrir as portas da FMRP-USP, me aceitando como aluna especial, em plena segunda feira de carnaval no ano de 2018.

À Equipe do Projeto LioNeo, em especial aos colegas nutricionistas Fábio Ued e Mariana Oliveira, por tornarem possível a realização desse importante trabalho.

À Equipe do Lactário do HCFMRP pela amizade construída.

Ao meu “filhusco” Luciano que veio para mudar a minha vida e finalmente me conduzir ao encontro da tão sonhada realização profissional na Nutrição Materno Infantil.

Ao grande Prof. Dr. José Simon Camelo Junior, o meu carinho, admiração e eterna gratidão por me permitir fazer parte da sua história de sucesso.

E finalmente, ao nosso Pai Celestial que através das “coincidências da vida” me abriu novas possibilidades e sempre esteve ao meu lado no trilhar do caminho.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Esta dissertação é resultado de um ensaio clínico de fase 1, randomizado, controlado e duplo cego aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, com CAAE nº 96682318.2.0000.5440.

Este estudo foi desenvolvido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP)

A execução do projeto foi financiada pela Fundação Bill e Melinda Gates (Grand Challenges Brazil), Grant nº OPP1107597 para JSC Jr., CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil, Financiamento nº 401612 / 2013-9 a JSC Jr. e Ministério da Saúde / Departamento de Ciência e Tecnologia, Brasil.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho dos estudos, coleta e análise de dados, decisão de publicação ou preparação dos manuscritos.

*“É pelo milagre da maternidade que Deus mostra quão especiais são as mulheres que habitam nosso mundo. ”*

*(Autor desconhecido)*



## RESUMO

FEIH ACHCAR, M. C. **Nutrição de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso utilizando um concentrado com liofilizado de leite humano: Estudo de fase 1 segurança e tolerabilidade.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

**Introdução:** Recentemente foi desenvolvido o leite humano concentrado com liofilizado de origem humana (LioNeo). Testes pré-clínicos demonstraram que o LioNeo possui osmolalidade aceitável, adequada composição nutricional, estabilidade físico-química e segurança microbiológica imediatamente após sua produção e após armazenamento por 3 e 6 meses.

**Objetivo:** Verificar a segurança e tolerabilidade do LioNeo em comparação ao aditivo comercial padrão FM85® (à base de proteína do leite de vaca hidrolisada) na nutrição de recém-nascidos de muito baixo peso (RNMBP).

**Modelo de estudo:** Ensaio clínico de fase 1, randomizado, controlado e duplo cego. **Local:** Unidade de Terapia Intensiva Neonatal e Unidade de Cuidados Intermediários Neonatais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

**Participantes:** Entre 66 participantes elegíveis em potencial, 40 RNMBP foram inscritos e alocados aleatoriamente em dois grupos: Grupo A ou Grupo B.

**Crítérios de inclusão:** Prematuros (<37 semanas), peso ao nascer de 750-1500g, pequenos ou adequados para a idade gestacional, recebendo exclusivamente leite humano, volume igual a 100ml/kg /dia ou superior, hemodinamicamente estáveis e cujos pais ou responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. **Crítérios de exclusão:** Recém-nascidos pré termo grandes para idade gestacional, malformações, hemorragias peri e intraventriculares de grau III e IV e recém-nascidos de mães menores de idade sem um acompanhante responsável.

**Intervenção:** Os participantes randomizados para o grupo A foram alimentados com LioNeo e os randomizados para grupo B com leite humano fortificado com aditivo comercial FM85® (LHFM85) durante 21 dias consecutivos.

**Principais desfechos:** Morte, sepse neonatal tardia, enterocolite necrosante (EN), sangramento e perfuração gastrointestinal, diarreia, distensão abdominal, vômito e regurgitação. **Resultados:** Os grupos LioNeo e LHFM85 apresentaram, respectivamente, idade gestacional ( $30,4 \pm 2,7s$  e  $29,7 \pm 1,8s$ ) e peso inicial ( $1220 \pm 200g$  e  $1219 \pm 204g$ ) semelhantes. O modelo de regressão simples não mostrou diferenças entre os grupos comparando as médias dos eventos adversos. Diarreia, perfuração gastrointestinal, EN e sepse neonatal tardia não foram observados no LioNeo, portanto, não foram comparados

estatisticamente (1 caso de perfuração gastrointestinal, 1 EN e 1 caso de sepse neonatal tardia no grupo LHF85). Também comparamos os grupos usando um modelo de regressão múltiplo com o volume total de leite ingerido durante os 21 dias de acompanhamento como variável ajustada e não houve diferenças. Não ocorreram mortes durante o estudo. Os pacientes de ambos os grupos ganharam peso e comprimento de forma semelhante. **Conclusão:** O leite humano concentrado com liofilizado de origem humana (LioNeo) foi considerado seguro e tolerável para uso em RNMBP hemodinamicamente estáveis.

**Palavras-chave:** Leite humano. Banco de leite humano. Recém-nascido prematuro. Liofilizado. Recém-nascidos de muito baixo peso. Enterocolite necrosante.

## ABSTRACT

FEIH ACHCAR, M. C. **Nutrition of very low birth weight preterm newborns with concentrate containing human milk lyophilisate: Phase 1 safety and tolerability.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

**Introduction:** Our group recently developed LioNeo, human milk concentrated with lyophilisate from human origin. Pre-clinical tests showed that LioNeo has acceptable osmolality, adequate nutritional composition, physical-chemical stability, and microbiological safety. **Objective:** To assess safety and tolerability of LioNeo compared to the commercial standard additive FM85® (based on hydrolyzed cow's milk protein) in the nutrition of very low birth weight newborns (VLBW). **Design:** Phase I double blind, randomized, controlled clinical trial. **Setting:** Neonatal Intensive Care Unit and Neonatal Intermediate Care Unit, Clinics Hospital, Ribeirão Preto Medical School. **Participants:** Among 66 potential eligible participants, 40 VLBW were enrolled and randomly allocated into two groups: Group A or Group B. **Inclusion criteria:** Preterm (<37 weeks), hemodynamically stable infants weighing 750–1500 g at birth (small or adequate for gestational age) and receiving 100 ml/kg/day human milk; parents or guardians signed the informed consent. **Exclusion criteria:** Large weight for gestational age, malformations, grade III and IV peri and intraventricular hemorrhages, and no guardian to sign the consent for underage mothers. **Intervention:** Participants randomized to group A were fed LioNeo and those randomized to group B to human milk fortified with commercial additive FM85® (HMCA) for 21 consecutive days. **Main Outcomes:** Death, late-onset neonatal sepsis, necrotizing enterocolitis (NEC), gastrointestinal bleeding and perforation, diarrhea, abdominal distension, vomiting, and regurgitation. **Results:** Groups LioNeo and HMCA presented similar gestational age ( $30.4 \pm 2.7$  and  $29.7 \pm 1.8$  weeks, respectively) and baseline weight ( $1220 \pm 200$  and  $1219 \pm 204$  g, respectively). The groups had similar means of adverse outcomes on regression analysis. Diarrhea, gastrointestinal perforation, NEC, and neonatal sepsis were absent in LioNeo. HMCA had one cases of gastrointestinal perforation, one NEC and one late-onset sepsis. The total volume of milk ingested during the 21-day follow-up (as an adjusted variable), weight gain, and length were the same in both groups. There were no deaths during the study. Patients in both groups gained weight and length similarly. **Conclusion:** LioNeo is safe and tolerable for hemodynamically stable VLBW.

**Keywords:** Human milk. Human milk bank. Preterm newborn. Lyophilisate. Very low birth weight infants. Necrotizing enterocolitis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLH	Banco de leite humano
EN	Enterocolite necrosante
HC Criança	Unidade Pediátrica do Hospital das Clínicas
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
IC	Intervalo de confiança
IG	Idade gestacional
LC-PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa
LH	Leite humano
LHB	Leite humano em linha de base
LHC3m	Leite humano concentrado com 3 meses de estocagem
LHC6m	Leite humano concentrado com 6 meses de estocagem
LHCIm	Leite humano concentrado imediato
LHCL	Leite humano concentrado liofilizado (LioNeo)
LHFM85	Leite humano com aditivo comercial a base de proteína de leite de vaca (FM 85 <sup>®</sup> , Nestlé <sup>®</sup> )
LioNeo	Leite humano concentrado com liofilizado de origem humana
LNO	Leite naturalmente ordenhado
PLV	Proteína hidrolisada do leite de vaca
REDCap	<i>Research electronic data capture</i>
RNMBP	Recém-nascido de muito baixo peso
RNPT	Recém-nascido pré-termo
RR	Risco relativo
SNC	Sistema nervoso central
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UCI Neo	Unidade de cuidados intermediários neonatais
UTI Neo	Unidade de terapia intensiva neonatal

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
1.1	Projeto de liofilização do leite humano.....	19
1.2	Justificativa .....	20
1.3	Hipótese .....	21
1.3.1	Pergunta do estudo.....	21
2	OBJETIVO .....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1	Desenho e configuração do estudo.....	23
3.2	Critérios de inclusão e exclusão.....	24
3.2.1	Critérios de inclusão.....	24
3.2.2	Critérios de exclusão .....	25
3.3	Triagem e recrutamento .....	25
3.4	Randomização e mascaramento .....	26
3.5	Intervenção.....	27
3.5.1	Produção do leite humano com liofilizado de origem humana .....	27
3.5.2	Preparo do leite humano com aditivo de origem animal .....	30
3.5.3	Alimentação dos recém-nascidos .....	30
3.5.4	Reações adversas.....	32
3.5.5	Comitê interno e externo de avaliação de segurança.....	35
3.6	Coleta de dados.....	37
3.6.1	Dados antropométricos.....	37
3.6.2	Dados bioquímicos.....	38
3.7	Análise estatística.....	40
4	RESULTADOS .....	41
5	DISCUSSÃO .....	48
6	CONCLUSÃO .....	53
7	REFERÊNCIAS .....	54
8	ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Projeto LioNeo.....	59
9	ANEXO B – Protocolo para medida de pressão arterial em recém-nascidos pré-termo/ choque no período neonatal/ HCFMRP-USP.....	63
10	ANEXO C – Manual Operacional Padronizado para o Porcionamento de Leites Fortificados do Projeto LioNeo.....	67
11	ANEXO D – Protocolo para nutrição enteral de recém-nascidos pré-termo/ HCFMRP-USP.....	72
12	ANEXO E – Manual Operacional Padronizado para Coleta de Dados do Projeto LioNeo .....	79
13	APÊNDICE A – Análises adicionais não previstas no protocolo inicial do estudo .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

Com o advento do tratamento bem-sucedido de recém-nascidos de risco em unidades de terapia intensiva neonatal, a sobrevida dos pequenos prematuros tem aumentado. Atualmente, um expressivo percentual de recém-nascidos pré-termo com peso maior ou igual a 400g em países desenvolvidos sobrevive. Essa mudança tem sido atribuída ao uso mais racional dos conhecimentos tecnológicos, ao aprimoramento de cuidados obstétricos e neonatais, ao melhor entendimento e manejo das doenças pulmonares, neurológicas, digestivas, pré e pós-operatório, administração de fluidos e, em especial, ao suporte nutricional que vem sendo alvo de estudos nas últimas décadas. (1,2)

Uma abordagem nutricional ideal é a chave para aumentar a sobrevida dos recém-nascidos. A meta mais aceita para o crescimento pós-natal é a tentativa de mimetizar o crescimento intrauterino de um feto normal de mesma idade gestacional, respeitando as limitações da imaturidade, minimizando complicações e riscos futuros de doenças degenerativas do adulto. Essa expectativa raramente é atingida. (3,4)

O crescimento de recém-nascidos de muito baixo peso (RNMBP), assim considerados os de peso ao nascer menor do que 1.500g, é dificultado por problemas fisiopatológicos comuns a este grupo, como hipotensão, hipóxia, acidose, infecções, intervenções cirúrgicas, tratamentos farmacológicos com corticosteroides, além da imaturidade fisiológica. Há um consenso entre os neonatologistas de que a alimentação precoce em quantidade que supriria a necessidade nutricional dos RNMBP ou com alta osmolalidade pode levar à enterocolite necrosante (EN) se ofertada em volumes e velocidades superiores a capacidade gastrointestinal. Quanto mais acentuada a prematuridade e menor o peso, maiores são as dificuldades enfrentadas para a sobrevivência fora do espaço intrauterino. (5,6)

O nascimento pré-termo impede que o recém-nascido vivencie parte ou todo o último trimestre gestacional e as aquisições anatômicas e de desenvolvimento de determinadas vias metabólicas e estoque tecidual de nutrientes (como minerais e vitaminas lipossolúveis, que fazem depósitos orgânicos) que deveriam ocorrer neste período, interferindo nas necessidades nutricionais e na forma de supri-las. Há então uma maior demanda de proteínas, calorias, minerais, micronutrientes e eletrólitos para o crescimento e desenvolvimento adequados. O leite materno e o leite humano de banco são as melhores opções para a alimentação de recém-nascidos prematuros, assim como para os bebês nascidos a termo. (7) Entretanto, os RNMBP

não tem condições de suportar volumes de LH suficientes para alcançar a quantidade necessária de nutrientes, precisando, portanto, de suplementação.

Fazer com que esses RNMBP cresçam e se desenvolvam como se estivessem ainda no ambiente intrauterino é um constante desafio à equipe multidisciplinar que atende esses prematuros. O conhecimento da fisiologia do último trimestre gestacional, assim como dos aspectos nutricionais para promoção do crescimento nesse período são imprescindíveis para o tratamento desta população. O terceiro trimestre é um período de rápido crescimento e maturação estrutural, particularmente do Sistema Nervoso Central (SNC) e exige aporte adequado de nutrientes, em quantidade e qualidade adequadas, a fim de garantir boa evolução pômbero-estatural, sem iatrogenias carenciais ou sobrecargas metabólico-digestivas indesejáveis. (8,9)

O leite humano possui composição nutricional balanceada, incluindo todos os nutrientes essenciais, além de um grande número dos condicionalmente essenciais e cerca de 250 ou mais tipos diferentes de fatores bioativos. Muitos desses fatores parecem contribuir para o crescimento e desenvolvimento do feto e maturação de seu trato gastrintestinal. Dentre eles destacam-se fatores antimicrobianos, agentes anti-inflamatórios, enzimas digestivas, vários tipos de hormônios, fatores de crescimento e imunomoduladores. (10,11) O maior conhecimento das funções fisiológicas do leite humano, assim como de suas qualidades nutritivas e imunológicas, consagraram o seu uso na dieta dos recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso. (5)

Uma vez que os RNMBP não têm condições de ingerir o volume adequado de leite humano que supra suas necessidades nutricionais a solução encontrada foi o desenvolvimento de aditivos ou fortificantes para o leite humano, à base de proteína hidrolisada do leite de vaca (PLV). Esses aditivos incrementam alguns nutrientes essenciais no leite humano cru ou pasteurizado (como proteína, sódio, cálcio e fósforo) melhorando seu aporte nutricional e consequentemente aumentando o crescimento dos RNMBP. Apesar dos benefícios potenciais, os aditivos PLV podem alterar a qualidade imunológica do leite humano e aumentar o risco de sensibilização por proteína heteróloga, potencializando o risco de sangramento gastrointestinal, EN e sepse neonatal tardia. É importante colocar que a pasteurização do leite humano também reduz a concentração e a funcionalidade de seus componentes bioativos. (12)

Como consequência do avanço científico e tecnológico das últimas décadas, surgiu a possibilidade de fortificação do leite humano para esse grupo de prematuros à base de proteína exclusivamente humana, por meio de processos de ultra filtração, evaporação, centrifugação e



concentração do leite humano excluindo a necessidade de utilização de aditivos à base de proteína heteróloga.

No ano de 1999 foi fundada a empresa privada norte americana Prolacta Bioscience® que introduziu no mercado o conceito dos aditivos comerciais de leite humano à base de proteína exclusivamente humana, atualmente a referida Empresa ainda é a única a produzir e comercializar aditivos à base de LH, segundo dados disponíveis no site próprio. (13) Estudos recentes têm demonstrado suas vantagens nutricionais, excluindo o risco potencial de complicações como sensibilização por proteína heteróloga e perda acentuada das propriedades imunológicas do leite humano. Ganapathy, Hay e Kim (2012), descreveram o custo-efetividade da utilização do aditivo à base de proteína do leite humano na prevenção da EN. (14) Ghandehari, Lee e Rechtman (2012), demonstraram que uma dieta predominantemente à base de leite humano reduz o tempo de nutrição parenteral. (15) Sullivan et al. (2010) observou que aditivos de leite humano à base de proteína exclusivamente humana, quando comparados com uma dieta à base de proteína do leite de vaca, têm uma maior tolerância e menor incidência de sepse e EN em RNMBP. (16) No entanto, o custo do aditivo de LH de origem humana industrializado é impraticável para unidades de saúde pública de países em desenvolvimento, especialmente no Brasil, uma vez que além do alto custo, também contraria a legislação vigente sobre a comercialização de material biológico humano. Portanto, a utilização dessa única opção disponível é inviável, além de eticamente questionável. (17,18) Os aditivos a base de proteína do leite humano, como por exemplo o Prolact+H2MF (Prolacta Bioscience®), aumentam o valor nutricional do leite humano com proteínas, gorduras e carboidratos derivados de leite humano pasteurizado e a adição de minerais essenciais (sódio, potássio, cloro, cálcio, fósforo, magnésio, cobre e zinco), sem introduzir os riscos adicionais dos aditivos a base de proteína do leite de vaca, mas com vieses éticos importantes, uma vez que o leite humano é comprado para comercialização na forma de aditivo. (16,19)

Em relação aos aditivos a base de PLV no mercado brasileiro encontramos o FM-85® (Nestlé®) e o Enfamil HMF® (Mead Johnson®). Tais aditivos melhoram o poder nutricional do leite humano para RNMBP, mas expõem a riscos, além dos já mencionados, de desenvolvimento de alergia à proteína heteróloga em 5% dos casos. (20)

Em 2015 foi desenvolvido por pesquisadores brasileiros um aditivo a base de leite humano doado utilizando a técnica de liofilização, porém, antes de liofilizar, os autores fizeram a retirada da lactose por precipitação a frio em centrífuga refrigerada, após tentativa inicial de concentração do LH por evaporação. Os autores encontraram composição de lactose de  $9,22 \pm$

1,00 g/dL, proteínas de  $2,20 \pm 0,36$  g/dL, lipídios totais de  $2,91 \pm 0,57$  g/dL, calorias de  $71,93 \pm 8,69$  kcal/dL e osmolalidade de  $389,6 \pm 32,4$  mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Consideraram essa composição adequada para o crescimento dos RNMBP, exceto para o cálcio e fósforo, que orientaram suplementação. Os minerais magnésio, zinco e cobre, bem como o perfil lipídico não foram analisados nesse estudo. (21,22) Os resultados desses trabalhos demonstram que há possibilidades de se oferecer concentrações maiores de nutrientes do leite humano ao RNMBP com boa tolerância gastrointestinal e metabólica.

Martysiak-Żurowska, Rożek e Puta (2020), liofilizaram o leite humano e observaram que o processo não afetou a atividade da superóxido dismutase, o perfil de ácidos graxos ou o teor de lactoferrina, mas reduziu a capacidade antioxidante total do LH em 22,1% e induziu a um pequeno aumento na atividade de lisozima, em cerca de 9,8%. No leite liofilizado as substâncias bioativas, tais como a capacidade antioxidante total, lactoferrina, perfil de ácidos graxos e lisozima, permaneceram estáveis mesmo em temperatura ambiente. (23)

Diversos estudos analisaram os fortificantes de leite humano (Prolacta Bioscience®) e verificaram que os mesmos são capazes de oferecer excelente nutrição para os RNMBP. O leite humano apresenta vantagens por conter componentes imunológicos não nutritivos que podem contribuir para a integridade da mucosa gastrointestinal e têm a função de aumentar a imunidade contra diversas infecções. (24–27)

Observada essa necessidade o nosso grupo de pesquisa desenvolveu um liofilizado de leite humano proveniente de doação ao Banco de Leite Humano (BLH - HCFMRP-USP) para ser usado como aditivo, através de uma metodologia simplificada, que poderá ser implantada na rotina dos bancos de leite do Brasil e do mundo para alimentação de RNMBP, garantindo o alimento considerado padrão-ouro na nutrição do prematuro, com quantidade e qualidade adequadas de nutrientes.

O leite humano concentrado com liofilizado de origem humana, que nomeamos LioNeo, possui importante incremento do valor nutricional (cerca de 60%) comparado ao leite humano de base nas dosagens de macro e micronutrientes e osmolalidade superior, porém dentro do limite de segurança e estabilidade do perfil lipídico frente a diferentes períodos de estocagem. (28,29)

## 1.1 Projeto de liofilização do leite humano

Com o intuito de utilizar leite humano como aditivo, foi realizada em nosso Departamento (Puericultura e Pediatria – FMRP-USP) uma prova de conceito, com a elaboração de um concentrado com liofilizado de leite humano para alimentação de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso (LioNeo). Esse estudo-mente recebeu o apoio financeiro do CNPq, Ministério da Saúde/DECIT – Departamento de Ciência e Tecnologia e da Fundação Bill & Melinda Gates e apresentou resultados bastante favoráveis que permitiram o planejamento das fases clínicas 1 e 2 relacionadas à segurança, tolerabilidade e a eficácia do LioNeo em RNMBP.

O trabalho inicial na fase pré-clínica estudou 50 amostras de LH maduro (leite proveniente de doadora com mais de 14 dias de pós-parto) pasteurizado, com energia entre 500-700 kcal/L e acidez Dornic até 8°D. Foi realizada com sucesso a liofilização do LH total, através de uma técnica simples e com baixo custo, sem necessidade de manipulação prévia. A técnica de concentração do LH através da retirada da lactose por precipitação a frio não se mostrou consistente nos nossos ensaios laboratoriais. (28)

O liofilizado (LH em pó) produzido a partir de 50 ml de LH foi reconstituído com 75 ml de LH fluído da própria doadora, ambos crus, criando um concentrado de LH, com cuidado de não ultrapassar a osmolaridade de 450 mOsm/kg. Esse concentrado, bem como o leite humano de linha de base (LHB) passaram pelo processo de pasteurização e controle de qualidade microbiológica. Na sequência foram realizadas as análises do LHB com a adição do liofilizado, que nomeamos leite humano concentrado imediato (LHCIm) e após armazenamento do mesmo em freezer com temperatura controlada por 3 meses e 6 meses (LHCL3m/ LHCL6m). Os macronutrientes foram dosados através de espectroscopia por infravermelho, osmolalidade, perfil lipídico por cromatografia gasosa e os micronutrientes por espectrofotometria de absorção atômica nos 4 momentos diferentes (LHB/ LHCImediato/ LHCL3m/ LHCL6m). (28,29)

Guias vigentes da Academia Americana de Pediatria recomendam que a osmolalidade do leite humano enriquecido não deve ultrapassar 450 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O, ou osmolaridade aproximada de 400 mOsm/L, o que foi respeitado na concentração obtida com o LioNeo na prova de conceito. (8,28,29) Um estudo prospectivo austríaco, com o objetivo de analisar a osmolaridade do LH após a fortificação, demonstrou risco de aumento acima de limites aceitáveis (605 mOsm/L) com a adição de módulos de proteína e micronutrientes. (20) No

presente estudo fortificamos o LH com leite humano em pó na sua forma integral o que possivelmente favoreceu o controle da osmolaridade.

Na prova conceito do LioNeo, os valores dos carboidratos (lactose + oligossacarídeos) atingiram  $9,18 \pm 0,68$  g/100ml de leite, elevando a osmolalidade, juntamente com a concentração dos demais nutrientes, para  $452,12 \pm 59,79$  mOsm/Kg. Consideramos este valor como o limite superior de segurança para o concentrado com liofilizado, na proporção de 75 ml de leite humano para 50 ml de leite liofilizado. Concentrações superiores a esse valor podem elevar a osmolalidade e aumentar o risco de EN consequente. Podemos, dessa maneira, antever a vantagem de utilizar o liofilizado de leite humano total, que concentra todos os nutrientes, sem exceder a osmolalidade na concentração proposta.

Os estudos pré-clínicos do Projeto LioNeo demonstraram: (28,29)

- a) Viabilidade da liofilização do leite humano total, que foi bem-sucedida, permitindo a utilização do liofilizado de LH na concentração de leite humano de banco para a nutrição de RNMBP;
- b) Incremento variável entre 30-70%, com valor médio de 60% na comparação das análises de macronutrientes, micronutrientes e osmolalidade a partir do leite humano em linha de base e o LioNeo;
- c) Mudanças no perfil lipídico nas proporções relativas de alguns ácidos graxos específicos nos diferentes tempos de análise (período imediato e pós-estocagem com 3 e 6 meses), como o ácido araquidônico, ácido docosahexaenóico e eicosapentaenoico. No entanto, na somatória de ácidos graxos ômega 6 e 3 não houve diferença estatística nos diferentes tempos e o teor de lipídios ficou maior quando comparado com LH;
- d) O armazenamento do concentrado com o liofilizado de leite humano pode ocorrer por até 6 meses sem mudanças bruscas no perfil físico-químico do leite;
- e) A concentração obtida atende à maior parte das necessidades nutricionais do RNMBP, exceto para o cálcio e o fósforo, que provavelmente deverão ser suplementados.
- f) Existe segurança microbiológica no processamento e na liofilização do leite humano.

## **1.2 Justificativa**

O presente estudo justifica-se pelo fato de que a produção do liofilizado de leite humano para fortificação de leite de banco na nutrição de RNMBP tem potencial de melhorar significativamente o crescimento e desenvolvimento dessa população com redução de riscos

possíveis. Além disso, a produção do liofilizado é acessível para países e comunidades com recursos financeiros limitados.

### 1.3 Hipótese

A hipótese proposta neste estudo é que o leite humano concentrado com liofilizado de origem humana (LioNeo) seja seguro e tolerável na nutrição de recém-nascidos de muito baixo peso ( $\leq 1500\text{g}$ ).

#### 1.3.1 Pergunta do estudo

A fortificação de leite humano de banco de leite com liofilizado de origem humana é segura e tolerável em recém-nascidos de muito baixo peso quando comparada ao aditivo comercial à base de proteína do leite de vaca?

#### Quadro 1 – Metodologia PICO

<b>P</b> – população de estudo	Recém-nascidos com peso de nascimento entre 750 e 1500g
<b>I</b> – intervenção	Fortificação de leite humano de banco com liofilizado de origem humana
<b>C</b> – comparador	Fortificação de leite humano de banco com aditivo comercial à base de proteína do leite de vaca
<b>O</b> – desfechos	<b>Primários:</b> sangramento gastrointestinal ou perfuração gastrointestinal ou enterocolite necrosante ou sepse ou choque séptico ou morte <b>Secundários:</b> distensão abdominal, vômitos ou diarreia ou suspensão da dieta, por qualquer período, que deverá ser computado em horas

Fonte: Elaborado pela autora.

## **2 OBJETIVO**

Verificar a segurança (sangramento gastrointestinal ou perfuração gastrointestinal ou enterocolite necrosante ou sepse ou choque séptico ou morte) e a tolerabilidade (distensão abdominal, vômitos ou diarreia ou suspensão da dieta por qualquer período, que deverá ser computado em horas para efeito de comparação entre os grupos) do leite humano concentrado com liofilizado de origem humana na nutrição de recém-nascidos de muito baixo peso ( $\leq 1500\text{g}$ ).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho e configuração do estudo**

Ensaio clínico controlado, randomizado e duplo cego, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP com CAAE nº 96682318.2.0000.5440. O ensaio foi registrado na UTN (Universal Trial Number) com nº U1111-1220-0550 – <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-8nnpfm/>. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foi obtido dos pais ou responsáveis legais de todos os participantes. (ANEXO A)

O estudo foi realizado em um único centro denominado “HC Criança”, que consiste na unidade pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na cidade do Ribeirão Preto. Neste centro foram utilizadas duas unidades de cuidados neonatais: A Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI Neo), localizada no primeiro andar com 20 leitos disponíveis e a Unidade de Cuidados Intermediários Neonatais (UCI Neo), localizada no terceiro andar com capacidade máxima de 21 leitos.

Foi realizada uma pesquisa clínica de fase 1, sobre fortificação de leite humano para nutrição de RNMBP com dois tipos de aditivos: leite humano concentrado com liofilizado de origem humana, LioNeo (produto em investigação) e leite humano com aditivo comercial a base de proteína do leite de vaca LHF85 (produto utilizado como controle). Vale esclarecer que a utilização do LHF85 faz parte da rotina do hospital para os prematuros que necessitam de fortificação.

A população de escolha para o estudo foi de RNMBP em seu estado mais estável, pois geralmente utilizam aditivos a base de proteína do leite de vaca, que atualmente é o padrão no mundo para nutrição desses indivíduos, uma vez que os mesmos possuem uma condição de saúde delicada imposta pela prematuridade e a alimentação é um fator determinante para a sobrevida.

O tamanho amostral de 40 participantes foi determinado de acordo com o Manual do *Food and Drug Administration* (FDA) (30), sendo 20 RNMBP para Grupo A – LioNeo e 20 RNMBP para o Grupo B – LHF85.

Os RNMBP foram acompanhados por 21 dias, após consenso da equipe em consulta a estudos semelhantes. (31)

A equipe multidisciplinar para a execução do trabalho foi composta por 19 profissionais sendo: 7 enfermeiras, 4 médicos (1 deles o pesquisador principal), 4 nutricionistas (1 deles a gerente de projeto), 1 biomédica, 1 farmacêutica, 1 especialista em análises clínicas, 1 estatístico. As equipes médica e de enfermagem das unidades também tiveram importante participação uma vez que a prescrição diária, a administração da dieta, assim como todos os demais procedimentos de rotina para o acompanhamento dos participantes foram realizados segundo a rotina do hospital. A equipe do estudo e das unidades de internação foram previamente treinadas pelo pesquisador principal e pela gerente do projeto.

É importante salientar que o protocolo utilizado para a execução do presente estudo está de acordo com o Manual de Boas Práticas Clínicas: Documento das Américas. (32)

### **3.2 Critérios de inclusão e exclusão**

A triagem dos pacientes elegíveis foi baseada em critérios de inclusão e exclusão.

#### **3.2.1 Critérios de inclusão**

- a) peso ao nascer igual ou superior a 750 gramas e inferior ou igual a 1500 gramas;
- b) nascidos prematuramente (menos de 37 semanas de idade gestacional);
- c) considerados nascidos pequenos (PIG) ou adequados para a idade gestacional (AIG);
- d) recebendo leite humano, seja materno cru (que foi mantido) e/ou leite humano de banco;
- e) estáveis hemodinamicamente, sem uso de drogas vasoativas, com pressão arterial aferida dentro da curva de normalidade e/ou boa perfusão periférica (tempo de enchimento capilar menor que 3 segundos), pulsos periféricos palpáveis e saturação de oxigênio maior que 90%, conforme descrito no Protocolo para medida de pressão arterial em recém-nascidos pré-termo/ choque no período neonatal/ HCFMRP-USP. (ANEXO B)

Não foi delimitada idade máxima para entrada no estudo, o critério foi atingir o volume mínimo diário de leite humano de 100 ml/kg/dia no momento de inclusão, independentemente da idade (dias de vida).



Em situação de gemelaridade com univitelinos foi sorteado um dos recém-nascidos para participar do estudo (exceto gêmeos bivitelinos, ambos poderiam participar do estudo se elegíveis).

A idade gestacional (IG) de nascimento dos RNMBP foi definida a partir dos dados de ultrassonografia precoce de primeiro trimestre, quando registrados no prontuário médico.

A adequação do peso de nascimento para a IG foi classificada de acordo com a Intergrowth 21<sup>st</sup>. (33) Para os casos sem a referida informação no prontuário médico, foi utilizada a idade gestacional de nascimento determinada pelo método de New Ballard entre as primeiras 12 a 20 horas de vida, pois avalia mais critérios neurológicos do que somáticos, sendo assim, mais preciso. (34)

### **3.2.2 Critérios de exclusão**

- a) que apresentaram malformações maiores (como por exemplo, cardiopatias congênitas, atresia de esôfago, hérnia diafragmática, doenças genéticas entre outras);
- b) com hemorragias peri e intraventriculares (HPIV) graus III e IV diagnosticadas por ultrassonografia transfontanelar em até 72h de vida;
- c) filhos (as) de mães menores de idade sem acompanhante responsável;
- d) pacientes com asfixia perinatal grave ou moderada;
- e) pacientes com história prévia de EN ou intolerância alimentar.

### **3.3 Triagem e recrutamento**

Após a internação de um RNMBP nas unidades de abrangência da pesquisa (UCI Neo ou UTI Neo) uma das enfermeiras do estudo tinha a tarefa de consultar os dados sobre as condições de nascimento e de alimentação, verificando se preenchiam os critérios de inclusão. Realizada essa primeira análise a enfermeira fazia contato com os pais e/ ou responsável legal do neonato para a apresentação do projeto e verificação de interesse em participação voluntária, proferindo a leitura do TCLE. Para os pais que aceitaram foi coletada a assinatura em duas vias do TCLE, uma das vias foi arquivada sob guarda do pesquisador principal e a outra via entregue para os pais e/ou responsável legal. O processo foi registrado no prontuário eletrônico do paciente.

Foi garantido aos pais e/ou responsável legal o direito ao afastamento da pesquisa por qualquer motivo e a qualquer momento. Foi também esclarecido que, em caso de desistência de participação, o atendimento na unidade não seria prejudicado ou sofreria qualquer tipo de prejuízo.

### **3.4 Randomização e mascaramento**

Os prematuros de ambos os sexos, com peso de nascimento entre 750 e 1500g, após seus pais ou responsáveis terem assinado o TCLE foram admitidos no estudo, respeitando os critérios de inclusão e exclusão. Os então, participantes foram randomizados na razão 1:1, entre os dois tipos de fortificação definidas no estudo, com chances iguais, sendo que os RNMBP randomizados para o grupo A, receberam o produto em investigação, o LioNeo e os RNMBP randomizados para o grupo B receberam o LHF85 para controle.

A randomização ocorreu em blocos de tamanho aleatório (4 ou 6), a partir de uma lista gerada no serviço *Sealed Envelope* e inserida no *Research Electronic Data Capture (REDCap)* pelo estatístico responsável que, por sua vez, foi cego à alocação dos sujeitos. O *Research Electronic Data Capture* é uma plataforma baseada em metadados que visa apoiar projetos de pesquisa translacional em ambientes acadêmicos. Inicialmente desenvolvido pela Vanderbilt University, o REDCap é atualmente apoiado por 398 instituições parceiras em 46 países e apoia cerca de 40.000 projetos em todo o mundo. A ocultação foi realizada pelo REDCap atribuindo a próxima alocação somente no momento de inclusão do paciente, o mesmo foi acessado de forma exclusiva pelo referido estatístico, único responsável pela randomização, permanecendo indisponível para os demais pesquisadores. (35–37)

O ensaio clínico duplo cego, prevê a dupla ocultação do produto em investigação para os envolvidos, no caso do nosso estudo, os pais e/ou responsável legal dos participantes, prestadores de cuidados (médicos, enfermeiras, auxiliares de enfermagem, membros da equipe e funcionários do hospital), investigador principal e avaliadores de resultados não tinham conhecimento da randomização. Os únicos integrantes da equipe não cegos foram os três nutricionistas responsáveis pelo porcionamento das dietas e a farmacêutica responsável pelo envio de LH e LioNeo do banco de leite para o lactário. A informação da randomização restrita ao grupo citado foi repassada através do REDCap.

Os três nutricionistas (não cegos) responsáveis pela finalização do preparo e porcionamento dos leites fortificados seguiam a prescrição médica padronizada no sistema

HCFMRP-USP, redigida da seguinte maneira: Projeto LioNeo + volume x horários de administração. Com o conhecimento dessa informação os nutricionistas preparavam a dieta de acordo com o braço de alocação do participante. O contato da equipe cega com os demais integrantes da equipe foi restrito a assuntos relacionados a prescrição das dietas com relação a continuidade ou interrupção por algum evento adverso.

As dietas do grupo intervenção (Grupo A – LioNeo) e controle (Grupo B – LHF85) não apresentavam nenhuma diferença visual (cor) ou sensorial (cheiro e consistência) que permitisse diferenciar os leites nas unidades e pudesse colocar em risco o mascaramento. As seringas foram identificadas com etiquetas que constavam somente o nome do paciente, unidade de internação, horário de administração e a inscrição “Projeto LioNeo”.

### **3.5 Intervenção**

#### **3.5.1 Produção do leite humano com liofilizado de origem humana (LioNeo)**

A produção do LioNeo durante os meses de execução da pesquisa ocorreu no BLH - HCFMRP-USP. Foram responsáveis pela produção/ supervisão a Farmacêutica e a Biomédica do estudo, respectivamente. O LioNeo foi produzido com leite humano liofilizado (em pó) reconstituído com leite humano fluido de acordo com a prova de conceito (fase pré-clínica).(28) Segue breve descrição e fluxograma de produção.

O LioNeo foi produzido com leite naturalmente ordenhado (LNO) maduro doado por nutrizas voluntárias. Os frascos de LNO destinados a liofilização inicialmente seguiam aos procedimentos de seleção e classificação padronizados pela Rede Brasileira de Bancos de Leite.

Na etapa de liofilização porções de 50 ml de leite humano eram cuidadosamente separadas em recipientes de vidro inerte e estéril e congeladas a - 30°C por 24 horas. Após 24 horas de congelamento os frascos eram colocados na câmara de vácuo do Liofilizador modelo L-108 da marca Liotop®. Cada porção de 50 ml de leite humano originou de 5 a 7 g de leite em pó (liofilizado). A reconstituição do liofilizado (5 a 7 g de pó) era feita com 75 ml de leite humano fluido da mesma doadora gerando como produto final cerca de 80 ml de LioNeo por frasco. A proporção de 7g de liofilizado (em média) para 75 ml de leite humano fluído foi fixa durante a produção. A osmolalidade máxima determinada para o LioNeo foi de 450 mOsm/Kg.

As etapas de pasteurização e controle de qualidade microbiológica eram realizadas após a reconstituição do liofilizado com leite humano fluido. (17) O armazenamento do LioNeo foi

realizado sob congelamento em freezers com temperatura controlada com prazo de validade de 6 meses a partir da data de fabricação.

Os Macronutrientes lipídios totais, proteína total e verdadeira, carboidratos (lactose e oligossacarídeos), sólidos totais e energia total foram analisados em conjunto pelo MIRIS *Human Milk Analyser*®, por espectroscopia infravermelha. A determinação da osmolalidade foi realizada no Osmômetro Microprocessador PZL-1000® através do método de osmometria por congelamento, o perfil lipídico por cromatografia gasosa e micronutrientes por espectrofotometria de absorção atômica em quatro momentos diferentes. Foi descartada a presença de metais pesados e potencialmente tóxicos através da análise por espectrometria de massa por indução de plasma. (28,29,38)

O porcionamento do LioNeo ocorreu nas dependências do lactário do HCFMRP-USP pelos nutricionistas do estudo responsáveis por essa atividade. O LioNeo era descongelado em banho maria elétrico com temperatura controlada por dupla checagem (visor do aparelho e termômetro químico) a temperatura de 40°C. Após o descongelamento os frascos com a porção de 80 ml de LioNeo prontos para o consumo eram transferidos para a capela de fluxo laminar, exclusiva para manipulação de leite humano, previamente higienizada com álcool 70% e não tecido descartável “*wiper*”. Os materiais de apoio para o porcionamento (avental, campo de algodão e frascos de vidro) eram esterilizados em autoclave no serviço do HCFMRP-USP. As seringas, suas respectivas tampas e luvas eram descartáveis, embaladas individualmente e estéreis. O volume suficiente de LioNeo para suprir 24h de alimentação de cada participante era dosado nas seringas de acordo com a prescrição médica por horário.

**Figura 1** – Fluxograma de produção do leite humano com liofilizado de origem humana

### LEITE HUMANO DOADO - CRU

Processos de Seleção e Classificação

- Verificação de sujidades
- Off-flavor
- Condições da embalagem
- Cor
- Acidez Dornic
- Crematócrito

### 50 ml do LEITE HUMANO CRU

(Obs.: Serão congeladas em frasco de vidro inerte e estéril por no mínimo 24hrs em freezer - 30°C e depois serão colocadas no Liofilizador L108®, LioTop para iniciar o ciclo de liofilização por 72hrs.)

### RECONSTITUIÇÃO COM 75 ml de LEITE HUMANO CRU

dando origem ao

### CONCENTRADO COM LIOFILIZADO DE LEITE HUMANO

(Obs.: Após serem retiradas do liofilizador, mantêm-se a cadeia de frio até serem reconstituídas com leite humano cru.)

### PASTEURIZAÇÃO

(Obs.: Os concentrados são levados para o banho maria por 30 min a 62,5°)

### RESFRIAMENTO

(Obs.: O concentrado é resfriado em banho de gelo até atingir 5°C e depois é mantido em cadeia de frio até seguir para o Controle de Qualidade Microbiológico)



Fonte: Elaborado pela equipe do estudo.

### **3.5.2 Preparo do leite humano com aditivo de origem animal (LHFM85)**

A preparação do leite humano com aditivo de origem animal ocorreu nas dependências do lactário do HCFMRP-USP pelos nutricionistas do estudo responsáveis por essa atividade. O LNO maduro pasteurizado era descongelado em banho maria elétrico com temperatura controlada por dupla checagem (visor do aparelho e termômetro químico) a temperatura de 40°C. Após o descongelamento o LNO era transferido para a capela de fluxo laminar, exclusiva para manipulação de leite humano, previamente higienizada com álcool 70% e não tecido descartável “*wiper*”. Os materiais de apoio para o porcionamento (avental, campo de algodão e frascos de vidro) eram esterilizados em autoclave no serviço do HCFMRP-USP. As seringas, suas respectivas tampas e luvas eram descartáveis, embaladas individualmente e estéreis.

O aditivo a base de leite de vaca FM85® era adicionado ao LNO e homogeneizado por agitação manual na proporção de 4% (1g para 25 ml de LNO) no volume total necessário para suprir 24h de alimentação do participante. O leite fortificado era então dosado nas seringas de acordo com a prescrição médica por horário. O aditivo a base de leite de vaca FM85® da marca Nestlé® é composto basicamente de proteína hidrolisada do soro do leite de vaca, porém também contém maltodextrina e lipídeos (gordura vegetal e gordura animal). Na concentração de 4% orientada pelo fabricante, que foi a utilizada no nosso estudo, o LNO com o referido aditivo (LHFM85) possui osmolalidade de 390mOsm/Kg H<sub>2</sub>O, segundo informações da marca de ampla divulgação no site Pediatria Nestlé. (39)

Todas as atividades executadas pelos nutricionistas no lactário do HCFMRP-USP estão detalhadamente descritas no Manual operacional padronizado para o porcionamento de leites fortificados do Projeto LioNeo. (ANEXO C) Os nutricionistas e a farmacêutica responsável pela produção e envio do LioNeo e LNO foram previamente treinados por profissionais do BLH e do lactário do HCFMRP-USP.

### **3.5.3 Alimentação dos recém-nascidos**

Os RNMBP pertencentes ao Grupo A (intervenção) foram alimentados com LioNeo e os do Grupo B (controle) com LHFM85 durante os 21 dias de acompanhamento, salvo as interrupções orientadas pela equipe médica em virtude de alguma ocorrência.

O leite humano pasteurizado para a preparação do LHFM85 e o LioNeo, ambos congelados, eram enviados semanalmente para o lactário do HCFMRP-USP pela farmacêutica

da equipe de pesquisa, conforme demanda semanal e armazenados em freezer próprio do estudo sob temperatura controlada. Os nutricionistas foram responsáveis pelo recebimento, controle de estoque, assim como pelo preparo final das dietas no lactário.

Diariamente frascos de LNO e/ou LioNeo eram descongelados de acordo com a prescrição médica e consequente necessidade (alocação dos participantes e volume) sob temperatura controlada e manipulados com a utilização de material estéril. (ANEXO C)

Os leites fortificados finalizados pelos nutricionistas eram dosados em seringas para consumo nas próximas 24 horas, conforme a rotina do hospital e transportados pelos mesmos para as unidades, onde ficavam em geladeira exclusiva para armazenamento de leite humano. Tinham ainda como última etapa da rotina o lançamento dos dados relacionados a dieta de cada participante no REDCap.

As equipes de enfermagem das unidades eram responsáveis por administrar as dietas encaixando as seringas na bomba de infusão nos horários previstos de acordo com o Protocolo para nutrição enteral de recém-nascidos pré-termo/ HCFMRP-USP. Vale ressaltar que a velocidade de infusão da dieta, assim como a sua progressão seguiram o referido protocolo que já faz parte da rotina das unidades de internação neonatais. (ANEXO D)

Os participantes começaram a receber a dieta do projeto após a alimentação por sonda atingir um volume mínimo de 100 ml/Kg/dia e foram acompanhados por 21 dias consecutivos, respeitando um volume máximo 160 ml/Kg/dia. Qualquer interrupção da alimentação foi decidida pela equipe médica das unidades. A equipe médica tinha controle para prescrever o volume ou suspender a dieta, se necessário. A equipe do projeto não interferiu nas decisões médicas. (ANEXO D) (40,41)

As mães que tinham condições de oferecer o seu próprio leite aos seus filhos foram orientadas como realizar a ordenha, a fim de evitar contaminações e estimuladas a seguir com a amamentação. Prioritariamente, o leite materno ordenhado era oferecido aos RNMBP, também através da sonda. Seguimos a transição para a via oral entre 32 e 34 semanas de idade gestacional, se o prematuro estivesse sem suporte ventilatório, com dieta total e após avaliação fonoaudiológica do processo de sucção-deglutição-respiração. Os RNMBP com condições adequadas receberam o LNO no copinho e foram ao seio materno sob supervisão. (ANEXO D)

Para os participantes que tinham condições de receber leite de suas próprias mães a dieta do estudo foi oferecida e contabilizada como complemento. Todo o volume recebido e não consumido de dieta do estudo foi devidamente anotado no REDCap de acordo com o Manual operacional padronizado para coleta de dados do Projeto LioNeo. (ANEXO E)

No Quadro 2 temos a composição nutricional das dietas administradas por grupo, assim como do leite humano (LH) puro em linha de base utilizado para as preparações das mesmas. Usamos leite humano maduro como padrão para a preparação dos aditivos. Seguem os dados de energia, macro e micronutrientes por 100 ml de leite humano de base (LHB), leite humano concentrado com liofilizado de origem humana (LioNeo) e leite humano enriquecido com aditivo comercial FM 85® da marca Nestlé® à base de proteína de leite de vaca (LHFM85) na de concentração de 4%.

**Quadro 2** – Energia, macro e micronutrientes do leite humano em linha de base e com aditivos por 100 ml [Média (Desvio Padrão)]

<b>Componentes</b>	<b>Linha de base</b>	<b>Grupo A Intervenção</b>	<b>Grupo B Controle</b>
<b>Energia e Nutrientes</b>	<b>LH</b>	<b>LioNeo</b>	<b>LHFM85</b>
Energia (kcal)	56.3 (10.5)	80.0 (13.7)	73.5 (10.5)
Proteína (g)	0.9 (0.5)	1.5 (0.6)	2.3 (0.5)
Carboidrato (g)	7.1 (0.7)	9.2 (0.7)	8.4 (0.7)
Total lipídios (g)	2.6 (1.1)	4.0 (1.4)	3.3 (1.1)
Cálcio (mg)	23.2 (4.7)	36.5 (7.2)	99.2 (4.7)
Magnésio (mg)	2.3 (0.5)	3.7 (0.7)	6.3 (0.5)
Sódio (mg)	13.1 (9.8)	22.3 (16.9)	49.9 (9.1)
Potássio (mg)	60.1 (14.8)	101.4 (26.9)	108.1 (14.8)
Cobre (µg)	33.4 (14.6)	48.3 (19.9)	85.4 (14.6)
Zinco (mg)	0.1 (0.1)	0.2 (0.1)	1.1 (0.1)
Fósforo (mg)	14.8 (6.0)	18.5 (6.0)	58.5 (6.3)
Ferro (mg)	0.1 (0.0)	0.1 (0.0)	1.9 (0.0)

Fonte: Elaborado pela autora com base em Oliveira et al. (28)

É importante ressaltar que as dosagens sanguíneas de micronutrientes de todos os participantes, independente do grupo, foram monitoradas pela equipe médica e a suplementação foi realizada conforme necessário.

### 3.5.4 Reações adversas

Em conjunto com os médicos assistentes do Serviço de Neonatologia do HCFMRP-USP, antes do início do estudo, foram revisadas as normas gerais de introdução e manejo da dieta enteral para RNMBP quanto ao início, progressão, interrupção e suspensão. (ANEXO D)



Diariamente, os participantes foram avaliados pelos médicos assistentes das unidades e pelas enfermeiras da pesquisa para os eventos adversos ocorridos. Os eventos adversos foram monitorados e classificados por um médico da equipe de pesquisa (cego). Todos receberam treinamento sobre os eventos esperados em dois momentos: antes do projeto ser iniciado e durante a sua execução. O treinamento consistiu em uma apresentação oral com foco nas reações adversas e na entrega de folhetos. Além disso, uma pasta com o detalhamento do projeto esteve disponível em ambas as unidades de internação para qualquer dúvida. As reações adversas com suas respectivas definições e qual a ação tomada frente as ocorrências estão descritas abaixo. As reações adversas foram anotadas em formulário próprio na plataforma REDCap, assim como no prontuário eletrônico do paciente.

- a) diarreia é o aumento do conteúdo líquido das fezes ou número de evacuações fora do padrão normal observado. Para a classificação será utilizada a pontuação conforme segue, 3 para fezes mole, 2 para líquida e 1 para aguada: (31)
  - ação: avaliação médica sobre continuidade ou não da dieta.
- b) regurgitação é o retorno não abrupto de pequeno volume do conteúdo gástrico (leite) à boca.
- c) vômito é o retorno de uma quantidade maior de alimentos com o esvaziamento mais completo do estômago e que geralmente ocorre em algum momento após a alimentação:
  - ação: avaliação médica sobre continuidade ou não da dieta de acordo com conteúdo expelido e recorrência.
- d) distensão abdominal é o aumento da circunferência abdominal maior que 10% em relação à última medida rotineira não considerada distensão:
  - ação: avaliação médica sobre continuidade ou não da dieta dependendo da presença de dor e/ou aspecto do abdômen (vermelhidão, alças visíveis entre outros) e/ou associação com vômitos e diarreia e/ou resíduos anômalos (sanguinolentos ou esverdeados), testados se necessário.
- e) sangramento gastrointestinal é detectado pela avaliação clínica (observação) de presença de melena, hematêmese ou enterorragia:
  - ação: avaliação médica sobre continuidade ou não da dieta dependendo da quantidade e causa.
- f) perfuração gastrointestinal é o conjunto de sinais clínicos e/ou radiológicos de perfuração com entrada de ar livre na cavidade peritoneal, sem qualquer sinal de EN, que deve ser excluída.

- g) enterocolite necrosante foi diagnosticada pelos Critérios de Bell 1B ou mais grave, verificada por método clínico, radiografia seriada de abdômen, ultrassonografia de abdômen, hemogramas, PCR e hemoculturas. Eventualmente laparotomia exploratória. A incidência média descrita na literatura varia de 3,2% a 10,9%, mas, não obstante, qualquer evento de EN foi considerado um efeito adverso grave: (42,43)
- ação: suspensão da dieta (mínimo de 1 semana) + antibioticoterapia.
- h) morte: mortalidade deve ser inferior a 10% para recém-nascidos de muito baixo peso ( $\leq 1500\text{g}$ ).
- i) sepse neonatal tardia foi diagnosticada na presença dos seguintes sintomas:
- gerais: febre, instabilidade térmica, edema, má-alimentação, mau aspecto;
  - gastrointestinais: distensão abdominal, vômito, diarreia ou hepatomegalia;
  - sistema respiratório: apneia, dispneia, taquipneia, retrações intercostais, batimento de asas nasais, gemência e cianose;
  - sistema renal: oligúria;
  - sistema cardiovascular: palidez, pele com aspecto mosqueado, fria ou pegajosa, taquicardia, hipotensão ou bradicardia;
  - sistema Nervoso Central: irritabilidade, letargia, tremores, crises convulsivas, hiporreflexia, hipotonia, reflexo de Moro anormal, respiração irregular, fontanela abaulada, choro anormal;
  - sistema hematológico: icterícia, esplenomegalia, palidez, petéquias, púrpura e sangramento.

Análises laboratoriais no quadro de sepse: hemograma com leucocitose, desvio à esquerda ou leucopenia, com alterações qualitativas como granulações tóxicas e microvacúolos. Identificação de bactéria ou fungo por hemocultura, cultura de líquido ou urina. A sepse foi confirmada por cultura, sendo que os RNMBP foram divididos entre sepse suspeita e confirmada de acordo com o resultado do referido exame.

- ação: A dieta foi suspensa até o retorno da estabilidade hemodinâmica completa e se em associação com EN, por no mínimo 7 dias + antibioticoterapia. (44)

### Quadro 3 – Classificação quanto a gravidade dos eventos adversos analisados no estudo

Evento adverso	Classificação
Enterocolite necrosante	Grave
Morte	Grave
Sangramento gastrointestinal profuso	Grave
Sangramento gastrointestinal moderado	Moderado
Sangramento gastrointestinal leve	Leve
Vômitos isolados	Leve
Vômitos repetidos com baixa frequência (até 3 vezes por dia)	Moderado
Vômitos repetidos com alta frequência (maior que 3 vezes por dia)	Grave
Diarreia profusa	Grave
Diarreia sem repercussão do estado de hidratação	Leve
Distensão abdominal >10%	Leve
Distensão abdominal >20%	Moderado
Distensão abdominal >30%	Grave
Sepse neonatal tardia suspeita	Leve
Sepse neonatal tardia confirmada	Moderado
Sepse neonatal tardia suspeita com choque	Grave
Sepse neonatal tardia confirmada com choque	Grave

Fonte: Elaborado pela equipe do estudo.

Testamos a segurança quanto ao aparecimento de EN, morte, sepsis neonatal tardia, choque séptico ou sangramento gastrointestinal. A tolerância foi definida como vômito, diarreia, distensão abdominal ou suspensão da dieta por qualquer período.

#### 3.5.5 Comitê interno e externo de avaliação de segurança

Foi criado um comitê interno (CI) dos pesquisadores do estudo para avaliar os eventos adversos. Durante a coleta de dados os eventos ocorridos foram sistematicamente revisados pelos pesquisadores de forma cega e classificados de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde. (45) O comitê interno foi responsável por avaliar as condutas médicas e a necessidade de acionar o comitê externo (CE) de avaliação de segurança, composto antes do início do estudo. Segue abaixo o Quadro 4 utilizado para apoiar a avaliação dos eventos:

#### Quadro 4 – Critérios de avaliação dos eventos adversos de acordo com a causalidade

Termo de causalidade	Critérios de Avaliação*
Certeza	Anormalidade de eventos ou testes laboratoriais, com relação de tempo plausível ao consumo de drogas; Não pode ser explicado por doença ou outras drogas; Resposta à retirada plausível (farmacologicamente, patologicamente); Evento definitivo farmacologicamente ou fenomenologicamente (ou seja, um distúrbio médico objetivo e específico ou um quadro fenômeno farmacológico); Reposição satisfatória, se necessário.
Provável	Anormalidade de eventos ou testes laboratoriais, com relação de tempo razoável ao consumo de drogas; É improvável que seja atribuído a doenças ou outras drogas; Resposta à retirada clinicamente razoável; Não há necessidade de reposicionamento.
Possível	Anormalidade de eventos ou testes laboratoriais, com relação de tempo razoável ao consumo de drogas; Também pode ser explicado por doença ou outras drogas; Informações sobre a retirada de medicamentos podem estar ausentes ou pouco claras.
Improvável	Evento ou anormalidade no teste laboratorial, com um tempo até a ingestão de medicamentos que torna um relacionamento improvável (mas não impossível); Doença ou outras drogas fornecem explicações plausíveis.
Condicional/ Não classificável	Anormalidade de teste de laboratório ou evento; Mais dados para avaliação adequada são necessários ou dados adicionais sob exame.
Inacessível/ Não classificável	Relatório sugerindo uma reação adversa; Não pode ser julgado porque a informação é insuficiente ou contraditória; Os dados não podem ser complementados ou verificados.

\*Todos os pontos devem ser razoavelmente cumpridos.

Fonte: Elaborado pela equipe do estudo com adaptação de WHO-UMC *Causality Categories*. (46)

Todos os eventos adversos graves, possivelmente relacionados com a dieta foram notificados CE, que tomou decisão clinicamente embasada sobre a necessidade de abertura do cegamento e interrupção do estudo.

O CE foi responsável pela análise interina realizada quando foi randomizado o 20º participante, ou seja, em 50% da quantidade amostral prevista. O intuito foi analisar os dados de forma não cega e decidir se o estudo poderia prosseguir. As frequências de eventos adversos para possível interrupção do ensaio clínico foram definidas de acordo com a Rede Vermont Oxford para o serviço brasileiro. (47) O referido comitê teve a liberdade de interromper a pesquisa se observasse que a intervenção estivesse causando mais eventos adversos do que o esperado ou se os participantes estivessem expostos à riscos desnecessários. Todos os três membros do CE concordaram que o estudo estava apto a seguir.

### **3.6 Coleta de dados**

Os participantes tiveram seus dados clínicos, antropométricos e de alimentação coletados e registrados, durante 21 dias, por uma das enfermeiras do estudo na plataforma REDCap e no prontuário eletrônico do hospital.

Os dados coletados relacionados a alimentação foram volume total consumido de dieta, quantidade de dias de ingestão e média por dia de ingestão de acordo com o grupo randomizado. O volume ingerido foi mensurado em mililitros em valores absolutos e por quilo de peso do prematuro.

A avaliação diária consistia na aferição de peso corporal, circunferência abdominal, registro do volume de leite efetivamente ingerido e a verificação de ocorrência de eventos adversos (desfechos). Todos os dados foram conferidos pela gerente de projeto e quaisquer inconsistências foram resolvidas até o final da semana corrente. Se o participante apresentasse algum evento adverso, um médico da equipe de pesquisa (cego) monitoraria de perto junto com a equipe médica da unidade de internação. Adicionalmente, foram também avaliados dados complementares em 5 momentos específicos, conforme descritos abaixo:

- a) 1° e 22° dias: aferição de comprimento, perímetro cefálico e coleta de sangue, urina e fezes;
- b) 4°, 7° e 14° dias: aferição de comprimento e perímetro cefálico.

#### **3.6.1 Dados antropométricos**

Os dados antropométricos foram coletados pela equipe de enfermagem do estudo, previamente treinada, seguindo os passos descritos a seguir:

- a) peso corporal: avaliação realizada em gramas com a utilização de balança eletrônica tipo Filizola Baby®, específica para a idade, calibrada, com capacidade máxima de 15 Kg e mínima de 125 g, precisão de 5 g. Os prematuros foram avaliados deitados e sem roupa;
- b) comprimento: avaliação realizada em centímetros, por meio de uma régua antropométrica (com lâminas de acrílico unidas de forma retangular), a qual permite o encaixe no berço ou incubadora, com uma escala de 0,1 cm e comprimento mínimo de 0,35 m. Para a aferição, foram retirados dos prematuros todos os adereços de cabeça, sapatos e meias e colocados em posição anatômica, deitados sobre a base do antropômetro, com os braços livremente soltos ao longo do tronco, os calcanhares unidos e tocando a borda vertical do

aparelho, as nádegas, as escápulas e o occipício também tocando a borda vertical do aparelho. Com a cabeça segura entre as mãos, o cursor do aparelho foi colocado sobre o ponto mais alto da mesma com pressão suficiente para comprimir o cabelo e a planta dos pés e a medida registrada;

- c) perímetro cefálico (PC): avaliação realizada com a utilização de fita métrica inelástica e inextensível com precisão de 0,1 cm posicionada sobre a região supraorbitária (anterior, logo acima das sobrancelhas) e passando pela proeminência occipital (posterior, maior protuberância posterior da cabeça), através do ajuste da fita à cabeça do paciente, de forma firme e sem comprimir. Foi registrado o maior perímetro após nivelamento da fita.

Os dados antropométricos (peso, comprimento e perímetro cefálico) aferidos durante o estudo foram convertidos em escore Z ou percentil usando as curvas de referência de crescimento do consórcio internacional para o crescimento fetal e neonatal Intergrowth 21<sup>st</sup>, específicas para cada sexo (33). O mesmo método foi utilizado para avaliar o peso de nascimento (registrado em prontuário) para classificação segundo a idade gestacional na admissão ao estudo, conforme segue:

- a) pequeno para idade gestacional (PIG):
  - percentil menor que 10.
- b) adequado para idade gestacional (AIG):
  - percentil maior ou igual a 10 e menor ou igual a 90.

Também foi calculado índice de Röhrer no período pós-natal imediato (relação entre peso e o cubo do comprimento corporal de nascimento) para avaliar o tipo de crescimento intrauterino, indicando a proporcionalidade entre essas medidas: valor menor que 2,2 foi classificado como crescimento retardado, valor entre 2,2 a 3,0 foi classificado como crescimento normal (adequada proporção) e valor maior que 3,0 como crescimento excessivo.

### **3.6.2 Dados bioquímicos**

A coleta de material biológico (sangue, urina e fezes) foi executada pelas enfermeiras do estudo e o pedido dos exames bioquímicos foi solicitado pelos médicos das unidades de internação. O volume de sangue permitido para a realização de exames corresponde até 10% do volume total de sangue da criança durante um período de 8 semanas, numa única ocasião ou em partes separadas, em seres humanos saudáveis e com um hematócrito não inferior ao valor

mínimo aceitável para a idade gestacional e cronológica. Para o presente estudo, o volume máximo coletado não excedeu 3,5 ml. (48)

Seguem as dosagens sanguíneas realizadas:

- a) sódio, potássio, magnésio, cloro, cálcio, fósforo, cobre, zinco, glicemia, fosfatase alcalina, proteína total, albumina, uréia, creatinina e ferro.

Foram aceitos valores de coletas dos exames acima realizados previamente com tolerância de até dois dias antes ou depois da data da coleta prevista para o estudo com o intuito de preservar o participante. Os resultados dos exames bioquímicos não foram analisados nesse estudo, pois não faziam parte dos objetivos elencados.

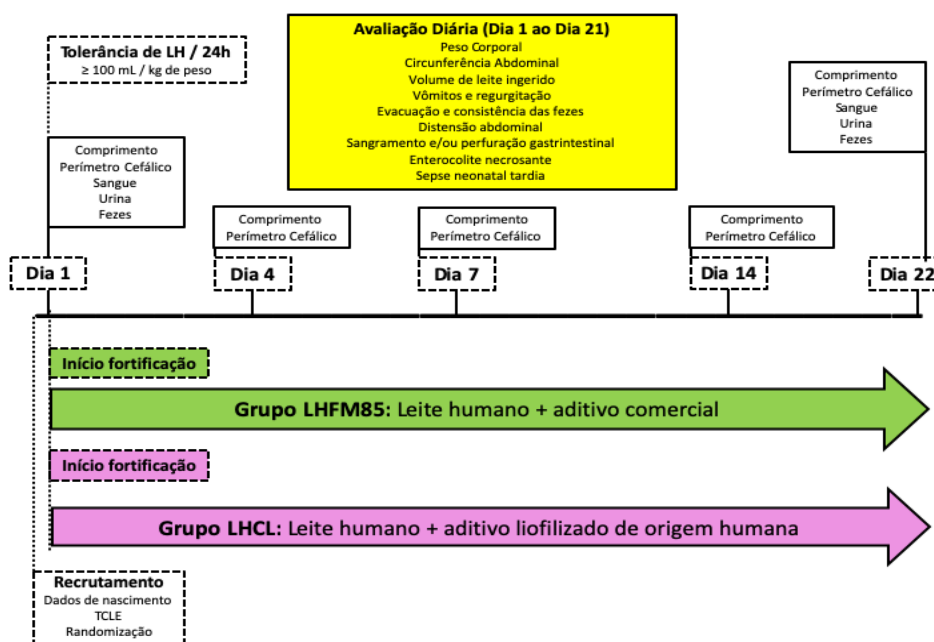
O exame de urina visa avaliar o perfil de ácidos orgânicos e o de exame de fezes a microbiota intestinal. O padrão das fezes foi avaliado de acordo com a frequência e consistência, conforme segue, 5 = dura; 4 = formadas; 3= mole; 2= líquida ou 1= aguada. (31)

As amostras de fezes e urina de todos os participantes foram armazenadas. Todo material orgânico coletado foi encaminhado ao Laboratório Central HCFMRP-USP ou para o Laboratório de Metais e Doenças Raras FMRP-USP.

Os dados bioquímicos, assim como as amostras de urina e fezes dos participantes serão analisadas em outras etapas do Projeto LioNeo.

Para melhor visualização da organização do estudo com relação ao acompanhamento e coleta de dados, segue fluxograma na Figura 2.

**Figura 2** – Fluxograma de entrada e acompanhamento dos participantes na fase 1



\*A dieta foi administrada, conforme programação da rotina do hospital, às 21h do Dia 1, por isso os 21 dias de acompanhamento terminavam às 18h do Dia 22.

Fonte: Elaborado pela equipe do estudo.

É importante informar que foi gerado um calendário na plataforma REDCap para cada um dos participantes e que quando o D1 ou D22 ocorreram durante o final de semana, a programação da coleta de material biológico foi postergada para o próximo dia útil em decorrência ao funcionamento restrito dos laboratórios (regime de plantão) aos finais de semana.

### **3.7 Análise estatística**

Foi elaborada uma análise exploratória detalhada dos dados, por meio de tabelas contendo medidas de tendência central, dispersão, frequências absolutas e relativas.

Modelos de regressão log-binomial simples e múltiplo foram ajustados para estimar os riscos relativos de eventos adversos entre os grupos e intervalos de confiança de 95% (IC).

Ao longo dos 21 dias, os indivíduos poderiam apresentar um mesmo evento adverso (desfecho) mais de uma vez, se determinado evento ocorreu, pelo menos uma vez, o indivíduo foi classificado como positivo, independentemente do número de ocorrências.

Ao comparar as médias de ocorrência dos principais desfechos (vômito, regurgitação, distensão abdominal, sangramento gastrointestinal, perfuração gastrointestinal, EN e sepse neonatal tardia), acumulados por indivíduo (considerando o total de eventos contabilizados durante os 21 dias), entre os grupos, utilizamos modelos de regressão simples e múltiplo baseados na distribuição de Dupla Poisson. O modelo de regressão múltiplo foi ajustado considerando o volume de leite ingerido como covariável. Este modelo é mais adequado para dados contados, uma vez que não assume que a média deve ser igual à variância, como o modelo de Poisson padrão.

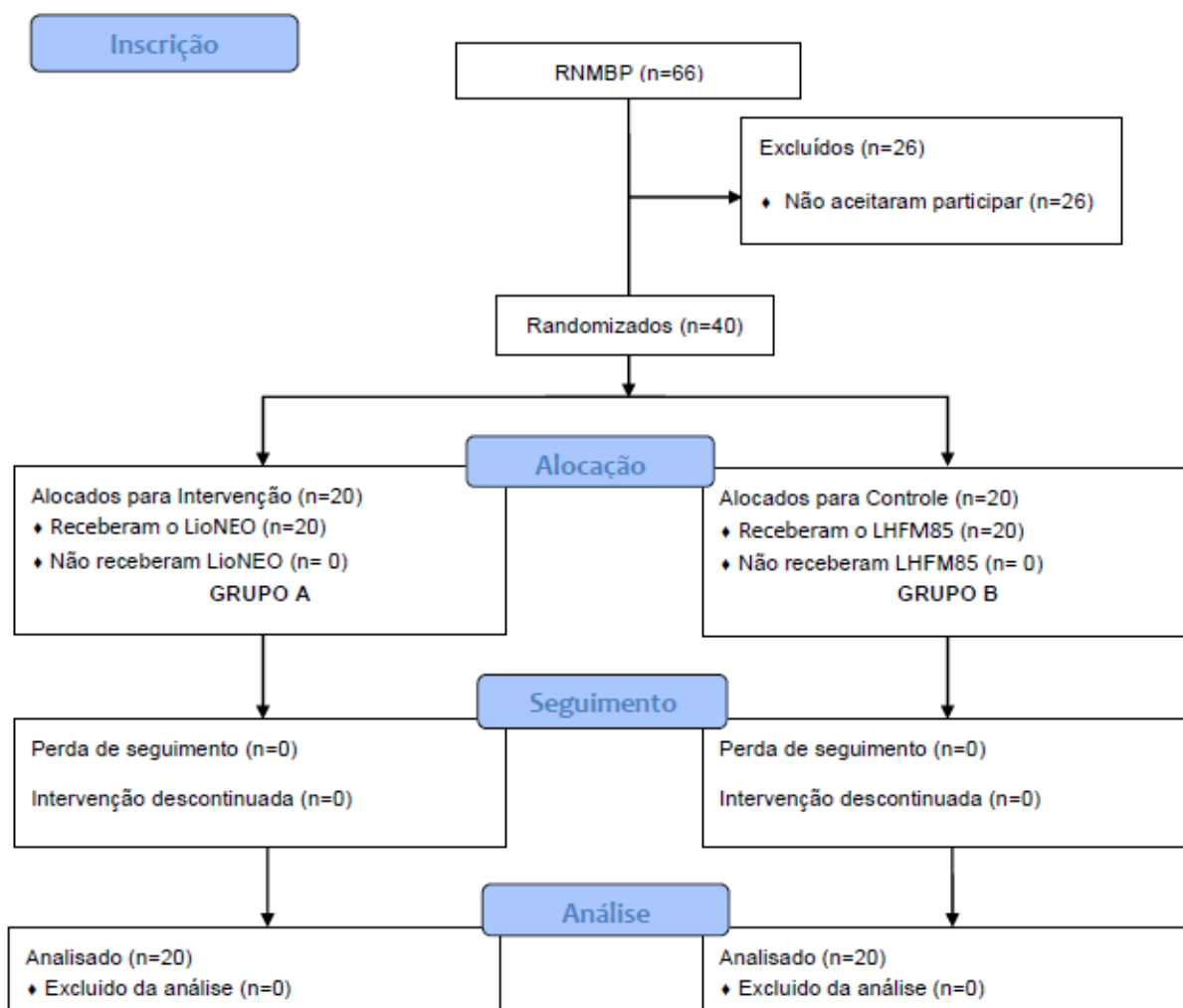
As comparações da ingestão diária de leite foram feitas através do modelo de regressão linear. O software utilizado foi o SAS 9.4 (SAS Foundation, USA) e o nível de significância adotado de 5%.



## 4 RESULTADOS

Sessenta e seis pacientes elegíveis foram recrutados no período de 6 de maio de 2019 a 6 de abril de 2020, desse grupo 40 RNMPB foram incluídos no estudo. Os dados dos participantes foram coletados e inseridos na plataforma REDCap, de acordo com o diagrama de fluxo apresentado na Figura 3. (49) Os 40 participantes foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos (Grupo A – LioNeo n = 20 e Grupo B – LHF85 n = 20).

**Figura 3** – Diagrama de fluxo – CONSORT 2010



Fonte: Elaborado pela autora com base em Cobos-Carbó e Augustovski. (49)

A descrição das principais características dos participantes, no momento de inclusão, separados por grupos de acordo com a randomização, pode ser encontrada nas Tabelas 1 e 2.

Inicialmente foram aferidos peso ao nascer (g), idade gestacional (semanas), comprimento ao nascer (cm), perímetro cefálico ao nascer (cm), idade no momento de inclusão no estudo (dias). Os grupos A – LioNeo e B – LHF85 possuíam características semelhantes e comparáveis.

As principais características foram similares entre os dois grupos: 1220±200g de peso ao nascer e 30.4±2,6 semanas de idade gestacional para o Grupo A – LioNeo e 1219±204g de peso ao nascer e 29.7±1,7 semanas de idade gestacional para o Grupo B – LHF85.

**Tabela 1** – Caracterização da população do estudo através da idade gestacional, antropometria (peso, comprimento e perímetro cefálico) e idade cronológica no momento de inclusão de acordo com o grupo

	Grupo A – LioNeo					Grupo B – LHF85				
	Média	Desvio padrão	Q1	Mediana	Q3	Média	Desvio padrão	Q1	Mediana	Q3
Idade gestacional*	30.45	2.68	28.50	30.50	32.50	29.70	1.75	28.50	30.00	31.00
Peso ao nascer (g)	1220.00	200.69	1090.00	1242.50	1393.00	1219.30	204.78	1063.00	1255.00	1373.00
Comprimento ao nascer (cm)	38.08	2.17	36.00	38.00	40.00	37.77	2.89	36.00	39.00	40.00
PC ao nascer (cm)	27.50	1.67	26.25	28.00	29.00	27.03	1.41	25.50	27.50	28.50
Idade na inclusão (dias)	11.40	8.92	6.00	9.50	12.00	12.05	6.44	7.00	10.00	16.50

\*A idade gestacional está expressa em semanas de gestação.

Com relação ao sexo, os indivíduos foram divididos em 11 meninas ♀ no Grupo A – LioNeo (52,38%) e 10 no Grupo B – LHF85 (50%) e 9 meninos ♂ no Grupo A – LioNeo (47,92%) e 10 no Grupo B – LHF85 (50%), de acordo com Tabela 2.

**Tabela 2** – Descrição por sexo, no recrutamento, de acordo com o grupo

Sexo	Grupos (n = 20)	
	A – LioNeo	B – LHF85
Feminino	11	10
Masculino	9	10
<b>Total (n=40)</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

Para a verificação da evolução antropométrica dos RNMBP aferimos peso (g), comprimento (cm) e perímetro cefálico (cm) no dia de entrada no estudo (D1) e ao término do acompanhamento (D22). Os dados estão agrupados na Tabela 3.

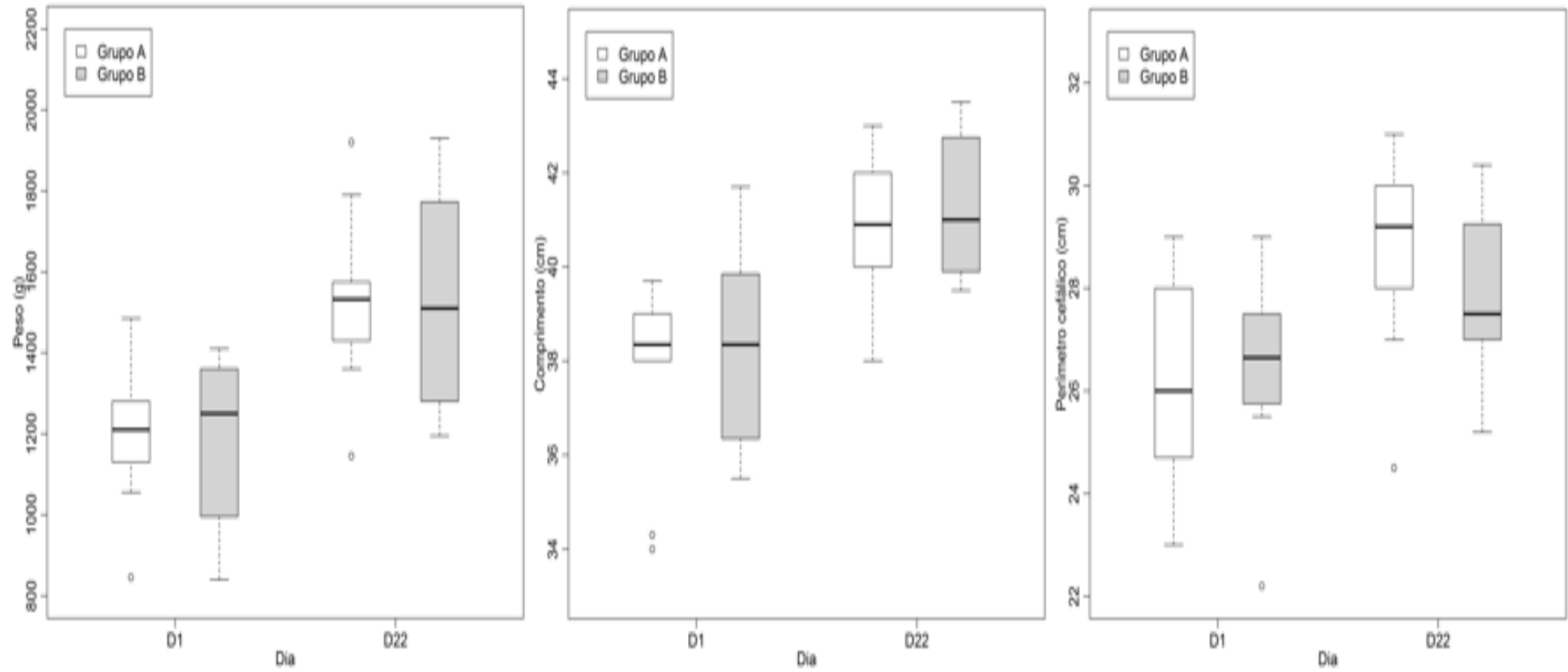
**Tabela 3** – Descrição das variáveis de crescimento dos RNMBP (peso, comprimento e perímetro cefálico) durante o seguimento (1° e 22° dia), de acordo com o grupo

Variável	Grupo A - LioNeo					Grupo B - LHF85				
	Média	Desvio padrão	Q1	Mediana	Q3	Média	Desvio padrão	Q1	Mediana	Q3
Peso (1°dia)	1222.80	178.09	1105.00	1210.00	1355.00	1254.30	200.43	1185.00	1275.00	1388.00
Comprimento (1°dia)	38.46	2.33	36.90	38.50	39.85	38.85	2.20	37.30	38.75	40.25
*PC (1°dia)	26.34	2.13	24.60	26.00	28.40	26.27	1.99	25.30	26.45	27.75
Peso (22°dia)	1565.30	263.79	1400.00	1557.50	1728.00	1678.50	262.60	1510.00	1687.50	1890.00
Comprimento (22°dia)	41.14	1.92	39.80	41.25	43.00	42.05	2.14	40.80	42.25	43.35
*PC (22°dia)	28.54	2.29	26.30	29.10	30.10	28.39	2.07	27.00	28.65	30.20

\*PC: perímetro cefálico.

Para melhor visualização e comparação das variáveis descritas na Tabela 3, seguem os dados em formato de box plot na Figura 4 com o peso (g), comprimento (cm) e perímetro cefálico (cm) nos momentos de entrada e saída do estudo.

**Figura 4** – Box plot do peso (g), comprimento (cm) e perímetro cefálico (cm), na inclusão no estudo (D1) e ao final do acompanhamento (D22), de acordo com o grupo



Entre os 20 RNMBP do Grupo B – LHF85, foram registradas as seguintes ocorrências: diarreia (1), perfuração gastrointestinal (1), EN (1) e sepse neonatal tardia (1). Esses desfechos não foram analisados ou comparados estatisticamente entre os grupos porque esses eventos não ocorreram no Grupo A – LioNeo. Outros desfechos foram analisados e estão descritos nas Tabelas 4 e 5.

A Tabela 4 apresenta os resultados dos ajustes dos modelos de regressão simples e múltiplo, baseados na distribuição Dupla Poisson, comparando as médias (Grupo B - Grupo A) de contagens de eventos adversos, por indivíduo. Não foram detectadas diferenças entre as médias dos eventos que ocorreram nos dois grupos.

A comparação dos dias de ingestão de dieta apresentou diferença entre as médias de 0.65 dias (IC95% -2.65; 3.95) e valor de p = 0.70. Com relação ao volume total ingerido de dieta nenhuma diferença estatística foi encontrada 191.80 ml (IC 95% -603.72; 987.31) e valor p = 0.63. Para melhor entendimento, consulte os valores de médias descritos na Tabela 6.

**Tabela 4** – Modelos de regressão, simples e múltiplo, baseados na distribuição Dupla Poisson, com comparação de médias (Grupo B - Grupo A) de eventos adversos por indivíduo e o número de dias e volume de ingestão de dieta

	<b>Modelo simples</b>	<b>Modelo múltiplo</b>
	Diferença entre as médias (IC95%)	Diferença entre as médias (IC95%)
Regurgitação	0 (-0.13; 0.13)	0 (-0.06; 0.06)
Vômito	-1.00 (-2.25; 0.25)	-2.02 (-5.05; 1.00)
Distensão abdominal	-0.35 (-1.23; 0.52)	-0.45 (-1.75; 0.84)
Sangramento gastrointestinal	0.10 (-0.56; 0.76)	1.41 (-3.03; 5.85)
Nº de dias de ingestão dieta	0.65 (-2.65; 3.95)	
Volume de dieta ingerido	191.80 (-603.72; 987.31)	

A Tabela 5 descreve todos os desfechos analisados, comparados com modelos de regressão log-binomial, simples e múltiplo. A contagem de positivo para o evento, ocorreu se o indivíduo experimentou, pelo menos uma vez, algum dos desfechos analisados. Não houve diferença nos desfechos que apareceram em ambos os grupos. Vale ressaltar que alguns eventos apareceram somente no Grupo B – LHF85. A distensão abdominal foi o evento mais frequente nos grupos A e B. Trinta e dois participantes apresentaram essa intercorrência pelo menos 1 vez durante o estudo (Grupo A – LioNeo 16 RNMBP e no Grupo B – LHF85 16

RNMBP) e, portanto, foram classificados como positivos para a análise de incidência, ou seja, 80% dos participantes tiveram algum episódio de distensão abdominal no decorrer dos 21 dias de acompanhamento. Os resultados estão expressos em números absolutos de eventos adversos.

Com relação a incidência de eventos adversos graves, foram diagnosticados durante o estudo 1 caso de perfuração gastrointestinal, 1 caso de EN e 1 caso de sepse neonatal tardia, todos no Grupo B – LHF85.

**Tabela 5** – Incidência de eventos adversos, ao final do estudo, de acordo com o grupo e ajustes dos modelos de regressão log-binomial, simples e múltiplo

Desfechos	Grupo		*RR (IC95%)	*RRaj (IC95%)
	A - LioNeo (n=20)	B - LHF85 (n=20)		
Diarréia	0 (0.00)	1 (5.00)	*	*
Regurgitação	2 (10.00)	2 (10.00)	1.00 (0.16; 6.41)	0.95 (0.14; 6.08)
Vômito	12 (60.00)	10 (50.00)	0.83 (0.47; 1.47)	0.93 (0.51; 1.69)
Distensão abdominal	16 (80.00)	16 (80.00)	1.00 (0.73; 1.37)	0.99 (0.70; 1.39)
Sangramento gastrointestinal	2 (10.00)	5 (25.00)	2.50 (0.55; 11.40)	4.94 (0.69; 35.12)
Perfuração gastrointestinal	0 (0.00)	1 (5.00)	*	*
Enterocolite necrosante	0 (0.00)	1 (5.00)	*	*
Sepse neonatal tardia	0 (0.00)	1 (5.00)	*	*

Incidência: se o indivíduo vivenciou um evento pelo menos uma vez, foi classificado como positivo para aquele evento; \*RR: risco relativo; \*IC 95%: intervalo de confiança de 95%; \*RRaj: risco relativo ajustado para o volume total de leite ingerido pelo grupo.

\*: Não foi possível estimar o risco relativo devido à presença de zeros de amostrais.

Por fim, a Tabela 6 descreve a variação de peso (g), comprimento (cm) e PC (cm) e as informações relacionadas à ingestão de dieta durante o acompanhamento de 21 dias, por grupo de estudo.

Em relação ao número de dias de ingestão de dieta, dos 40 participantes do estudo, 21 RNMBP receberam o volume diário prescrito durante todos os dias de acompanhamento (21 dias). A média de número de dias de ingestão de dieta do Grupo A – LioNeo foi de 18 dias (mediana = 21 dias) e do Grupo B – LHF85 foi de 17.35 dias (mediana = 20.50 dias), sem diferença relevante.

**Tabela 6** – Descrição da variação da antropometria (peso, comprimento e perímetro cefálico) e ingestão de dieta (nº de dias e volume) durante o estudo

Variáveis	Grupo A - LioNeo					Grupo B – LHF85				
	Média	Desvio padrão	Q1	Mediana	Q3	Média	Desvio padrão	Q1	Mediana	Q3
*Δ de peso (g)	342.50	115.62	295.00	327.50	427.50	424.25	125.71	352.50	437.50	507.50
Δ de comprimento (cm)	2.68	1.32	1.50	2.65	3.75	3.46	1.30	2.50	3.30	4.20
Δ de *PC (cm)	2.74	1.69	1.50	2.20	3.20	2.25	1.40	1.40	2.20	3.00
Volume total ingerido (ml)	3415.20	1426.50	2432.00	3947.00	4437.00	3607.00	1026.50	2930.00	3679.00	4466.00
Nº dias de ingestão de dieta	17.35	5.98	16.00	20.50	21.00	18.00	4.17	14.00	21.00	21.00
*Me de ingestão dieta/ dia (ml)	192.05	35.95	171.70	200.95	212.10	201.02	39.16	167.30	212.64	225.60

A variação considerada foi do dia 1 ao dia 22. \*Δ: variação; \*PC: perímetro cefálico; Me: média.

Outras análises que não faziam parte do protocolo inicial, como frequência de alimentação, comparação entre grupos e intragrupo de peso, altura e perímetro cefálico, assim como a velocidade de ganho de peso diário, comprimento e perímetro cefálico podem ser encontradas no Apêndice A. Vale ressaltar que esses resultados não faziam parte dos objetivos da fase 1 e, portanto, não foram discutidos no presente estudo.

Todos os dados aqui apresentados estão disponíveis nos documentos eletrônicos do hospital e podem ser auditados conforme a necessidade.

## 5 DISCUSSÃO

Para o melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo clínico a comparar o leite humano concentrado com liofilizado proveniente de leite humano doado produzido em banco de leite humano, como aditivo para RNMBP para a verificação de segurança e tolerabilidade. Não foram encontradas diferenças nos resultados de eventos adversos entre os grupos de estudo, portanto, o aditivo de leite humano de banco foi considerado seguro e tolerável para ser usado nesta população. É notável que nenhum participante do grupo LioNeo teve diarreia, perfuração gastrointestinal, EN e sepse neonatal tardia. Não houve morte e não foram observadas diferenças relevantes em relação aos desfechos primários. Os dias de interrupção da dieta foram similares a todos os RNMBP inscritos, independentemente do tipo de aditivo que estavam recebendo. Todos os participantes do estudo apresentaram crescimento semelhante no que concerne aos parâmetros antropométricos observados. Para a verificação de segurança e tolerabilidade, os principais eventos adversos que poderiam ocorrer com o uso de fortificantes durante o estudo foram observados de perto.

O leite humano é o alimento padrão ouro para prematuros. Mesmo com forte apoio e encorajamento a amamentação muitas vezes pode ser um desafio para a mãe durante a internação hospitalar do seu filho, considerando as características de imaturidade dos RNMBP. Sabe-se que o leite humano de banco é uma alternativa segura quando o leite da própria mãe não está disponível. (50,51) Assim, para proporcionar a melhor nutrição ao lactente, é comum utilizar leite humano proveniente de doação em adição ao leite cru da mãe. (52) Artigo publicado em 2016 analisou o impacto da disponibilidade de leite humano doado na amamentação e as taxas de EN e observou que o uso de leite humano de banco para RNMPB aumentou em 10% a taxa amamentação na alta hospitalar e reduziu a incidência de EN em 2,6% (53). Há algumas tentativas recentes de concentrar o leite humano em até 30% dos nutrientes o que consideramos um avanço. (52) Nosso método foi capaz de concentrar 60% dos nutrientes. (28)

Na comparação do comprimento (cm), peso (g) e o perímetro cefálico (cm) entre os participantes não houve diferenças independente do grupo ao qual pertenciam, apesar da diferença no teor de proteína dos aditivos. Esse fato pode levar a uma discussão complexa sobre nutrição em RNMBP como um todo, no que diz respeito à importância de todos os nutrientes e não apenas do nível de proteína, mas que não faz parte do escopo deste trabalho. Com relação à quantidade diferente de micronutrientes nos aditivos, em especial o cálcio e o fósforo, todos



os participantes foram testados durante a internação e quaisquer deficiências de micronutrientes foram suplementadas conforme necessário. É importante colocar que alguns RNMBP não receberam a intervenção direta durante os 21 dias, devido a distensão abdominal ou vômito (provavelmente relacionado a maior osmolalidade de ambos os aditivos), embora sem relevância clínica.

A enterocolite necrosante é um efeito adverso importante de etiologia multifatorial, facilitada, por exemplo, pela utilização de fórmula infantil na alimentação, uso de antibióticos, asfixia e isquemia, entre outros fatores. O leite materno exerce efeito protetor para os prematuros. Tal proteção oferecida pelo leite materno é dose-dependente. (54) Foi observado também que, qualquer volume de leite humano é melhor que a fórmula infantil e quanto maior a dose, maior a proteção que o leite humano possivelmente oferece para redução de outras complicações importantes como a sepse neonatal tardia, a retinopatia da prematuridade grave e a EN. (55) Estudo de coorte realizado na Alemanha com 1433 RNMBP mostrou maior ganho de peso em prematuros alimentados com fórmula pré-termo comparados aos que receberam leite humano, porém a alimentação exclusivamente com fórmula infantil foi associada a riscos aumentados de displasia broncopulmonar (OR 2.6), bem como EN (OR 12.6) e retinopatia da prematuridade (OR 1.80) após o controle de fatores de risco conhecidos. (56) Reforçando esses achados, extensa revisão sistemática com ensaios clínicos controlados da Cochrane Library, comparando fórmula infantil com leite humano doado para alimentação de prematuros ou de baixo peso ao nascer encontrou menor incidência de EN em prematuros ou com baixo peso ao nascer que receberam leite humano doado (RR 1,87, 1,23-2,85 IC 95%). (57) Outra revisão sistemática interessante com meta-análise sobre a alimentação com leite humano e morbidade em RNMBP também mostrou o efeito protetor do leite humano contra a EN e redução de 4% na incidência da doença. (55) Há também os custos hospitalares relacionados à EN que poderiam ser evitados com a utilização apenas de aditivos a base de leite humano para recém-nascidos pré termo. (14) Para o controle do presente estudo foi utilizado leite humano com aditivo comercial multinutrientes FM85® (Nestlé®), que possui em sua formulação apenas parte da proteína do leite de vaca e é específico para esse tipo de suplementação para recém-nascidos prematuros, se diferenciando das demais fórmulas infantis, porém o único caso de EN que ocorreu durante o presente estudo foi justamente no Grupo B – controle, fato esse que coincide aos apontamentos das publicações aqui citadas.

A sepse neonatal tardia é uma das principais causas de mortes neonatais em todo o mundo. De acordo com as tendências globais, corresponde a 2,6% de todas as mortes. (58) Os RNMBP

apresentam maior risco de desenvolver essa complicação devido a imaturidade do sistema imunológico e também a hospitalização. Uma das maiores avaliações sobre sepse em RNMBP, publicada até o presente momento, mostrou que os fatores de risco mais importantes foram a idade gestacional e a exposição aos antibióticos pré-natais. (59) Não houve casos de EN e sepse no Grupo LioNeo e devido à incidência em apenas um grupo, nenhuma análise comparativa pôde ser feita, apesar disso, levantamos a hipótese de que tal situação poderia indicar que o leite humano concentrado com liofilizado de origem humana (LioNeo) tem potencial de proteção para os eventos adversos (desfechos) observados neste estudo.

Recentemente, Dani et al. (2020) levantaram a hipótese de que a alimentação enteral induz alterações hemodinâmicas mesentéricas em prematuros, que podem variar de acordo com o tipo de leite utilizado. Eles avaliaram as mudanças na oxigenação esplâncnica regional através de espectroscopia no infravermelho por aproximação em prematuros alimentados com leite materno (própria mãe), leite humano fortificado ou fórmula infantil para prematuros. Eles observaram que a oxigenação esplâncnica não foi afetada pela alimentação com leite materno, foi temporariamente diminuída pela alimentação com leite humano fortificado e persistentemente diminuída pela fórmula infantil para prematuros. Esses resultados sugerem que os prematuros que receberam fórmula infantil tiveram maior extração de oxigênio do tecido esplâncnico do que aqueles que receberam leite materno ou leite humano fortificado. O leite humano fortificado com aditivo de origem bovina aumentou transitoriamente o gasto de energia esplâncnica. Esses achados podem sugerir um risco aumentado de EN e sangramento gastrointestinal devido à exposição à proteína do leite de vaca, especialmente de fórmula infantil. (60)

As alterações da dieta, seja em relação ao tempo (interrupção) ou a diminuição do volume são indicativos importantes de tolerabilidade no que diz respeito a assimilação da alimentação prescrita. Observar sinais como vômitos, diarreia ou distensão abdominal vão de encontro aos desfechos secundários propostos para presente estudo. É uma prática comum interromper a alimentação por sonda em RNMBP que não a toleram. Foram registrados o número de dias de ingestão de leite com aditivo e o volume diário administrado da dieta durante os 21 dias de acompanhamento de cada participante. Com base nesses dados, comparamos os grupos usando um modelo de regressão com o volume total de leite como variável ajustada e não foi detectada diferença entre os mesmos, o que nos leva a dizer que a tolerância foi equivalente entre os dois aditivos utilizados. Os períodos de jejum ocorridos durante estudo, foram principalmente devido a problemas gastrointestinais, como distensão abdominal e vômitos. Ambos são muito

comuns em recém-nascidos pré-termo, principalmente naqueles em uso de antibióticos. (61) Além disso, os prematuros devido ao desenvolvimento incompleto do sistema gastrointestinal são mais suscetíveis à distensão abdominal, por gastroparesia e/ou dismotilidade intestinal. A intolerância alimentar manifestada como regurgitação, vômito, distensão abdominal, pode causar perda de peso e aumentar o risco de infecção e prolongar a hospitalização. (62) Um estudo comparativo entre a utilização de aditivo a base de proteína humana e aditivo a base de proteína animal para a fortificação de leite humano, foi realizado por pesquisadores canadenses, com o objetivo de observar a tolerância à alimentação e a redução de morbidade em recém-nascidos pré termo menores que 1250 g. Para tanto definiram como desfecho primário o percentual de participantes com interrupção da dieta por um período  $\geq 12$ h ou uma redução maior que 50% no volume de dieta. Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas nas interrupções da alimentação e observaram que o uso de aditivo à base de proteína humana, em prematuros alimentados exclusivamente com LH, não melhorou a tolerância à alimentação nem reduziu a mortalidade e morbidade em comparação com aditivo à base de proteína animal. (63) Estudo realizado nos Estados Unidos da América (EUA) com aditivo comercial derivado de leite humano não encontrou diferenças significativas nos resultados clínicos, semelhante ao nosso estudo, porém observou menor número de dias de internação hospitalar nos prematuros alimentados com o referido fortificante. (64)

Uma recente diretriz japonesa garante que a melhor nutrição para RNMBP é o leite da própria mãe, se não for possível, deve-se usar leite humano doado. A amamentação dos RNMBP participantes do estudo com leite de suas próprias mães ocorreu de forma escassa em virtude da baixa idade gestacional, presença não constante da mãe no ambiente hospitalar, fatores emocionais e a própria falta de condições de sucção na mama. O LH pasteurizado deve ser fornecido de acordo com as indicações médicas, independentemente da situação financeira da família. Autores apontaram a necessidade futura de criar um sistema para fornecimento de dieta exclusiva à base de leite humano, consistindo em leite humano com a adição de um aditivo derivado de leite humano para esses prematuros. (65)

O uso de leite humano proveniente de doação representa uma estratégia mais econômica para reduzir o impacto da doença relacionado ao recém-nascido de extremo baixo peso e da EN quando comparado aos custos médicos e não médicos. Os valores giram em torno de \$563.655 para os custos não médicos indiretos, \$27,1 milhões em custos médicos diretos e \$1,5 bilhões em custos atribuídos à morte de crianças prematuras. (66)

A metodologia aplicada em nosso estudo tem baixo custo e visa manter a gratuidade do LioNeo, uma vez que o mesmo deve ser produzido em bancos de leite humano com leite materno proveniente de doação. Atualmente, encontra-se disponível no mercado um aditivo à base de proteína humana, desenvolvido pela indústria norte-americana, porém os valores são altos e envolvem questões éticas importantes devido ao comércio de leite humano. Foi realizado um estudo com o objetivo de estimar a relação custo-efetividade da utilização desse aditivo humano comercial, e o mesmo indicou que o custo da alimentação depende da dieta estabelecida em função do peso da criança. A base de cálculo para a estimativa de preço foi de 6 euros por ml do referido aditivo. (67) A utilização de leite humano doado de bancos de leite é um dos pontos fortes do presente estudo, pois garante a gratuidade e a não comercialização do produto que poderá beneficiar recém-nascidos prematuros e prevenir graves consequências da desnutrição nessa população. (68)

Apesar de seu potencial, o Grupo de Trabalho da *European Milk Bank Association* afirma que ainda é cedo para tirar conclusões sobre o uso de fortificantes a base de leite humano em recém-nascidos pré termo (46). No entanto, o presente estudo pode adicionar descobertas importantes sobre este assunto, uma vez que a fase 2, com um tamanho amostral maior está em andamento. Além da verificação de eficácia, objetivo principal da fase 2, os eventos adversos continuarão a ser observados, reforçando a análise sobre a segurança e a tolerabilidade do LioNeo.

O nosso estudo teve algumas limitações. O pequeno tamanho da amostra não possibilitou a comparação de alguns dos principais desfechos menos prevalentes, como EN e sepse neonatal tardia. Provavelmente, essa questão deverá ser minimizada na fase 2 com número amostral maior, porém é notável que não houve eventos adversos graves no Grupo LioNeo e houveram alguns isolados no Grupo LHF85. Outra limitação foi o número de dias de ingestão dieta em todos os recém-nascidos incluídos. Vale destacar que a maioria deles completou no mínimo 15 dias de consumo. Portanto, acreditamos que, na realidade, a alimentação foi interrompida temporariamente em alguns RNMBP devido à dismotilidade, secundária à imaturidade.

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo destaca-se por ser um dos poucos ensaios clínicos randomizados realizado com recém-nascidos estáveis de muito baixo peso com o objetivo de melhorar a nutrição desse grupo de prematuros através da utilização de leite humano concentrado com aditivo de origem humana e por consequência, mantê-los protegidos de possíveis efeitos adversos durante o período de internação. Testamos o LioNeo e os achados foram promissores, mostrando que os principais resultados não foram diferentes do aditivo padrão atualmente utilizado (LHFM85). Portanto, concluímos que o LioNeo, o novo aditivo a base de leite humano Brasileiro é seguro e tolerável para ser usado nesta população, o que nos propicia avançar para a fase 2.

## 7 REFERÊNCIAS

1. BUDIN P. **Le Nourrisson, alimentation et hygiène, enfants débiles, enfants nés à terme, leçons cliniques.** 1900.
2. WEGMAN, M. E. **Infant mortality in the 20th century, dramatic but uneven progress.** Journal of Nutrition. **Anais...American Institute of Nutrition**, 1 Feb. 2001Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/131/2/401S/4686951>>. Acesso em: 29 aug. 2020
3. MARTIN, C. R. et al. Nutritional practices and growth velocity in the first month of life in extremely premature infants. **Pediatrics**, v. 124, n. 2, p. 649–657, Aug. 2009.
4. TUDEHOPE, D. et al. Nutritional Needs of the Micropreterm Infant. **The Journal of Pediatrics**, v. 162, n. 3, p. S72–S80, 1 Mar. 2013.
5. HAY, W. W. et al. Workshop summary: Nutrition of the extremely low birth weight infant. **Pediatrics**, v. 104, n. 6, p. 1360–1368, 1999.
6. EULÓGIO MARTINEZ, F.; CAMELO JUNIOR, J. S. Alimentação do recém-nascido pré-termo. **J. pediatr. (Rio J.)**, v. 77, p. 32–40, 2001.
7. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on optimal feeding of low birth-weight infants in low-and middle-income countries. **Geneva: WHO**, p. 16–45, 2011.
8. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Nutritional Needs of Low-Birth-Weight Infants. **Pediatrics**, v. 75, n. 5, 1985.
9. NUTRITION COMMITTEE, C. P. S. Nutrient needs and feeding of premature infants. **Canadian Medical Association Journal**, v. 152, n. 11, p. 1765–1785, 1995.
10. KOLDOVSKÝ, O. Hormones in Milk. **Vitamins and Hormones**, v. 50, n. C, p. 77–149, 1 Jan. 1995.
11. KUNZ, C. et al. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. **Clinics in Perinatology**, v. 26, n. 2, p. 307–333, 1999.
12. BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49–74, 1 Feb. 2013.
13. **Prolacta - North America - Prolacta Bioscience.** Disponível em: <<https://www.prolacta.com/en/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.
14. GANAPATHY, V.; HAY, J. W.; KIM, J. H. Costs of necrotizing enterocolitis and cost-effectiveness of exclusively human milk-based products in feeding extremely premature infants. **Breastfeeding Medicine**, v. 7, n. 1, p. 29–37, 2012.
15. GHANDEHARI, H.; LEE, M. L.; RECHTMAN, D. J. 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 Research Notes**, v. 5, 2012.
16. SULLIVAN, S. et al. 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. **Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 4, 2010.

17. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA. **Banco de leche humana, funcionamiento, prevención y control de riesgos**. [s.l: s.n.].
18. **Constituição**. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/constituicao/constituicao.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm)>. Acesso em: 29 nov. 2021.
19. HAIR, A. B. et al. Randomized trial of human milk cream as a supplement to standard fortification of an exclusive human milk-based diet in infants 750-1250 g birth weight. **Journal of Pediatrics**, v. 165, n. 5, p. 915–920, 2014.
20. KREISSL, A. et al. Effect of fortifiers and additional protein on the osmolarity of Human Milk: Is it still safe for the premature infant? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 57, n. 4, p. 432–437, 2013.
21. BRAGA, L. P. M.; PALHARES, D. B. Efeito da evaporação e pasteurização na composição bioquímica e imunológica do leite humano. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 1, p. 59–63, 2007.
22. DE SOUZA GRANCE, T. R. et al. Homologous human milk supplement for very low birth weight preterm infant feeding. **Revista Paulista de Pediatria (English Edition)**, v. 33, n. 1, p. 28–33, 2015.
23. MARTYSIAK-ŻUROWSKA, D.; ROŻEK, P.; PUTA, M. The effect of freeze-drying and storage on lysozyme activity, lactoferrin content, superoxide dismutase activity, total antioxidant capacity and fatty acid profile of freeze-dried human milk. **Drying Technology**, 40:3, 615-625, 2020.
24. COLAIZY, T. T. et al. Growth in VLBW infants fed predominantly fortified maternal and donor human milk diets: a retrospective cohort study. **BMC Pediatrics**, v. 12, n. 1, p. 124, 17 Aug. 2012.
25. KANMAZ, H. G. et al. Human milk fortification with differing amounts of fortifier and its association with growth and metabolic responses in preterm infants. **Journal of Human Lactation**, v. 29, n. 3, p. 400–405, 2013.
26. MOYA, F. et al. A new liquid human milk fortifier and linear growth in preterm infants. **Pediatrics**, v. 130, n. 4, 2012.
27. HARDING, J. E. et al. Advances in nutrition of the newborn infant. **The Lancet**, v. 389, n. 10079, p. 1660–1668, 22 Apr. 2017.
28. OLIVEIRA, M. M. et al. Development of a human milk concentrate with human milk lyophilizate for feeding very low birth weight preterm infants: A preclinical experimental study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1–16, 2019.
29. BOMFIM, V. S. et al. Human milk enriched with human milk lyophilisate for feeding very low birth weight preterm infants: A preclinical experimental study focusing on fatty acid profile. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–17, 2018.
30. **FDA. Step 3: Clinical Research**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-3-clinical-research>>. Acesso em: 29 nov. 2021.
31. RIGO, J. et al. Growth and Nutritional Biomarkers of Preterm Infants Fed a New

- Powdered Human Milk Fortifier: A Randomized Trial. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 65, n. 4, p. e83–e93, 2017.
32. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Boas Práticas Clínicas: Documento das Américas. **IV Conferência Pan-Americana para harmonização da regulamentação farmacêutica**, p. 88, 2005.
  33. VILLAR, J. et al. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: The Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. **The Lancet**, v. 384, n. 9946, p. 857–868, 2014.
  34. BALLARD, J. L. et al. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 119, n. 3, p. 417–423, 1991.
  35. **Sealed Envelope | Randomisation (randomization) and online databases for clinical trials**. Disponível em: <<https://www.sealedenvelope.com/>>. Acesso em: 6 dec. 2021.
  36. **REDCap**. Disponível em: <<https://www.project-redcap.org/>>. Acesso em: 6 dec. 2021.
  37. HARRIS, P. A. et al. Research electronic data capture (REDCap)-A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 42, n. 2, p. 377–381, 2009.
  38. OLIVEIRA, M. M. et al. Essential and toxic elements in human milk concentrate with human milk lyophilizate: A preclinical study. **Environmental Research**, v. 188, p. 109733, 1 Sep. 2020.
  39. **Pediatria Nestlé | Home**. Disponível em: <<https://www.pediatrianestle.com.br/>>. Acesso em: 29 nov. 2021.
  40. ARSLANOGLU, S.; MORO, G. E.; ZIEGLER, E. E. Optimization of human milk fortification for preterm infants: New concepts and recommendations. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 38, n. 3, p. 233–238, 1 May 2010.
  41. ARSLANOGLU S, BERTINO E, COSCIA A, TONETTO P, GIULIANI F, M. G. Update of adjustable fortification regimen for preterm infants: a new protocol. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 26 (3 Supp, n. PMID: 23158517, p. 65–7, 2012.
  42. ASHINA, M. et al. Feeding interval and use of donor breast milk for very low birthweight infants: A nationwide survey in Japan. **Pediatrics and Neonatology**, v. 60, n. 3, p. 245–251, 1 Jun. 2019.
  43. GEPHART, S. M. et al. The ConNEction between Abdominal Signs and Necrotizing Enterocolitis in Infants 501 to 1500 g. **Advances in Neonatal Care**, v. 17, n. 1, p. 53–64, 1 Feb. 2017.
  44. SHANE, A. L.; SÁNCHEZ, P. J.; STOLL, B. J. Neonatal sepsis. **The Lancet**, v. 390, n. 10104, p. 1770–1780, 2017.
  45. CENTER WHO-TUM. **WHO Causality assessment. Good Pharmacovigil Pract Guid**, 2009.
  46. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The use of the WHO-UMC system for standardised case causality assessment-1-The use of the WHO-UMC system for standardised case causality assessment Why causality assessment?** The Uppsala Monitoring Centre. **Anais...2014** Disponível em:



<[https://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/safety\\_efficacy/WHOcausality\\_assessment.pdf?ua=1#:~:text=The WHO-UMC causality assessment system&text=It is basically a combined,the documentation of the observation.](https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/WHOcausality_assessment.pdf?ua=1#:~:text=The WHO-UMC causality assessment system&text=It is basically a combined,the documentation of the observation.)>. Acesso em: 29 aug. 2020

47. VON. VERMONT OXFORD NETWORK. **Annual Report for Infants Born in 2018** Burlington, Vermont, [s.d.].
48. HOWIE, S. R. C. Les volumes des échantillons sanguins dans la recherche en matière de santé Infantile: Examen des limites de sécurité. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 89, n. 1, p. 46–53, 2011.
49. COBOS-CARBÓ, A.; AUGUSTOVSKI, F. Declaración CONSORT 2010: actualización de la lista de comprobación para informar ensayos clínicos aleatorizados de grupos paralelos. **Medicina Clínica**, v. 137, n. 5, p. 213–215, 2011.
50. EIDELMAN, A. I. Breastfeeding and the Use of Human Milk: An Analysis of the American Academy of Pediatrics 2012 Breastfeeding Policy Statement. <https://home.liebertpub.com/bfm>, v. 7, n. 5, p. 323–324, 27 Sep. 2012.
51. ISRAEL-BALLARD, K. et al. Call to action for equitable access to human milk for vulnerable infants. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 11, p. e1484–e1486, 1 Nov. 2019.
52. SCHINKEL, E. R. et al. Concentrating human milk: an innovative point-of-care device designed to increase human milk feeding options for preterm infants. **Journal of Perinatology** **2020 41:3**, v. 41, n. 3, p. 582–589, 15 Oct. 2020.
53. KANTOROWSKA, A. et al. Impact of donor milk availability on breast milk use and necrotizing enterocolitis rates. **Pediatrics**, v. 137, n. 3, 1 Mar. 2016.
54. SISK, P. M. et al. Necrotizing Enterocolitis and Growth in Preterm Infants Fed Predominantly Maternal Milk, Pasteurized Donor Milk, or Preterm Formula: A Retrospective Study. **American Journal of Perinatology**, v. 34, n. 7, p. 676–683, 1 Jun. 2017.
55. MILLER, J. et al. A systematic review and meta-analysis of human milk feeding and morbidity in very low birth weight infants. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 1–35, 2018.
56. SPIEGLER, J. et al. Does Breastmilk Influence the Development of Bronchopulmonary Dysplasia? **Journal of Pediatrics**, v. 169, p. 76- 80.e4, 1 Feb. 2016.
57. QUIQLEY, M.; EMBLETON, N.; MCGUIRE, W. Formula versus donor milk for preterm infant. **Cochrane Database of Systematic Review**, v. CD002971, n. 6, 2018.
58. LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. **The Lancet**, v. 388, n. 10063, p. 3027–3035, 17 Dec. 2016.
59. HORNIK, C. P. et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. **Early Human Development**, v. 88, n. SUPPL.2, p. S69–S74, 1 May 2012.
60. DANI, C. et al. Effect on splanchnic oxygenation of breast milk, fortified breast milk, and formula milk in preterm infants. **Pediatric Research** **2020 89:1**, v. 89, n. 1, p. 171–174, 7 May 2020.
61. SALVATORE, S. et al. Neonatal Antibiotics and Prematurity Are Associated with an

Increased Risk of Functional Gastrointestinal Disorders in the First Year of Life. **Journal of Pediatrics**, v. 212, p. 44–51, 1 Sep. 2019.

62. SEIIEDI-BIARAG, L.; MIRGHAFORVAND, M. The effect of massage on feeding intolerance in preterm infants: a systematic review and meta-analysis study. **Italian journal of pediatrics**, v. 46, n. 1, 23 Apr. 2020.
63. O'CONNOR, D. L. et al. Nutrient enrichment of human milk with human and bovine milk-based fortifiers for infants born weighing &lt;1250 g: a randomized clinical trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 108, n. 1, p. 108–116, 1 Jul. 2018.
64. HAIR, A. B. et al. Premature infants 750-1,250g birth weight supplemented with a novel human milk-derived cream are discharged sooner. **Breastfeeding Medicine**, v. 11, n. 3, p. 133–137, 1 Apr. 2016.
65. MIZUNO, K. et al. Policy statement of enteral nutrition for preterm and very low birthweight infants. **Pediatrics International**, v. 62, n. 2, p. 124–127, 2020.
66. VERDUCI, E.; GIANNÌ, M. L.; DI BENEDETTO, A. Human milk feeding in preterm infants: What has been done and what is to be done. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 3–4, 2020.
67. SCHOLZ, S. M.; GREINER, W. An exclusive human milk diet for very low birth weight newborns-A cost-effectiveness and EVPI study for Germany. **PLoS ONE**, v. 14, n. 12, p. 1–13, 2019.
68. GINSBURG, A. S.; FLAHERMAN, V. Optimizing Neonatal Nutrition in Resource-Constrained Settings. **JAMA Pediatrics**, v. 175, n. 5, p. 451–452, 1 May 202

\*

## 8 ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Projeto LioNeo



PACIENTE Nº: \_\_\_\_\_



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

**Título da pesquisa:** Nutrição de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso utilizando um concentrado com liofilizado de leite humano – Estudo de Fases 1 e 2: Segurança, Tolerabilidade e Efetividade

**Pesquisadores responsáveis:** Prof. Dr. José Simon Camelo Júnior - Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Avenida Bandeirantes, 3900, 5º andar, sala 506, HC Criança - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP- USP), Ribeirão Preto, SP. Telefone para contato: (16) 3963-6629

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado nesse Hospital. O objetivo da pesquisa é testar a eficácia do leite materno concentrado com liofilizado (leite materno em pó) na alimentação de recém-nascidos de muito baixo peso (<1500 gramas), além de comparar como as crianças crescem, como elas ganham peso, o tamanho da cabeça entre outros e a ocorrência de efeitos não esperados comparando com outros recém-nascidos que estejam recebendo leite materno enriquecido com leite de vaca em pó.

Caso concorde em participar, o(a) senhor(a) permitirá que:

1. Inicialmente, seja realizada a análise do prontuário do seu filho(a) do HC Criança, para coletar dados de nascimento (como por exemplo qual foi o tempo de gestação e o tipo de parto, o que aconteceu durante o nascimento, quais as condições do nascimento)
2. Seu filho(a) seja sorteado para um dos grupos do estudo para receber leite materno com aditivo de leite materno em pó ou leite materno com aditivo de leite de vaca em pó. Esse sorteio é feito por computador, ou seja, ninguém saberá o que ele está recebendo, somente as pessoas responsáveis que preparam o leite do projeto.
3. Seu filho seja acompanhado por 21 dias consecutivos. Em todos os dias de acompanhamento no estudo, serão avaliados os seguintes dados:
  - Peso e circunferência abdominal;
  - Volume de leite ingerido;

- Efeitos não esperados Ocorrência ou não de efeitos como vômitos e regurgitação; alterações nas fezes; distensão da barriga; sangramento nas fezes, perfuração intestinal e infecção.
4. Em sequência, que sejam avaliados pelo pesquisador em dois momentos diferentes:
- **Primeira e última avaliação (dia 1 e dia 22):** comprimento, circunferência da cabeça, exames de sangue (sódio, potássio, magnésio, cloro, cálcio, fósforo, cobre, zinco, aminoácidos, acilcarnitinas, glicemia, fosfatase alcalina, proteína total e albumina, uréia e creatinina e ferro).

Que sejam coletadas e armazenadas duas amostras de sangue seco em papel filtro, urina (para perfil de ácidos orgânicos) e de fezes do seu filho(a) para posterior análise. Essas amostras ficarão guardadas em freezer do Laboratório de Pediatria, Metais e Doenças Raras por até 10 anos. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta sigilo e confidencialidade ao senhor(a) e seu(sua) filho(a); para isso as amostras de sangue, urina e fezes serão identificadas por meio de números (será dado um número de identificação para cada amostra).

Quanto ao material a ser guardado, serão coletadas uma amostra de até 50 mililitros de urina (um copinho de café), uma amostra de até 10 gramas de fezes (uma colher de sobremesa) e uma amostra de até 5 mililitros de sangue (1 colher de chá) em cada um dos momentos (início e final da pesquisa). Em decorrência da coleta, para diminuir ou amenizar os desconfortos a seu(a) filho(a), a realização dos procedimentos se dará por meio de um profissional do serviço, treinado e habituado a realizar esse tipo de coleta na rotina de avaliação de crianças prematuras. O(A) senhor(a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Os riscos ou desconfortos da pesquisa são mínimos à sua saúde física ou psíquica bem como de seu filho(a). A coleta de sangue poderá ocasionar manchas roxas e dor no local em que for realizada; este risco será minimizado através da realização do procedimento por profissional treinado. Os exames que serão colhidos fazem parte da rotina de avaliação de crianças prematuras (com exceção de aminoácidos, acilcarnitinas, ácidos orgânicos na urina e fezes). Para realizar a coleta de dados necessária para esta pesquisa, seu filho(a) não sentirá qualquer tipo de dor ou incômodo adicional, além dos procedimentos rotineiros de cuidados necessários executados nas Unidades de Terapia Intensiva e de Cuidado Intermediário Neonatal do HC Criança.

Os benefícios esperados da pesquisa são a contribuição para o conhecimento da eficácia do leite materno concentrado com leite materno em pó na alimentação de recém-nascidos de muito baixo peso, podendo assim, futuramente, melhorar a atenção à saúde desta população, garantindo crescimento igual ou melhor e ocorrência de efeitos adversos igual ou menor quando comparado com outros recém-nascidos alimentados com leite humano enriquecido com aditivo comercial à

base do leite de vaca. Este estudo talvez traga benefícios imediatos (no crescimento, ganho de peso e metabolismo) a seu filho(a) ou não, mas pode ajudar a melhorar, futuramente, o tratamento de pacientes prematuros de muito baixo peso e, também auxiliar para melhor entendimento dos fatores de crescimento e ocorrência de efeitos adversos com a utilização do leite humano concentrado com leite humano em pó na alimentação desses recém-nascidos.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o(a) senhor(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Esta pesquisa foi analisada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP-USP.

Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8:00 às 17:00hs, telefone de contato (016) 3602-2228.

Você receberá uma via deste Termo, datada e assinada, e a outra via será guardada pela equipe de pesquisa. Ao assinar este termo, você concorda em participar da pesquisa.

**Dados do participante (recém-nascido):**

Nome: \_\_\_\_\_ Data  
nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Dados do responsável legal (pai, mãe, ambos ou responsável legal):**

Nome legível: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_, Bairro  
\_\_\_\_\_

Cidade \_\_\_\_\_, Estado \_\_\_\_\_

Telefone fixo (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ Telefone celular 1 (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ Telefone celular 2  
(\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Telefone para recado (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ Outro telefone (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ Outro telefone  
(\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_

(Outro responsável que esteja presente)

Assinatura: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_

Nome legível: \_\_\_\_\_

Assinatura Assentimento de Mãe menor de 18 anos: \_\_\_\_\_  
data: \_\_\_\_\_

Nome legível: \_\_\_\_\_

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador colaborador

Nome:

RG: \_\_\_\_\_  
data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura de Testemunha em caso de Analfabetismo

Nome:

RG: \_\_\_\_\_  
data: \_\_\_\_\_

## **9 ANEXO B – Protocolo para medida de pressão arterial em recém-nascidos pré-termo/ choque no período neonatal/ HCFMRP-USP**

**Prof. Dr. José Simon Camelo Junior**

### **Introdução**

Após o nascimento, a circulação fetal passa por uma série rápida de mudanças. A função cardíaca aumenta rapidamente para garantir a perfusão tecidual adequada. Dos recém-nascidos (RNs) com idade gestacional (IG)  $\geq 36$  semanas, 20% têm o canal arterial funcionalmente fechado em 24 horas de vida pós-natal, 90% com 48 horas de vida e praticamente 100% com 96 horas. Os prematuros, principalmente aqueles abaixo de 30 semanas de gestação, são pouco preparados para adaptação pós-natal imediata. Esse fato, associado à imaturidade do miocárdio, pode resultar em redução do fluxo sanguíneo sistêmico, com redução da perfusão de órgãos. Hipotensão ocorre em aproximadamente 20 – 45% dos RNs de muito baixo peso ( $\leq 1500$ g), geralmente nas primeiras 48 horas de vida.

### **Definição de Choque Circulatório**

Choque é uma síndrome clínica de alteração aguda da função circulatória que leva à insuficiência na perfusão tecidual, na oferta de oxigênio e na produção de energia celular que, uma vez mantida, produz dano celular irreversível. A ausência de hipotensão não exclui o choque, pois a pressão arterial pode ser mantida por mecanismos compensatórios. Existe relação direta entre a pressão arterial sanguínea e peso de nascimento, idade gestacional e idade pós-natal.

Do ponto de vista etiológico, podemos ter o Choque Hipovolêmico (hemorragias, perdas plasmáticas, perda de água livre), Choque Cardiogênico (cardiopatias congênitas, restrição cardíaca, retorno venoso comprometido, isquemia miocárdica pós-asfixia, distúrbios metabólicos, miocardiopatias, arritmias, entre outros) e Choque Distributivo (séptico – forma mais comum, fármacos utilizados pelo RN ou pela mãe, choque refratário do prematuro). Em muitos prematuros, especialmente no período pós-natal imediato, a hipotensão é causada por vasorregulação periférica anormal e/ou disfunção miocárdica.

## Diagnóstico de Hipotensão Arterial

A medida da pressão arterial em neonatos prematuros é muito difícil, especialmente nos de muito e extremo baixo peso. Como a pressão sanguínea varia de acordo com o fluxo sanguíneo e resistência vascular sistêmica, pode não refletir a perfusão tecidual, já que a resistência vascular pode variar. Dessa maneira, uma medida de pressão arterial dentro dos limites de normalidade não é o suficiente para garantir que esteja havendo fluxo adequado aos órgãos. Da mesma maneira, uma medida de valores baixos ou não aferição, associadas a sinais de boa perfusão periférica não fecha o diagnóstico de choque circulatório (hipotensão permissiva). Portanto, a pressão arterial não deve ser o único critério para o início do tratamento de choque. É importante que sejam também considerados outros marcadores de perfusão sistêmica como a acidose metabólica, aumento do lactato sérico, tempo de enchimento capilar (deve ser < 3 segundos), débito urinário (oligoanúria – diurese < 1ml/kg/hora) e temperatura das extremidades, além de sinais como taquicardia, bradicardia, pulsos periféricos diminuídos, diferença entre pulsos centrais e periféricos, palidez cutânea, pele mal perfundida, cianose, irritabilidade, hipoatividade, letargia e coma.

No RN, a relação do “cuff” e a medida da circunferência do braço entre 0,45 e 0,55 mostram uma boa acurácia da medida indireta da pressão sanguínea (comparado com a medida direta, invasiva, da pressão arterial).

A medida direta da pressão sanguínea pode ser feita por cateter na artéria umbilical, sendo considerado o padrão ouro de medida. A extensão e o diâmetro do cateter podem influenciar na medida. Cateteres de 3,5Fr e 5,0Fr podem fornecer medidas adequadas.

**Tabela 1:** Medida de pressão arterial média (PAM) e o percentil 10 para o peso de nascimento e idade pós-natal, até 96 horas de vida.

Peso de Nascimento (gramas)	Idade Pós-Natal								
	3h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	96h
500	35/23	36/24	37/25	38/26	39/28	41/29	42/30	43/31	44/33
600	35/24	36/25	37/26	39/27	40/28	41/29	42/31	44/32	45/33
700	36/24	37/25	38/26	39/28	42/29	42/30	43/31	44/32	45/34
800	36/25	37/26	39/27	40/28	41/29	42/31	44/32	45/33	46/34
900	37/25	38/26	39/27	40/29	42/30	43/31	44/32	45/34	47/35
1000	38/26	38/27	40/28	41/29	42/31	43/32	45/33	46/34	47/35
1100	38/27	39/27	40/29	42/30	43/31	44/32	45/34	46/35	48/36
1200	39/27	40/28	41/29	42/30	43/32	45/33	46/34	47/35	48/37
1300	39/28	40/29	41/30	43/31	44/32	45/33	46/35	48/36	49/37
1400	40/28	41/29	42/30	43/32	44/33	46/34	47/35	48/36	49/38
1500	40/29	42/30	43/31	44/32	45/33	46/35	48/36	49/37	50/38



Outros critérios devem ser utilizados para o RN de idade cronológica mais avançada e em condições clínicas diferenciadas, como pacientes em terapia intensiva, por exemplo (Tabelas 2, 3 e 4).

**Tabela 2:** Pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD)  $\pm$  2 desvios-padrão (2DP) nos primeiros 28 dias de vida, distribuídos por faixa ponderal ao nascimento

PN= 600-999g			PN= 1000-1249g		
Dias de vida	PAS (2DP)	PAD (2DP)	Dias de vida	PAS (2DP)	PAD (2DP)
1	37,9(17,4)	23,2(10,3)	1	44,0(22,8)	22,5(13,5)
3	44,9(15,7)	30,6(12,3)	3	48,0(15,4)	36,5(9,6)
7	50,0(14,8)	30,4(12,4)	7	57,0(14,0)	42,5(16,5)
14	50,2(14,8)	37,4(12,0)	14	53,0(30,0)	-
28	61,0(23,5)	45,8(27,4)	28	57,0(30,0)	-
PN= 1250-1499g			PN= 1500-1750g		
Dias de vida	PAS (2DP)	PAD (2DP)	Dias de vida	PAS (2DP)	PAD (2DP)
1	48,0(18,0)	27,0(12,4)	1	47,0(15,8)	26,0(15,6)
3	59,0(21,1)	40,0(13,7)	3	51,0(18,2)	35,0(10,0)
7	68,0(14,8)	40,0(11,3)	7	66,0(23,0)	41,0(24,0)
14	64,0(21,2)	36,0(24,2)	14	76,0(34,8)	42,0(20,3)
28	69,0(31,4)	44(25,2)	28	73,0(5,6)	50,0(9,9)

**Tabela 3:** Pressão arterial média  $\pm$  1 desvio-padrão em RN a termo e RN pré-termo, sob cuidados intensivos, do nascimento até 4 semanas de vida

Dias de vida/Peso	<1000g	1000-1500g	1500-2500g	>2500g
Nascimento	32,9 $\pm$ 15,4	39,1 $\pm$ 18,2	42,4 $\pm$ 19,6	48,8 $\pm$ 19,4
7	41,4 $\pm$ 15,4	47,2 $\pm$ 18,2	50,4 $\pm$ 19,6	60,2 $\pm$ 19,4
14	44,6 $\pm$ 15,4	50,1 $\pm$ 18,2	53,2 $\pm$ 19,6	64,2 $\pm$ 19,4
28	47,6 $\pm$ 15,4	53,0 $\pm$ 18,2	56,1 $\pm$ 19,6	68,3 $\pm$ 19,4

**Tabela 4:** Pressão arterial sanguínea sistólica, média e diastólica de RN / lactentes após a segunda semana de idade pós-concepcional. Adequada para diagnóstico de hipertensão arterial

Idade Pós-Concepcional (em semanas)	Pressão arterial	Percentil 50	Percentil 95	Percentil 99
44	PAS	88	105	110
	PAM	63	80	85
	PAD	50	68	73
42	PAS	85	98	102
	PAM	62	76	81
	PAD	50	65	70
40	PAS	80	95	100
	PAM	60	75	80
	PAD	50	65	70
38	PAS	77	92	97
	PAM	59	74	79
	PAD	50	65	70
36	PAS	72	87	92
	PAM	57	72	77
	PAD	50	65	70
34	PAS	70	85	90
	PAM	50	65	70
	PAD	40	55	60
32	PAS	68	83	88

	PAM	49	64	69
	PAD	40	55	60
<b>30</b>	PAS	65	80	85
	PAM	48	63	68
	PAD	40	55	60
<b>28</b>	PAS	60	75	80
	PAM	45	58	63
	PAD	38	50	54
<b>26</b>	PAS	55	72	77
	PAM	38	57	63
	PAD	30	50	56

## Referências

1. Watkins AMC, West CR, Cooke RWI. Blood pressure and cerebral hemorrhage and ischemia in very low birthweight infants. *Early Human Development* 1989; 19:103-110.
2. Ribeiro MAS, Garcia PCR, Fiori RM. Determinação da pressão arterial em recém-nascidos. *Scientia Medica* 2007; 17(3): 156-167.
3. Dionne JM, Flynn JT. Management of severe hypertension in the newborn. *Archives of Disease in Childhood* 2017; 102:1176–1179.

## 10 ANEXO C – Manual Operacional Padronizado para o Porcionamento de Leites Fortificados do Projeto LioNeo



Manual Operacional Padronizado – MOP

MOP 5 – Nutrição/ Porcionamento/ Lactário

Os nutricionistas responsáveis pelo porcionamento (não-cegos) realizarão suas atividades no lactário do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). Os nutricionistas deverão cumprir as etapas de preparação para a entrada no local, tais como higienização padrão das mãos e utilização de avental próprio, máscara e touca.

Realizada a paramentação, o equipamento de banho-maria deverá ser higienizado diariamente com álcool 70%. Em seguida, deverá ser coletada em recipiente higienizado de 6 a 10 litros de água purificada proveniente do sistema de osmose reversa próprio do serviço do lactário. Caso não seja possível, será necessário buscar 02 galões de 5 litros cada de água deionizada (ou destilada) no Laboratório de Metais Pesados e Doenças Raras do HCFMRP-USP. Tal água purificada será utilizada no equipamento de banho-maria na etapa de descongelamento do leite. Após encher o banho-maria, o termômetro será posicionado no seu devido local e o equipamento será ligado com temperatura ajustada em 40°C. A capela de fluxo laminar também deverá ser ligada e, após 30 minutos, higienizada com álcool 70% conforme procedimento próprio do lactário.

A seguir, os nutricionistas deverão acessar o REDCap. A inclusão de novos participantes será checada diariamente, juntamente com sua alocação para o grupo A ou B. A randomização será realizada pelo estatístico no programa REDCap. Houve uma concordância entre os três nutricionistas sobre qual será o grupo A e B para definir qual grupo receberá leite humano com liofilizado (grupo LioNeo) ou leite humano com FM85 (grupo LHF85). Esse resultado foi guardado em envelope selado e gaveta com chave. O rompimento do cegamento irá acontecer somente no final do projeto ou quando o comitê interno ou externo de avaliação considerar pertinente.

Após a randomização de cada participante para um dos grupos da pesquisa (A ou B), o nutricionista deverá acessar a prescrição dietética dos indivíduos no sistema do HCFMRP-USP, e identificar os participantes. O nutricionista deverá anotar, na planilha de porcionamento, o

volume e a frequência da dieta a ser oferecida, para cada participante. Com base nessas informações, poderá então determinar o volume total de LioNeo e LHF85 a ser utilizado em 24 horas, bem como a quantidade de seringas que serão necessárias para o porcionamento. Neste momento a quantidade total de seringas, tampas e sacos plásticos necessários deverão ser separados para a utilização.

Uma vez cumprida essa etapa, o nutricionista deverá checar a temperatura do freezer e do banho-maria. No momento em que o banho-maria atingir 40°C, deverá ser retirado do freezer a quantidade de frascos necessários para o preparo do volume total de LioNeo e LHF85. Na sequência os frascos deverão ser descongelados em banho-maria, em temperatura a 40°C, com agitação frequente do frasco, para apressar o degelo e uniformizar o produto.

#### - Temperatura do Freezer

A temperatura do freezer deverá ser avaliada em 2 momentos conforme procedimento do lactário. O controle de temperatura está acoplado ao lado do freezer e deve ser assinado. A aferição deve ser diária. A planilha de controle deverá ser armazenada em local seguro com chave ao término de cada mês.

#### - Banho-Maria

O descongelamento dos frascos de leite humano ou LioNeo acontecerá conforme demanda da prescrição. Será checada a prescrição e descongelado os frascos que contém a quantidade que mais corresponde ao prescrito para evitar sobras. Para o descongelamento será utilizado o banho-maria localizado no lactário de uso exclusivo do projeto. A utilização do banho-maria acontecerá conforme descrito abaixo:

- 1) Higienização do banho-maria com álcool 70%;
- 2) Ser abastecido com água purificada proveniente do sistema de osmose reversa ou deionizada/destilada, em torno de 6 a 10 litros de água, até atingir a altura da saída de vapor quente no interior do equipamento;
- 3) Verificar a temperatura da água através do termômetro. Os leites deverão ser descongelados na temperatura de 40°C (+/-1°C);
- 4) Anotar diariamente a temperatura na planilha específica do banho-maria;
- 5) O banho deve ser limpo com água e sabão neutro e higienizado com álcool após o seu uso;

- 6) Os galões utilizados para a coleta de água deverão ser lavados uma vez por semana com água e sabão/detergente neutro sem uso de água sanitária (pedido da Vigilância Sanitária).

#### - Capela de Fluxo Laminar

- 1) Ligar o aparelho 30 minutos antes de iniciar a limpeza;
- 2) Paramentar-se com touca, avental de manga comprida e máscara descartável. Não é necessário o uso de luvas;
- 3) Iniciar a higienização utilizando pano multiuso descartável embebido em solução de álcool a 70%, num único sentido, ou seja, não fazer movimento de vai e vem com o pano descartável;
- 4) Limpar primeiramente os cantos;
- 5) Limpar o teto passando o pano descartável de dentro para fora;
- 6) Limpar a parede do fundo (grade) passando o pano de cima para baixo;
- 7) Limpar as laterais passando o pano de dentro para fora;
- 8) Limpar a base (bancada) passando o pano de dentro para fora;

Enquanto ocorre o degelo do leite, e após a higienização da capela de fluxo laminar, os nutricionistas irão fazer a forração estéril da capela e abrir as embalagens das seringas e tampas, sem encostar nas mesmas, dentro da capela de fluxo laminar.

Os frascos de LioNeo e LNO deverão ser retirados do banho-maria assim que restar uma pequena bola de leite congelado em seu interior, e colocados dentro da capela de fluxo laminar. O equipamento de banho-maria será então desligado. Em seguida, o nutricionista deverá calçar as luvas estéreis e iniciar o porcionamento. O porcionamento será realizado na seguinte ordem: primeiro o preparo do LioNeo e depois de LHF85, quando pertinente.

#### - Porcionamento do LioNeo:

Os frascos de LioNeo deverão ser abertos e manipulados dentro da capela de fluxo laminar. O nutricionista deverá porcionar o volume de LioNeo para cada indivíduo (de acordo com a prescrição médica) em seringas de 20 ou 60 ml.

#### - Porcionamento do LHF85:

Os frascos de LNO deverão ser abertos e manipulados dentro da capela de fluxo laminar. O nutricionista abrirá as embalagens de FM85 no local indicado pelo fabricante. Logo após, irá adicionar o FM85 ao volume total de LNO no frasco de vidro, respeitando a diluição padrão de 4% (1 sachê (1g) para cada 25mL), conforme indicação do fabricante, e seguindo a padronização do serviço de nutrição do HCFMRP-USP. Em seguida, será porcionado o volume de LHF85 para cada indivíduo (de acordo com a prescrição médica) em seringas de 20 ou 60 ml.

#### - Etiquetagem das seringas e organização do lactário

Ao final do porcionamento as luvas serão retiradas, e as seringas serão identificadas com etiquetas contendo o nome do receptor, o horário e o volume a ser administrado. As etiquetas com os dados do RN serão impressas e adesivadas nas seringas. As seringas etiquetadas serão armazenadas em sacos plásticos próprios para este fim (1 saco plástico para cada participante). O saco será etiquetado sinalizando ser do projeto (escrever LIONE) e colocadas na geladeira do lactário até o transporte para a UTIN ou UCIN.

Em seguida, o equipamento de banho-maria já desligado deverá ser higienizado com álcool 70%. Os materiais de apoio utilizados para o porcionamento deverão ser retirados da capela de fluxo laminar e entregues na área de lavagem.

#### - Transporte do leite para UTIN ou UCIN

As seringas etiquetadas e embaladas em saco plástico serão retiradas da geladeira do lactário e levadas pelos nutricionistas do projeto até a UTIN ou UCIN em caixa térmica com gellock. Na UTIN ou UCIN, as seringas deverão ser armazenadas nas prateleiras da geladeira de distribuição, entre 5 e 7°C, as quais serão administradas pela equipe de enfermagem em 24 horas.

#### - Recebimento e armazenamento dos frascos de Leite Humano

Durante 2 dias da semana, deverá ser recepcionado às 13 horas os frascos de leite congelados advindos do Banco de Leite, e checada a temperatura da caixa térmica utilizada no transporte. Em seguida, os frascos de LioNeo e LNO serão estocados em gavetas separadas em freezer próprio do projeto. O freezer terá sua temperatura monitorada e anotada diariamente.

- Digitação de dados no REDCap e na planilha de controle de estoque

Por fim, toda manipulação do LioNeo e do LHF85 deverá ser anotada no REDCap, em formulário exclusivo para o lactário. Além disso, os nutricionistas deverão anotar diariamente, na planilha de controle de estoque, a quantidade de frascos utilizados, assim como os seus respectivos números de registro no Banco de Leite Humano do HCFMRP-USP.

## 11 ANEXO D – Protocolo para nutrição enteral de recém-nascidos pré-termo/ HCFMRP-USP

**Elaborado por Prof. Dr. José Simon Camelo Junior**

### **Introdução**

A alimentação do recém-nascido pré-termo (RNPT, <37 semanas de idade gestacional) é uma urgência nutricional e depende essencialmente de sua condição clínica. Avanços tecnológicos têm permitido a sobrevivência de RN cada vez menores, em condições mais graves e o comportamento dessas crianças não é homogêneo, sendo mais complexa a nutrição dos recém-nascidos de idade gestacional menor e de peso menor.

O ideal é que seja utilizada sempre que possível a via fisiológica, que é a via digestiva, mas nem sempre isso é possível logo de início, sendo necessária a nutrição parenteral total ou parcial.

O leite a ser utilizado inicialmente deve ser o leite humano, preferencialmente o colostro da própria mãe, mas existem limitações que serão discutidas adiante, especialmente o *status* materno de infecção por citomegalovírus (CMV). Não havendo o leite da própria mãe, ou se for insuficiente, deverá ser utilizado o LNO pasteurizado em Banco de Leite Humano.

Podemos classificar os RNPT em:

- a) RN de baixo peso (RNBP): RN<2500g;
- b) RN de muito baixo peso (RNMBP): RN<1500g;
- c) RN de extremo baixo peso (RNEBP): RN<1000g.

### **Objetivos / Metas da Nutrição do RNPT**

O Comitê de Nutrição da Academia Americana de Pediatria definiu em 1985, como objetivo da nutrição do RNPT, que se atinja a velocidade de crescimento intraútero para a idade gestacional (IG) corrigida correspondente (AAP, *Committee on Nutrition*, 1985). Para tanto é necessária a comparação dos parâmetros antropométricos do RN com curvas de crescimento intrauterino (IU) apropriadas. Durante muito tempo foi utilizada a Curva de Crescimento IU de Alexander (Alexander et al, 1996), que é norte-americana. Foram feitas releituras do crescimento extrauterino de prematuros, à luz das restrições e limitações fisiológicas da prematuridade, demonstrando que esse objetivo da AAP é pouco factível em muitas situações



e novas curvas surgiram, como a de *New Fenton* (Fenton et al, 2013). Atualmente sugerimos o uso das Curvas do Consórcio Internacional Intergrowth 21<sup>st</sup> (<https://intergrowth21.tghn.org/>).

É importante ressaltar que a subnutrição do RN pré-termo pode causar redução do número de neurônios, com impacto negativo a longo prazo, no comportamento, aspectos cognitivos, na memória e agravamento de lesões neurológicas pré-existentes ou concorrentes, como leucomalácia periventricular e hemorragias intra e periventriculares.

Por outro lado, crescimento em velocidade excessiva pode facilitar processos de programação nutricional deletéria, com desenvolvimento tardio de doenças degenerativas, especialmente síndrome metabólica (obesidade, diabetes tipo 2, dislipidemias, hipertensão arterial), no escopo do que conhecemos por origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD).

Portanto, os objetivos da nutrição do RNPT devem passar pelo crescimento em velocidade adequada, espelhando, na medida do possível o que ocorreria intraútero, com consciência do impacto futuro, com bom desenvolvimento neurológico, minimizando comprometimentos prévios e respeitando as limitações da prematuridade.

### **Nutrição Inicial do RNMBP**

- a) O RNMBP admitido na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) ou Unidade de Cuidados Intermediários Neonatais (UCIN) deve preferencialmente receber o colostro da própria mãe e/ou colostro pasteurizado de Banco de Leite Humano (LNO), já no primeiro dia de vida se possível. A sequência da alimentação deve ser com o leite da própria mãe e/ou LNO pasteurizado maduro. Se houver contraindicação formal absoluta à amamentação, podem ser utilizadas fórmulas infantis para RN pré-termo;
- b) O RN deve estar em condição hemodinâmica estável: com pressão arterial aferível ou com indícios indiretos de estabilidade, como boa perfusão periférica, pulsos periféricos palpáveis e saturação de O<sub>2</sub> normal (90-95%);
- c) Crianças asfixiadas, sujeitas à centralização de fluxo sanguíneo para proteção do cérebro, coração e adrenais estão mais propensas a complicações como a enterocolite necrosante; portanto, o início de sua alimentação pode ser retardado a critério médico, entre o segundo e quinto dias de vida, dependendo da gravidade e repercussões da asfixia;

- d) Se a criança tiver mais de 34 semanas de IG e não apresentar desconforto respiratório, poderá ser oferecido o colostro no volume inicial proposto de 20 ml/kg no copinho e/ou levado ao seio materno, desde que a mãe tenha condições;
- e) Se a criança tiver entre 32 e 34 semanas de idade gestacional e não apresentar desconforto respiratório, deverá ser testada sua capacidade de coordenar sucção-deglutição-respiração (preferentemente por uma fonoaudióloga do serviço), para poder receber o leite pelo copinho e/ou ao seio materno;
- f) Se o RN tiver <32 semanas de IG e/ou apresentar desconforto respiratório ao nascimento com qualquer IG (entre 32 e 34 semanas de IG e > 34 semanas de IG), independente do suporte ventilatório, deverá ser posicionada uma sonda orogástrica ou nasogástrica, através da qual será introduzido o colostro, no volume inicial de 20 ml/kg;
- g) A circunferência abdominal deverá ser medida diariamente (linha de base), à altura da cicatriz umbilical. Se houver suspeita de distensão abdominal, com registro de aumento maior que 10% do valor da linha de base, com mudança de aspecto do abdome, como coloração avermelhada, arroxeadada, peristaltismo visível e dor à palpação, associado ou não à presença de vômitos e/ou evacuações anômalas, a alimentação poderá ser suspensa a critério médico. Resíduos só deverão ser testados em situações anormais, como distensão abdominal maior que 10%, mudança de aspecto, dor, evacuações anômalas (diarreia, presença de muco, pus ou sangue) e vômitos;
- h) O leite deverá ser administrado em bolus por seringas ou por gavagem, utilizando-se a gravidade. Se ocorrerem vômitos, distensão e for relacionada à velocidade de administração do leite, a critério médico poderá ser feita utilização de bombas de infusão para administração mais lenta;
- i) Intervalo proposto para a dieta para RN>1000g: inicial e progressão de 3 em 3 horas; 2 em 2 horas pode ser considerada a critério médico, dependendo da tolerância da dieta. Para <1000g, ver Tabela 2 abaixo.

### **Velocidade de Progressão do Leite Naturalmente Ordenhado (LNO) cru (>28 semanas de IG) ou LNO Pasteurizado de Banco de Leite**

Apresentamos a seguir a Tabela 1 com a progressão de dieta proposta para nosso serviço para RN>1000g, adaptada da utilizada pela *Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA* (Ravi Patel, aula apresentada no Congresso Brasileiro de Perinatologia, Natal, 2018):

**Tabela 1: Progressão de dieta para RNPT >1000g**

<b>Dia de Nutrição Enteral</b>	<b>Volume: ml/kg/dia</b>	<b>Concentração</b>	<b>Comentários</b>
1	20	LNO	Considerar inicialmente como dieta trófica, se evoluir bem, prosseguir, senão manter o volume
2	50	LNO	Atenção ao abdome, vômitos, medida de circunferência abdominal diariamente
3	80	LNO	Atenção ao abdome, vômitos, medida de circunferência abdominal diariamente
4	80	LNO	Considerar o início do aditivo (liofilizado humano – LioNeo, ou LHF85)
5	100	LNO + aditivo	LioNeo ou LHF85 – Observar abdome e vômitos atentamente
6	120	LNO + aditivo	LioNeo ou LHF85 – Observar abdome e vômitos atentamente
7	140	LNO + aditivo	LioNeo ou LHF85 – Observar abdome e vômitos atentamente
8	160	LNO + aditivo	LioNeo ou LHF85 – Observar abdome e vômitos atentamente

Apresentamos a seguir, a Tabela 2 de progressão da dieta para RNPT com <1000g ao nascer, baseada no Protocolo do The Hospital for Sick Kids, Toronto, Canada e hospitais associados (O'Connor et al, 2018).

**Tabela 2: Progressão da dieta para RNPT com <1000g ao nascer**

<b>Peso de Nascimento</b>	<b>500-599g</b>	<b>600-699g</b>	<b>700-799g</b>	<b>800-899g</b>	<b>900-1000g</b>
Alimentação trófica de indução	1ml cada 4hs/3dias Progredindo para: 1ml cada 3hs/3dias	1ml cada 4hs/3dias Progredindo para: 1ml cada 3hs/3dias	1ml cada 4hs/2dias Progredindo para: 1ml cada 3hs/2dias	1ml cada 4hs/2dias Progredindo para: 1ml cada 3hs/1dia	1ml cada 3hs/2dias
Velocidade de aumento da dieta a partir do último dia da progressão acima	1ml/2 dias	1ml/dia	1ml/dia	1ml/dia	2ml/dia
<b>Aos 100ml/kg/dia – iniciar uso de aditivos LioNeo ou LHF85</b>					
Aos 120ml/kg/dia – simplificar nutrição parenteral (manter soro com glicose e eletrólitos) e manter LioNeo ou LHF85					
Aos 140ml/kg/dia – suspender nutrição parenteral e manter LioNeo ou LHF85					
<b>Aos 160ml/kg/dia – dieta em volume máximo mantendo LioNeo ou LHF85</b>					

- a) Se a criança ganhar peso acima de 1000g, usar os critérios da Tabela 1;
- b) Sondas enterais só devem ser posicionadas, se não houver sucesso com o posicionamento gástrico, com vômitos de difícil controle sem outros achados clínicos.

Como a sonda enteral ultrapassa a barreira gástrica, aumenta o risco de infecção por translocação bacteriana e sepse. Diagnóstico de doença do refluxo gastroesofágico não controlada com medicamentos também pode indicar sonda enteral. Considerar a sonda em posição enteral quando a extremidade chegar ao ângulo de Treitz, após a quarta porção do duodeno; fazer a medida externa entre coroa (nível da fontanela anterior) e calcanhar, em inglês *crown-heel*, com introdução rápida até o estômago e mais lenta até a entrada do jejuno; confirmar posição com raios-X; a partir dessa posição, sempre administrar o leite por bomba de infusão, lentamente.

### **Transição da Dieta de Sonda para Via Oral**

A transição para a via oral deve ser feita entre 32 e 34 semanas de idade gestacional, se a criança estiver sem suporte ventilatório, com dieta total e com avaliação fonoaudiológica do processo de sucção-deglutição-respiração. Se estiver adequado poderá receber o LNO no copinho e ir ao seio materno sob supervisão.

### **Situações Especiais**

- a) Se o RN apresentar distensão abdominal com  $\geq 10\%$  do valor medido no dia anterior, poderão ser testados resíduos. Se o aspecto for claro ou leitoso, pode ser mantido o volume ou se retornar para o esquema anterior, com maior intervalo (de 3 em 3 para 4 em 4 ou até 6 em 6 horas, por exemplo). Se o aspecto for anormal, esverdeado, sanguinolento, escurecido ou fecalóide, deve ser suspensa a dieta e colocada a sonda em drenagem. Se o aspecto do abdome for avermelhado, tenso, doloroso, acompanhado ou não de vômitos, resíduos anormais e/ou evacuações anormais, a dieta deverá ser suspensa e investigada enterocolite necrosante;
- b) Pelo risco potencial de transmissão vertical do CMV, leite cru só deverá ser utilizado acima de 28 semanas de idade gestacional ao nascimento ou corrigida;
- c) Cateteres umbilicais, CPAP e ventilação mecânica não são contraindicações de alimentação por sonda gástrica ou enteral. CPAP pode aumentar risco de distensão por excesso de ar no tubo digestivo;
- d) Apenas suspender a dieta nos casos listados no parágrafo anterior. Cateter venoso não deve ser mantido em território hepático e nesses casos a alimentação é um risco;

- e) Crianças com episódios repetidos de apneia com bradicardia devem ter a continuidade da dieta avaliada, para não se incorrer em risco aumentado de má-perfusão de alças e conseqüentemente enterocolite necrosante;
- f) RNs em uso de drogas vasoativas só devem receber alimentação gástrica ou enteral se houver estabilidade hemodinâmica;
- g) Crianças com distensão, resíduos não anômalos e vômitos frequentes podem receber alimentação trófica, com volume total variável de 10 a 20 ml/kg/dia, por período pré-determinado, em geral uma semana, sem aumentos diários, com o intuito de estimular o trofismo da mucosa gastrintestinal e a motilidade, com regularização dos complexos migrantes motores;
- h) RN em condição de ser colocado em método Canguru, deverá ter avaliada capacidade de coordenação de sucção-deglutição-respiração e desde que adequada, com idade gestacional igual ou superior à faixa de 32 a 34 semanas, poderá ser levado ao seio materno e, se necessário, a alimentação poderá ser complementada com LioNeo ou LHF85.

## Referências

1. Patel RM. Is possible to prevent necrotizing enterocolitis? Conference on 24<sup>th</sup> Brazilian Congress of Perinatology. Natal, RN, Brazil.
2. Fenton TR, Kim JH. A systematic review and metanalysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatrics* 2013, 13:59-71.
3. Bertino E, Coscia A, Mombrò M, Boni L, Rossetti G, Fabri C, et al. Postnatal weight increase and growth velocity of very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006; 91:F349–F356.
4. O'Connor DL, Kiss A, Tomlinson C, Bando N, Bayliss A, Campbell DM, et al. Nutrient enrichment of human milk with human and bovine milk-based fortifiers for infants weighing <1250g: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2018; 9:1–9.
5. Rigo J, Hascoët J-M, Billeaud C, Picaud J-C, Mosca F, Rubio A, et al. Growth and nutritional biomarkers of preterm infants fed a new powdered human milk fortifier: a randomized clinical trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2017; 65: e83–e93.
6. Villar J, Papageorgiou AT, Pang R, Ohuma EO, Ismail LC, Barros FC, et al. The likeness of fetal growth and newborn size across non-isolated populations in

INTERGROWTH 21<sup>st</sup> Project: The Fetal growth longitudinal study and newborn cross-sectional study. *Lancet Diabetes Endocrinology* 2014; 2(10):781-92.

7. Papageorghiou AT, Ohuma EO, Altman DG, Todros T, Cheikh Ismail L, Lambert A, et al. International standards for fetal growth based on serial ultrasound measurements: the Fetal Growth Longitudinal Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet*. 2014; 384(9946):869-79. Erratum in: *Lancet*. 2014; 384(9950):1264.
8. Villar J, Cheikh Ismail L, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG, et al. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet*. 2014; 384(9946):857-68.

## 12 ANEXO E – Manual Operacional Padronizado para Coleta de Dados do Projeto LioNeo



### Manual Operacional Padronizado – MOP

#### MOP 6 – Coleta de Dados – Enfermagem

Com a inclusão do RNMBP na pesquisa, deverão ser verificados no Cartão da Gestante e/ou no Prontuário Eletrônico do HC-Criança dados referentes às condições materna e obstétricas durante o pré-natal e nascimento, de acordo com o instrumento de coleta de dados. Os dados obtidos deverão ser inseridos no sistema REDCap.

A coleta de dados deverá ser realizada dentro das unidades neonatais participantes da pesquisa (UCIN e UTI Neo), podendo os pais ou responsáveis permanecerem ao lado do recém-nascido/criança durante toda a coleta. O ambiente de avaliação deverá estar calmo, com iluminação adequada para a realização dos procedimentos necessários, promovendo a privacidade do participante.

Todos os materiais utilizados para o projeto (TCLE, tubos para coleta de amostras, caderno do projeto entre outros) ficarão armazenados em local em armário com chave na UCIN e deverão ser recolocados no mesmo local, após o uso (exceto os materiais que necessitam de descarte), garantindo a segurança e a integridade dos materiais utilizados na pesquisa e dos profissionais envolvidos na mesma e pertencentes à instituição de saúde.

Ao entrar nas unidades neonatais a enfermeira pesquisadora deverá realizar a higienização das mãos com agente antisséptico (Clorexidina) e, antes de tocar na incubadora ou no berço e manipular o RNMBP, deverá ser feita a higiene das mãos com álcool gel à 70%.

Os participantes da pesquisa serão avaliados DIARIAMENTE, durante 21 dias, sendo o 1º dia contado a partir do dia em que a alimentação enteral estiver com volume de 100 ml por quilo de peso corporal por dia. A enfermeira pesquisadora deverá coletar os dados de acordo com o cronograma de coleta da pesquisa, descrito abaixo.

▪ **Dados Antropométricos:**

Os dados antropométricos deverão ser coletados na sequência: perímetro cefálico; circunferência abdominal, comprimento e peso. A aferição será realizada conforme descrito abaixo, 2 horas depois da dieta oferecida ou 30 minutos antes da passagem da próxima dieta.

▫ Perímetro Cefálico: **deverá ser aferido e registrado a partir da inclusão do recém-nascido/criança na pesquisa, sendo este o 1º dia. Após, realizar a coleta dos dados em dias distintos, sendo: 4º, 7º, 14º e 21º dia.**

Para aferição do PC será utilizada uma fita métrica inelástica e inextensível, com a parte inicial em branco e precisão de 0,1 cm. A enfermeira pesquisadora deverá realizar a desinfecção da fita métrica com algodão embebido em álcool à 70% antes e após o uso. Inicialmente, todos os adereços presentes na cabeça do RNMBP deverão ser retirados, bem como coxins e ninhos de tecido presentes na incubadora ou no berço que possam atrapalhar a medição. A enfermeira pesquisadora deverá posicionar a fita métrica com o lado da fita marcada em centímetros para fora e o marcador zero o mais próximo de si para possibilitar a leitura. A fita métrica deverá ser posicionada na região supraorbitária (região anterior da cabeça – logo acima das sobrancelhas) e passar pela proeminência occipital (região posterior – maior protuberância posterior da cabeça), devendo estar ajustada à cabeça do participante de forma firme, mas sem comprimir. O valor obtido deverá ser memorizado e após, os adereços de cabeça devem ser recolocados. O RNMBP deve ser reposicionado na incubadora ou berço, conforme rodízio de posicionamento realizado pela equipe de enfermagem do HC-Criança. Em seguida, o valor obtido na medição deverá ser registrado no prontuário eletrônico e no sistema REDCap.

▫ Circunferência Abdominal: **deverá ser aferida e registrada diariamente e durante 21 dias, a partir da inclusão do recém-nascido/criança na pesquisa.**

A aferição da circunferência abdominal será realizada com o uso de fita métrica inelástica e inextensível, com a parte inicial em branco e precisão de 0,1 cm. A enfermeira pesquisadora deverá realizar a desinfecção da fita métrica com algodão embebido em álcool à 70% antes e após o uso. Para aferição, a fita métrica deverá ser posicionada com o lado em centímetros para fora e o marcador zero o mais próximo da enfermeira pesquisadora, possibilitando a leitura. O recém-nascido/criança deverá estar posicionado em decúbito dorsal, com o abdome despido e a fita métrica posicionada na cicatriz umbilical da criança. O valor



obtido deverá ser memorizado e o RNMBP reposicionado na incubadora ou berço, sendo recolocadas suas roupas e ninhos ou coxins de tecidos presentes na incubadora ou berço, conforme rodízio de posicionamento realizado pela equipe de enfermagem do HC-Criança. Em seguida, o valor da circunferência abdominal deverá ser registrado no prontuário eletrônico e no sistema REDCap.

▫ Comprimento: **deverá ser aferido e registrado a partir da inclusão do recém-nascido/criança na pesquisa, sendo este o 1º dia. Após, realizar a coleta dos dados em dias distintos, sendo: 4º, 7º, 14º e 21º.**

O comprimento será aferido em centímetros, utilizando régua antropométrica com lâminas de acrílico unidas de forma retangular, a qual permite o encaixe na incubadora ou berço e apresenta escala de 0,1 cm e comprimento mínimo de 0,35m. A enfermeira pesquisadora deverá realizar a desinfecção da régua antropométrica utilizando a técnica de fricção leve de um pano umedecido em álcool à 70% na superfície do aparelho, antes de cada avaliação e ao final da coleta dos dados. O RNMBP deverá permanecer na incubadora ou berço, ser posicionado em decúbito dorsal e deverá estar sem fralda ou roupas da cintura para baixo, sendo a higiene íntima do recém-nascido/criança realizada, com algodão e água morna, caso seja necessário, antes de ser avaliado o comprimento. Deverá ser retirado todos os adereços da cabeça, os sapatos e as meias do recém-nascido/criança, assim como todos os cobertores, ninhos e/ou coxins da incubadora ou berço. Em seguida, a enfermeira pesquisadora deverá segurar o recém-nascido/criança em um dos braços e com o outro colocar o antropômetro na incubadora ou berço e deitar o recém-nascido/criança em posição anatômica sobre a base do antropômetro, mantendo os braços livremente soltos ao longo do tronco, com as pernas suavemente esticadas e os calcanhares unidos, tocando o cursor inferior do aparelho. As nádegas, as escápulas e o occipício deverão tocar a borda horizontal do antropômetro. Em seguida, a enfermeira pesquisadora deverá mover cursor superior até encostar levemente no ponto mais alto da cabeça, fazendo pressão suficiente para comprimir levemente os cabelos do recém-nascido/criança e o valor verificado deverá ser memorizado. Após aferição, a enfermeira pesquisadora deverá pegar o participante novamente no colo e retirar o aparelho do berço ou incubadora. O RNMBP deverá ser vestido novamente com suas roupas, fralda e os adereços de cabeça, sapatos e meias. Ao final da avaliação a enfermeira pesquisadora deverá colocar o recém-nascido/criança na incubadora ou berço, seguindo o rodízio de posicionamento utilizado

pela equipe de enfermagem das unidades neonatais do HC-Criança. Após, o peso corporal obtido deverá ser registrado no sistema REDCap e no prontuário eletrônico.

▫ **Peso Corporal: deverá ser aferido e registrado diariamente e durante 21 dias, a partir da inclusão do recém-nascido/criança na pesquisa.**

O peso corporal será aferido em gramas, em balança eletrônica Filizola Baby®, específica para a idade, calibrada com capacidade mínima de 125g e máxima de 15kg, apresentando precisão de 5g e tara de 9g. Para o registro do peso corporal, a balança utilizada deverá ser posicionada, em superfície plana, próxima à incubadora ou berço do RNMBP e o prato da balança deverá ser coberto com tecido leve e individual. O recém-nascido/criança deverá ser posicionado na balança em decúbito dorsal, sem roupas e/ou fralda e, caso seja necessário, a higiene íntima do recém-nascido/criança deverá ser realizada, com algodão e água morna, antes de ser colocado na balança. Ao colocar o participante na balança a enfermeira pesquisadora deverá esperar que ele se acomode e deverá permanecer posicionada em frente ao *display* da balança até que o peso se estabilize e seja memorizado. Após, o RNMBP deverá ser retirado da balança, vestido e reposicionado na incubadora ou berço, seguindo o rodízio de posicionamento utilizado pela equipe de enfermagem das unidades neonatais do HC-Criança. Em seguida, o peso corporal do recém-nascido/criança deverá ser registrado no sistema REDCap e no prontuário eletrônico.

#### ▪ **Volume de Leite Ingerido**

▫ **O volume de leite ingerido pelo recém-nascido/criança deverá ser verificado diariamente no Prontuário Eletrônico do HC-Criança, a partir do 1º dia de coleta de dados até o 21º dia.**

Para obter o volume de leite ingerido pelo RNMBP, a enfermeira pesquisadora deverá registrar no sistema REDCap o volume de leite prescrito no período de 24 horas e as sobras de leite que ficarão armazenadas em recipiente apropriado, exclusivo do projeto, para checagem pela enfermeira do projeto de pesquisa. O volume deverá ser mensurado, em mililitros e em valores absolutos, por quilo de peso do participante. A enfermeira pesquisadora deverá verificar, diariamente, a prescrição da dieta feita pela equipe médica do HC-Criança e registrar a quantidade de leite prescrita ao RNMBP no período de 24 horas. As sobras de leite ficarão

armazenadas em recipiente apropriado, dentro da UTI-Neo e da UCIN e, diariamente, a enfermeira do projeto deverá verificar e registrar a quantidade de sobras no sistema REDCap.

Caso a criança esteja em protocolo de relactação, o leite que chegará em seringas deverá ser oferecido no copinho até se completarem os 21 dias de seguimento.

#### ▪ Intercorrências

▫ **Deverão ser verificadas diariamente e a partir do 1º dia de coleta dos dados até o 21º dia, no prontuário eletrônico do HC-Criança, as intercorrências apresentadas pelo recém-nascido/criança:**

A enfermeira pesquisadora deverá verificar, diariamente, no prontuário eletrônico do HC-Criança, os registros médicos e de enfermagem, conferindo as intercorrências apresentadas pelo participante. Além disso, deverá conversar com a equipe de enfermagem e médicos para garantir que nenhum dado seja perdido.

Deverá ser verificada a presença ou não das intercorrências listadas abaixo:

Evento	Definição	Ação
Vômito	Retorno de uma quantidade maior de alimentos com o esvaziamento mais completo do estômago e geralmente ocorre em algum momento após a alimentação (Rigo et al., 2017).	Verificar a ocorrência ou não de vômito.  Data e horário do início da ocorrência, frequência, quantidade e características do conteúdo expelido.  Na ocorrência, comunicar equipe médica do projeto de pesquisa e registrar no sistema REDCap e no prontuário eletrônico.
Diarreia	Aumento do conteúdo líquido das fezes ou número de evacuações fora do padrão normal observado no recém-nascido/criança.	Verificar a ocorrência ou não de diarreia.  Data e horário do início da ocorrência, frequência, quantidade e características, padrão das fezes: (5 = dura; 4 = formadas; 3 = mole; 2 = líquida; 1 = aguada) (Rigo et al., 2017).  Na ocorrência, comunicar equipe médica do projeto de pesquisa e registrar no sistema REDCap e no prontuário eletrônico.
Distensão Abdominal	Aumento da circunferência abdominal maior que 10% em relação à última	Realizar a medição da circunferência abdominal e na ocorrência de aumento maior do

	medida rotineira não considerada distensão.	que 10% na circunferência abdominal, em relação à última medida, presença de dor e/ou abdome com coloração avermelhada e alças visíveis, comunicar equipe médica do projeto de pesquisa e do HC-Criança. Registrar a avaliação no prontuário eletrônico do HC-Criança e nome dos médicos que foram comunicados.
Sangramento Gastrointestinal	Avaliação clínica da ocorrência de hematêmese (ocorrência de vômito com sangue), melena (fezes escuras devido à presença de sangue), ou enterorragia (presença de sangue vivo nas fezes).	Verificar, no prontuário eletrônico do HC-Criança e conversar com a equipe, a ocorrência ou não de sangramento gastrointestinal.  Na ocorrência, comunicar a equipe médica do projeto de pesquisa e inserir o dado no sistema REDCap.
Enterocolite Necrosante	Enterocolite Necrosante – Critérios de Bell 1B ou mais grave, confirmada por exames clínicos e radiológicos.	Verificar, no prontuário eletrônico do HC-Criança e conversar com a equipe, a ocorrência ou não de enterocolite necrosante.  Na ocorrência, comunicar a equipe médica do projeto de pesquisa e inserir o dado no sistema REDCap.
Sepse Neonatal	Apresentação dos seguintes sintomas (Shane, Sánchez & Stoll, 2017):  Gerais: febre, instabilidade térmica, edema, má-alimentação, mau aspecto.  Gastrointestinais: distensão abdominal, vômito, diarreia ou hepatomegalia.  Sistema respiratório: apneia, dispneia, taquipneia, retrações intercostais, batimento de asas nasais, gemência e cianose.  Sistema renal: oligúria  Sistema cardiovascular: palidez, pele com aspecto mosqueado, fria ou pegajosa, taquicardia, hipotensão ou bradicardia.  Sistema Nervoso Central: irritabilidade, letargia, tremores, crises convulsivas, hiporreflexia, hipotonia, reflexo de	Verificar, no prontuário eletrônico do HC-Criança e conversar com a equipe, a ocorrência ou não de seps neonatal. Na ocorrência, comunicar a equipe médica do projeto de pesquisa e inserir o dado no sistema REDCap.

	<p>Moro anormal, respiração irregular, fontanela abaulada, choro anormal.</p> <p>Sistema hematológico: icterícia, esplenomegalia, palidez, petéquias, púrpura e sangramento.</p> <p>Laboratoriais: hemograma com leucocitose, desvio à esquerda ou leucopenia, com alterações qualitativas como granulações tóxicas e microvacúolos. Identificação de bactéria ou fungo por hemocultura, cultura de líquor ou urina.</p> <p>Sepse será confirmada por cultura, sendo que as crianças serão divididas entre sepsis suspeita e confirmada de acordo com esse critério.</p>	
Morte	Mortalidade deve ser inferior a 10% para recém-nascidos de muito baixo peso ( $\leq 1500\text{g}$ )	Em casos de óbito, comunicar equipe médica do projeto de pesquisa e registrar no sistema REDCap.

#### ▪ Dados Bioquímicos

▫ **Deverão ser coletadas amostras de sangue venoso ou arterial, fezes e urina no 1º dia de coleta dos dados e no 21º dia, para obtenção dos dados bioquímicos.**

Os dados bioquímicos serão obtidos por meio de coletas de amostras de sangue venoso ou arterial, fezes e urina, realizadas pela enfermeira pesquisadora, no 1º dia de coleta de dados e no 21º dia. Os resultados dos exames bioquímicos deverão ser verificados no Prontuário Eletrônico do HC-Criança e inseridos no sistema REDCap e no prontuário eletrônico. O período preferencial para a coleta deverá ser pela manhã.

Os materiais para a coleta das amostras de sangue venoso ou arterial, fezes e urina deverão ser retirados e devolvidos, quando não utilizados, em local seguro destinado aos materiais de uso do projeto de pesquisa. A enfermeira pesquisadora deverá separar os materiais necessários para realizar a coleta de sangue venoso ou arterial, urina e fezes, deixando-os próximos à incubadora ou berço do recém-nascido/criança. Inicialmente, a enfermeira pesquisadora deverá verificar a presença de fezes na fralda do recém-nascido/criança e obter a amostra, caso o recém-nascido/criança tenha evacuado. A coleta será realizada em material estéril (tubos e pá) e uma etiqueta deverá ser colocada no tubo após seu fechamento.

Após, será necessário realizar a higiene íntima do recém-nascido/criança, com algodão e água morna, para fixar o coletor de urina infantil. O coletor de urina infantil deverá ser fixado somente após a enfermeira pesquisadora ter realizado a higiene íntima, com algodão e água morna, mesmo que o recém-nascido/criança não tenha evacuado. Em seguida, a enfermeira pesquisadora deverá realizar o procedimento de coleta de sangue venoso ou arterial, verificando, ao término, se o recém-nascido/criança urinou e/ou evacuou para realizar a coleta destas amostras. Ao término da coleta de amostras de sangue, fezes e urina o recém-nascido/criança deverá ser reposicionado na incubadora ou berço, sendo recolocadas suas roupas e ninhos ou coxins de tecidos presentes na incubadora ou berço, conforme rodízio de posicionamento realizado pela equipe de enfermagem do HC-Criança. Após todas as amostras de todos os recém-nascidos/crianças serem coletadas, identificadas e armazenadas em recipiente apropriado, deverão ser imediatamente encaminhadas ao laboratório pela enfermeira do projeto de pesquisa.

#### - Coleta de Sangue Arterial:

Para proceder a coleta de sangue arterial a enfermeira pesquisadora deverá separar os seguintes materiais: um par de luvas de procedimento, duas bolas de algodão, álcool 70%, bandeja, seringa de 3ml, cateter agulhado “escalpe” nº 25, microtubo para coleta de amostra sangue, etiqueta de identificação do recém-nascido/criança. O manejo da dor durante o procedimento doloroso deverá seguir o protocolo estabelecido pelo HC-Criança (a enfermeira pesquisadora deverá solicitar o protocolo de manejo da dor às enfermeiras das unidades neonatais) e os materiais necessários deverão ser separados para utilização. Inicialmente, a enfermeira pesquisadora deverá verificar qualquer condição do recém-nascido/criança que contraindique o procedimento e, não havendo, poderá prosseguir com a coleta da amostra. A enfermeira pesquisadora deverá realizar a higienização das mãos com agente antisséptico (Clorexidina) e, antes de tocar a incubadora ou o berço e manipular o recém-nascido/criança deverá ser feita a higiene das mãos com álcool gel à 70%. A avaliação do local para a punção deverá ser realizada pela enfermeira pesquisadora, sendo a artéria radial ou braquial do membro superior direito ou esquerdo, os locais de primeira escolha. Após a escolha do local da punção, o “escalpe” deverá ser conectado à seringa e deverá ser realizada antissepsia, com algodão embebido em álcool à 70%, realizando movimentos circulares do centro para fora. A agulha do “escalpe” deverá estar com o bisel voltado para cima e a haste com angulação entre 30° e 45°. No momento da inserção da agulha, a enfermeira pesquisadora deverá observar o retorno de

sangue arterial no tubo do “escalpe” e aspirar o embolo da seringa até atingir quantidade suficiente para cada tubo não ultrapassando o volume das normas internacionais conforme descrito no protocolo. Posteriormente, a agulha deverá ser retirada e o local da inserção da agulha deverá ser cuidadosamente pressionado com algodão seco por 5 minutos ou até a hemostasia completa. Ao término, a enfermeira pesquisadora deverá identificar o microtubo com os dados do recém-nascido/criança e armazená-lo em recipiente apropriado, finalizando o procedimento de coleta com higienização das mãos com agente anti-séptico (Clorexidina).

#### - Coleta de Sangue Venoso:

Para proceder a coleta de sangue venoso a enfermeira pesquisadora deverá separar os seguintes materiais: um par de luvas de procedimento, duas bolas de algodão, álcool 70%, bandeja, agulha 25x0,80mm, etiqueta de identificação do recém-nascido/criança e microtubo para coleta de amostra sangue. A enfermeira pesquisadora deverá realizar a higienização das mãos com agente antisséptico (Clorexidina) e, antes de tocar a incubadora ou o berço e manipular o recém-nascido/criança deverá ser feita a higiene das mãos com álcool gel à 70%. A avaliação do local para a punção deverá ser realizada pela enfermeira pesquisadora, sendo a fossa antecubital e o dorso da mão do membro superior direito ou esquerdo, os locais de primeira escolha. O manejo da dor durante o procedimento doloroso deverá seguir o protocolo estabelecido pelo HC-Criança (a enfermeira pesquisadora deverá solicitar protocolo para enfermeiras das unidades neonatais) e os materiais necessários deverão ser separados para utilização. Após a escolha do local da punção deverá ser feita a antissepsia, com algodão embebido em álcool à 70%, realizando movimentos circulares do centro para fora. A agulha deverá estar com o bisel voltado para cima e a haste com angulação entre 15° e 30°. A enfermeira pesquisadora deverá observar o retorno de sangue venoso no canhão da agulha posicionando o microtubo para que, por gotejamento, seja coletado até atingir quantidade suficiente para cada tubo não ultrapassando o volume das normas internacionais conforme descrito no protocolo. Posteriormente, a agulha deverá ser retirada e o local da inserção da agulha deverá ser cuidadosamente pressionado com algodão seco até a hemostasia completa. Ao término, a enfermeira pesquisadora deverá identificar o microtubo com os dados do recém-nascido/criança e armazená-lo em recipiente apropriado, finalizando o procedimento de coleta com higienização das mãos com agente antisséptico (Clorexidina).

- Coleta de amostra de urina:

Para proceder a coleta de urina a enfermeira pesquisadora deverá separar os seguintes materiais: um par de luvas de procedimento, coletor de urina infantil estéril, pote para coleta de amostra de urina, etiqueta de identificação do recém-nascido/criança, seringa de 3 ml ou 5 ml, duas bolas de algodão, água morna e bandeja. Após reunir o material e realizar a higienização das mãos com agente antisséptico (Clorexidina) e com álcool à 70% antes de tocar a incubadora ou berço e manipular o recém-nascido/criança, a enfermeira pesquisadora deverá verificar a presença de fezes na fralda do recém-nascido/criança e, quando houver, deverá ser coletada a amostra de fezes e realizada a higiene íntima, com algodão e água morna, para fixar o coletor de urina infantil. A higiene íntima deverá ser realizada, com algodão e água morna, mesmo na ausência de fezes. Nos recém-nascidos/crianças do sexo feminino, o coletor de urina infantil deverá ser fixado na região dos grandes lábios, com a abertura do coletor cobrindo o canal uretral e nos recém-nascidos/crianças do sexo masculino o coletor de urina infantil deverá ser fixado de modo que o pênis do recém-nascido/criança permaneça dentro da bolsa do coletor. A enfermeira pesquisadora deverá aguardar a micção espontânea do recém-nascido/criança, podendo proceder à coleta da amostra de sangue e, posteriormente, verificar a presença de urina no coletor. Ao verificar a presença de urina no coletor, a enfermeira pesquisadora deverá retirar, cuidadosamente, o coletor de urina infantil e realizar a higiene íntima do recém-nascido/criança, com algodão e água morna. O coletor de urina infantil poderá ficar fixado no paciente até que apresente diurese. Toda a quantidade de urina presente no coletor deverá ser retirada com auxílio de uma seringa e colocada no pote para coleta de amostra de urina que deverá ser identificado com os dados do recém-nascido/criança e armazenado em recipiente apropriado para ser encaminhado ao laboratório. O procedimento deverá ser finalizado com higienização das mãos com agente antisséptico (Clorexidina).

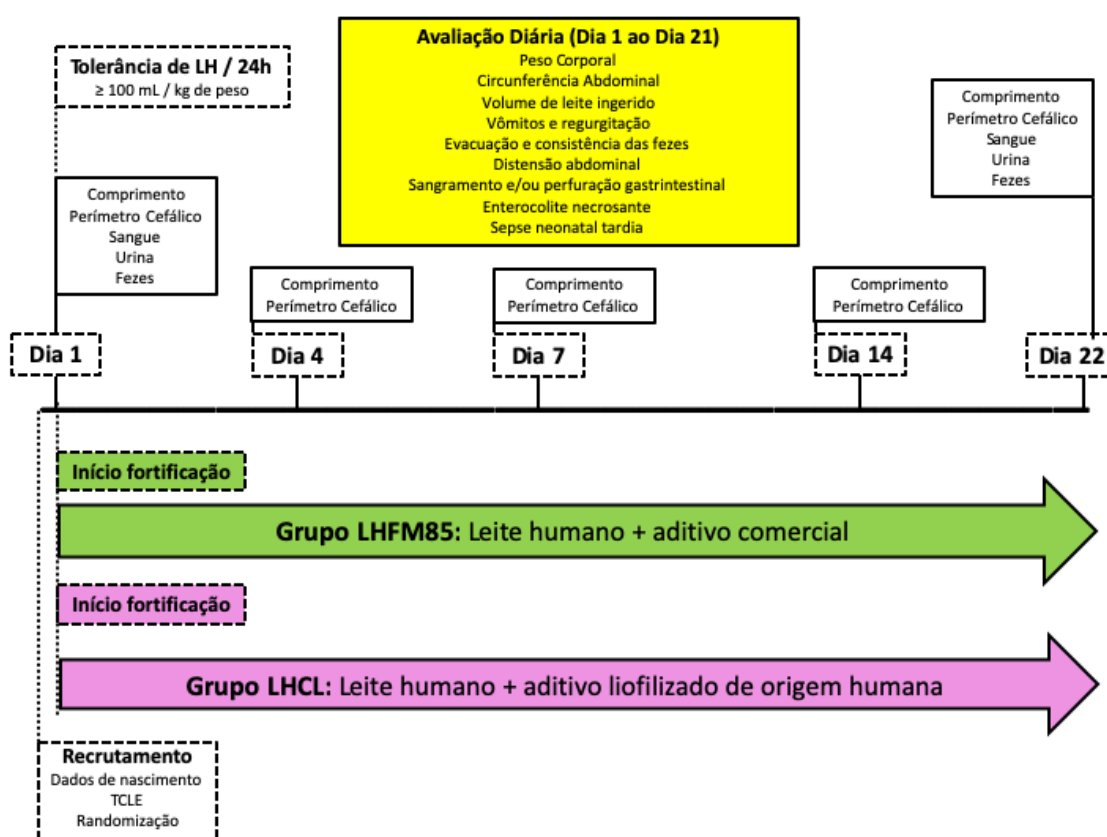
- Coleta de amostra de fezes:

Para proceder a coleta de fezes a enfermeira pesquisadora deverá separar os seguintes materiais: um par de luvas de procedimento, pote para coleta de amostra de fezes, uma espátula pequena, etiqueta de identificação do recém-nascido/criança, duas bolas de algodão, água morna e bandeja. Após reunir o material e realizar a higienização das mãos com agente antisséptico (Clorexidina) e com álcool à 70% antes de tocar a incubadora ou berço e manipular o recém-nascido/criança a enfermeira pesquisadora deverá verificar a presença de fezes na fralda do recém-nascido/criança e, quando houver, deverá ser coletada a amostra de fezes e a



higiene íntima deverá ser realizada com algodão e água morna. Na ausência de fezes, a enfermeira pesquisadora poderá proceder a coleta de sangue e verificar, posteriormente, se o recém-nascido/criança evacuou. O material deverá ser colhido com auxílio de uma espátula pequena, na quantidade de uma colher de café, e ser colocado no pote para coleta de amostra de fezes que deverá ser identificado com os dados do recém-nascido/criança e armazenado em recipiente apropriado para ser levado ao laboratório. O procedimento deverá ser finalizado com higienização das mãos com agente antisséptico (Clorexidina).

A figura abaixo mostra o resumo da coleta de dados do projeto de pesquisa:



Todos os tubos deverão ser embalados em papel alumínio e uma outra etiqueta deverá ser colocada na parte externa. Esses tubos deverão ser transportados até o laboratório e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Deverá ser anotado o número da caixa e sua posição de armazenamento no freezer no REDCap.

#### - Pressão Arterial

Para aferir a pressão arterial a enfermeira pesquisadora deverá escolher a braçadeira adequada para o tamanho do membro do RNMBP e conectá-la ao medidor de sinais vitais,

obtendo os valores e comparando-os aos valores disponibilizados no ANEXO B. Obtendo valores dentro dos parâmetros de normalidade a enfermeira pesquisadora poderá considerar o RNMBP candidato em potencial para participar da pesquisa.

- Anotação no Documento Fonte

Todos os dados coletados deverão ser anotados nas observações do paciente no prontuário eletrônico conforme o modelo abaixo:

D (x – anotar o dia de avaliação e o horário)

Paciente avaliado de acordo com o fluxograma de fase 1 do Projeto LioNeo

Peso:

Circunferência Abdominal:

Comprimento:

Perímetro Cefálico:

Coleta de sangue:

Coleta de Urina:

Coleta de fezes:

Reações Adversas:

(OBS: quando não for o dia da coleta, anotar N/A, se não houver reações adversas anotar: Nenhuma até o momento da coleta).

### 13 APÊNDICE A – Análises adicionais não previstas no protocolo inicial do estudo

Contagem de dias de recebimento de alimentação por grupo de estudo

Dias de alimentação	Grupo controle (%)	Grupo LioNeo (%)	Total
4	2 (10)	0 (0)	2
8	1 (5)	0 (0)	1
9	1 (5)	1 (5)	2
11	0 (0)	1 (5)	1
12	0 (0)	1 (5)	1
13	0 (0)	2 (10)	2
15	1 (5)	1 (5)	2
17	1 (5)	1 (5)	2
19	0 (0)	1 (5)	1
20	4 (20)	1 (5)	5
21	10 (50)	11 (55)	21
Total	20	20	40

Comparação entre as médias dos Grupos (A – LioNeo e B – LHF85) de peso, comprimento e perímetro cefálico com o modelo linear de efeitos mistos (ajustado pelo volume médio diário ingerido de dieta)

Variável	Comparação	Diferença entre as médias	p-valor	Limite inferior IC95%	Limite superior IC95%
Peso	AD1 - AD22	-342,50	< 0,01	-397,17	-287,83
	BD1 - BD22	-424,25	< 0,01	-478,92	-369,58
	AD1 - BD1	-0,66	0,99	-124,40	123,07
	AD22 - BD22	-82,41	0,19	-206,15	41,32
Comprimento	AD1 - AD22	-2,68	< 0,01	-3,37	-1,99
	BD1 - BD22	-3,20	< 0,01	-3,89	-2,51
	AD1 - BD1	-0,18	0,78	-1,46	1,11
	AD22 - BD22	-0,70	0,28	-1,98	0,59
Perímetro Cefálico	AD1 - AD22	-2,20	< 0,01	-3,01	-1,38
	BD1 - BD22	-2,12	< 0,01	-2,93	-1,30
	AD1 - BD1	0,31	0,61	-0,91	1,53
	AD22 - BD22	0,39	0,52	-0,83	1,61

D1: dia 1; D22: dia 22.

Velocidade de peso, comprimento e perímetro cefálico entre os grupos (A – LioNeo e B – LHF85) usando o teste não paramétrico de Mann Whitney

Grupo	n	Velocidade	Média	Desvio padrão	Q1	Mediana	Q3
A LioNeo	20	Peso	19.38	19.89	10.81	13.55	16.15
		Comprimento	0.89	0.44	0.50	0.88	1.25
		Perímetro Cefálico	0.91	0.56	0.50	0.73	1.07
B Controle	20	Peso	17.37	6.99	12.98	16.91	20.58
		Comprimento	1.15	0.43	0.83	1.10	1.40
		Perímetro Cefálico	0.75	0.47	0.47	0.73	1.00

\*P valor para peso: 0.15; p valor para comprimento: 0.09; p valor para perímetro cefálico: 0.57.