Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública
Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública

Relação do sobrepeso e obesidade materna sobre parâmetros imunológicos, bioquímicos e hormonais do sangue e colostro humano

Mahmi Fujimori

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Saúde Pública para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Saúde, Ciclos de Vida e Sociedade.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Abreu.

São Paulo
2016

Relação do sobrepeso e obesidade materna sobre parâmetros imunológicos, bioquímicos e hormonais do sangue e colostro humano

Mahmi Fujimori

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Saúde, Ciclos de Vida e Sociedade

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Abreu

São Paulo
2016

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.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a meus pais, Sayoko e Shoichi Fujimori, pelo incentivo e apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS pela força interior nas adversidades, por me guiar quando os caminhos pareciam incertos. As dificuldades fortaleceram ainda mais a minha fé!

Aos meus familiares, meus maiores incentivadores, em especial aos meus pais Sayoko e Shoichi. Ser generoso é apoiar em todos os sentidos mesmo sem entender em toda plenitude do que se trata um doutorado, é não ter idéia do que são citocinas e mesmo assim acreditar na relevância do que faço e me incentivar em minhas escolhas! À minha irmã Mahyumi, quando as minhas mãos não foram suficientes para pipetar tantos reagentes e pra preencher tantos pocinhos das placas de ELISA em tão pouco tempo as suas foram essenciais pra que eu finalizasse com êxito esta etapa da pesquisa, estou te devendo essa!

Ao professor Luiz Carlos de Abreu, orientador desta pesquisa, agradeço pela confiança, por me permitir conduzir a pesquisa com autonomia, por ter me dado a oportunidade de enxergar o meio acadêmico com um olhar diferente do que eu já tinha. O seu exemplo de ousadia e superação nos inspira a acreditar que sempre é possível ir mais longe!

Aos professores Adenilda Cristina Honório-França e Eduardo Luzia França que em um certo dia durante a graduação me disseram que eu tinha o perfil de uma pessoa que segue a jornada da ciência, da pesquisa. Se hoje estou finalizando a minha tese de doutorado é porque levei a sério o potencial que vocês enxergaram em mim! Muito obrigada por me conduzirem nos primeiros passos na iniciação científica e por terem mantido as portas abertas durante o doutorado! O Laboratório de Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal de Mato Grosso foi fundamental para a execução dos protocolos experimentais deste projeto e estar com vocês sempre é uma oportunidade de aprender! Espero que a nossa parceria se mantenha por muitos e muitos anos!

Ao professor Fernando Afonso Fonseca da Faculdade de Medicina do ABC pela humildade e atitude sempre colaborativa.

Ao professor Claudio Leone, a quem tenho profundo respeito e admiração, sempre solícito em compartilhar seus conhecimentos e que tem contribuído com o projeto desde o exame de qualificação.

Aos professores Viviane Gabriela Nascimento e Cícero Cruz Macedo pelas sugestões e recomendações que muito colaboraram para a evolução da tese.

Aos professores do Departamento de Saúde Materno-Infantil e aos demais docentes da instituição que contribuíram para o desenvolvimento do projeto de pesquisa e acima de tudo para a minha formação.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Saúde Materno-Infantil: Leandro Firmino Cleto, Carmen Almeida Castelani e Lígia Went Rosa Mota. Muito obrigada pela disponibilidade e vontade de ajudar!

Ao pessoal da secretaria da pós-graduação: Renilda M. F. Shimomo, Ulysses M. D. M. da Silveira, Marilene Pereira, Vânia dos Santos da Silva, Ângela de Andrade, Ângela Fernandez, Alessandra Blaya. Muito obrigada pela paciência e atenção de vocês!

A todos os funcionários da biblioteca da Faculdade de Saúde Pública da USP e do restaurante universitário que sempre prestaram um serviço de excelente qualidade aos alunos e nos trataram com carinho e simpatia!

Ao Hospital Maria José dos Santos Stein por permitir a realização do projeto em seus serviços e a seus funcionários que gentilmente contribuíram para a coleta das amostras da pesquisa.

À Vanessa Fiorin pelo seu comprometimento e companheirismo na obtenção das amostras de sangue materno e colostro.

Aos amigos da Faculdade de Saúde Pública: Vanessa Ribeiro da Silva, Tassiane Morais, Sandra Nagaki, Rosário Yajahuanca, Cláudia Sebba, Caio Moreira, Leonardo Sueveges, Denise Santana, Eliane Masuda, Ivy Luizi, Cleiton Fiório, André Fiório, Letícia Marteis, Ana Paula Francisco, Agda Oliveira, Freddy Galvis, Alexandra Pava, Ana Paula Sayuri, Maysa Motoki, Vicente Lordello, Vanessa Sayuri, Karen Sayuri e Angela Sun Li. Agradeço a cada um de vocês pela parte leve e descontraída desses quatro anos de doutorado! Vocês deram um colorido e motivação a mais para a minha estadia em Sampa!

Aos amigos e colegas de laboratório da Universidade Federal de Mato Grosso: Rafael Souza Pessoa, Danny Laura Gomes Fagundes, Leila Santos, Denise Rupolo, Joelson Candido Dantas da Rosa, Rubian Trindade da Silva, Cristiane Hara, Edson Scherer, Elton Ribeiro, Patrícia Ribeiro, Lucas Venturini e Larissa Ribeiro. Muito obrigada por terem compartilhado tempo, conhecimento e momentos divertidos nos meses em que estive em Barra do Garças!

A cada uma das mães que compreenderam a significância do trabalho e se sentiram igualmente importantes por participar da pesquisa, possibilitando a execução do estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos meses iniciais de bolsa de doutorado. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP) pela bolsa de doutorado (Número do Processo: 2012/16662-0) que permitiu que eu me dedicasse, integralmente, ao longo de todo doutorado, à minha pesquisa e pelo Auxílio Regular à Pesquisa (Número do Processo: 2012/17843-8) essencial para a aquisição dos materiais de consumo necessários aos procedimentos experimentais do projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo e que porventura não tenham sido citados. A todos vocês os meus mais sinceros agradecimentos!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

APRESENTAÇÃO

As bases conceituais da presente tese serão apresentadas na “Introdução”. Em “Método” estão as informações sobre a coleta de dados e técnicas utilizadas para a mensuração dos parâmetros avaliados na pesquisa. Na parte de “Resultados” e “Discussão” serão apresentados três artigos científicos, dentre os quais um se encontra publicado no periódico BMC Pregnancy & Childbirth, outro se encontra submetido na Clinical Science e, por último, um artigo inédito para a avaliação da banca. A seguir, as “Considerações finais” do estudo.

RESUMO

Fujimori M. Influência do sobrepeso e obesidade materna sobre parâmetros imunológicos, bioquímicos e hormonais do sangue e colostro humano. 2016. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Introdução: A obesidade materna durante a gestação é caracterizada por um estado exagerado de inflamação comparado às gestações mães sem excesso de peso. Existem evidencias de que um delicado balanço de componentes pró e anti-inflamatórios é transferido da mãe para a criança através da amamentação. Não se sabe se a inflamação sistêmica materna que está presente em mulheres obesas influencia no perfil de citocinas e hormônios do sangue e colostro. **Objetivos:** Avaliar os perfis de citocinas TH1, TH2, TH3, TH17 no sangue e colostro de mães com excesso massa corporal, e verificar os parâmetros bioquímicos, imunológicos e hormonais do sangue e colostro humano. **Método:** Foram avaliadas 68 mães, assim distribuídas: eutróficas (n=25), sobrepeso (n=24) e obesidade (n=19). As concentrações de glicose, triglicérides e colesterol total foram mensuradas por método colorimétrico enzimático, e de proteínas totais por método colorimétrico. Teor de gordura e calorias do colostro foram obtidos por método do Crematócrito. Os hormônios leptina e adiponectina foram quantificados por método imunoenzimático de ELISA. Imunoglobulinas, proteínas do complemento (C3 e C4) e PCR por turbidimetria. As concentrações de citocinas foram avaliadas por Citometria de fluxo. **Resultados:** Observou-se maiores níveis de glicose, teor de gordura, calorias e IgA no colostro de mães obesas. As concentrações séricas de triglicérides, colesterol, IgA, PCR e das proteínas do complemento C3 e C4 foram significantemente maiores em mães obesas. Não foram detectadas significantes variações entre os grupos estudados nas concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 tanto no sangue materno como no colostro. As mães obesas apresentaram os maiores níveis séricos de IL-6 e TNF-α e as menores concentrações de TGF-β no colostro. Verificou-se maiores níveis de leptina no sangue materno e colostro de mães obesas. As mães obesas apresentaram os

menores níveis de adiponectina no sangue. No colostro houve aumento na concentração deste hormônio. **Conclusões:** Os resultados do presente estudo sugerem que a obesidade materna pode levar a alterações dos componentes bioquímicos, imunológicos e hormonais do colostro humano ocasionando repercussões em seu papel no desenvolvimento do recém-nascido.

Descritores: Sobrepeso, Obesidade, Colostro, Sangue, Citocinas, Hormônios

ABSTRACT

Fujimori M. Influence of overweight and maternal obesity on immunological, biochemical and hormonal parameters of blood and human colostrum. 2016. 112 f. Thesis (PhD in Science) – Postgraduate Program in Public Health, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

Introduction: Maternal obesity during pregnancy is characterized by an exaggerated state of inflammation compared to mothers without excess weight. There is evidence that a delicate balance of proinflammatory and anti-inflammatory compounds is transferred from mother to infant via breastfeeding. It is unknown whether the maternal systemic inflammation that is present in obese women influences the cytokine levels of colostrum. **Objective:** To evaluate the cytokine profile Th1, TH2, TH3, TH17 of blood and colostrum of overweight and obese mothers, and verify biochemical, hormonal and immunological parameters of human blood and colostrum. **Methods:** Were evaluated 68 mothers that were divided according to their BMI status: lean (n=25), overweight (n=24) and obese (n=19). The concentrations of glucose, triglycerides and total cholesterol were measured by colorimetric enzymatic method, and total proteins by colorimetric method. Fat content and calories of colostrum were obtained by Creamatocrit method. The hormones leptin and adiponectin were measured by ELISA technique. Immunoglobulins and complement protein (C3 and C4) and PCR by Turbidimetric method. Concentrations of cytokines were assessed by flow cytometry. **Results:** We observed higher glucose levels, fat content, calories and IgA in colostrum of obese mothers. Serum concentrations of triglycerides, cholesterol, IgA, CRP, C3 and C4 complement proteins were significantly higher in obese mothers. No significant differences in concentrations of the cytokines IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17 were found between the groups studied in maternal blood and colostrum. The obese mothers had the highest serum levels of IL-6 and TNF-α and minor concentrations of TGF-β in colostrum. We found higher leptin levels in maternal blood and colostrum of obese mothers. Obese mothers had the lowest adiponectin levels in blood. In colostrum there was an increase in

the concentration of this hormone. **Conclusions:** The results of this study suggest that maternal obesity changes biochemical, immunological and hormonal components of human colostrum leading to repercussions in its role in the development of the newborn.

Keywords: Overweight, Obesity, Colostrum, Blood, Cytokines, Hormones

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

2. OBJETIVOS 23

2.1. OBJETIVO GERAL 23

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

3. MÉTODO 14

3.1. DESENHO E LOCAL DO ESTUDO 24

3.2. TAMANHO AMOSTRAL 24

3.3. VARIÁVEIS 24

3.3.1. Variáveis de controle 24

3.3.2. Variáveis Independentes 25

3.3.3. Variáveis Dependentes 25

3.4. SELEÇÃO DOS SUJEITOS 25

3.4.1. Identificação dos sujeitos 25

3.4.2. Critérios de inclusão 25

3.4.3. Critérios de exclusão 25

3.4.4. Critérios de descontinuidade 25

3.5. TÉCNICAS DE COLETA 26

3.5.1. Estado Nutricional Pré-Gestacional 26

3.5.2. Idade gestacional 27

3.6. MÉTODOS DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS 27

3.6.1. Obtenção de sobrenadante de colostro humano 27

3.6.2. Obtenção do Soro Sanguíneo 27

3.7. TÉCNICAS DE ANÁLISE DAS AMOSTRAS 27

3.7.1. Determinação dos níveis de glicose 27

3.7.2. Determinação da concentração de proteínas totais 27

3.7.3. Determinação dos níveis de colesterol 28

3.7.4. Determinação da concentração de triglicérides 28

3.7.5. Determinação de PCR 28

3.7.6. Análises de leptina e adiponectina 28

3.7.7. Determinação das concentrações de IgA, IgM e IgG 28

3.7.8. Determinação da concentração de C3 e C4 29

3.7.9. Análise do Crematócrito 29

3.7.10. Quantificação das Citocinas 29

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA 30

3.9. ASPECTOS ÉTICOS 30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 31

4.1. ARTIGO 1 32

4.2. ARTIGO 2 40

4.3. ARTIGO 3 69

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 87

6. REFERÊNCIAS 88

ANEXOS 100

1. Anexo1: Termo de Anuência 101
2. Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 103
3. Anexo 3: Aprovação no Comitê de Ética 106
4. Anexo 4: Currículo Lattes do orientador 109
5. Anexo 5: Currículo Lattes da aluna 112

1. INTRODUÇÃO

A prevalência do sobrepeso e da obesidade vem aumentando mundialmente em taxas alarmantes nas últimas décadas (WHO, 2000; NG et al. 2014) e representa um dos maiores desafios de saúde pública da atualidade por sua forte associação com o risco de ocorrência de doenças e consequentemente aumento de morbidade e mortalidade (NATIONAL AUDIT OFFICE, 2001; SMITH & SMITH, 2016). Como parte natural dessa epidemia global de obesidade, o número de mulheres em idade reprodutiva com excesso de peso também é crescente em todo o mundo (LINNÉ, 2004; MANSOUR, 2004).

No Brasil, o excesso de peso em mulheres foi estimado em 48% e a obesidade em 16,9% (BRASIL, 2010). Em estudo realizado em seis capitais brasileiras verificou-se prevalência de 28% de excesso de peso pré-gestacional entre mulheres atendidas em Unidades de Saúde (NUCCI et al. 2001). A obesidade na gestação tem sido associada a desfechos materno-fetais adversos e figura como um dos principais desafios da prática obstétrica na atualidade, com diversos efeitos negativos a curto e longo prazo tanto para a mãe quanto para o concepto (RAMSAY et al. 2002; STEWART et al. 2007; GUELINCKX et al. 2008; FAUCETT et al. 2016).

A obesidade é uma doença crônica de caráter multifatorial definida como um acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo que pode levar a prejuízos para a saúde (WHO, 1999). Dados epidemiológicos sugerem que a obesidade está relacionada a uma maior incidência e gravidade de doenças infecciosas (FALAGAS & KOMPOTI, 2006). Os mecanismos responsáveis por essa menor resposta imunológica ainda não foram totalmente elucidados, mas podem ser resultado do estado de inflamação crônica de baixo grau associado à doença (WOMACK et al. 2007).

Evidências emergentes também sugerem que a inflamação vincula a obesidade a várias alterações gestacionais (DENISON et al. 2010). A inflamação é regulada local e sistemicamente por vários sinais bioquímicos. Um dos mais importantes mediadores desses sinais são as citocinas, que podem ser geralmente classificadas como pró ou anti-inflamatórias. Elas permitem que o organismo responda rapidamente a um desafio imunológico através da coordenação de uma resposta imunológica adequada (CHEN & LIU, 2009).

Os linfócitos CD4+ produzem a maioria das citocinas responsáveis pelos processos imunológicos. Sobre as bases de produção de citocinas as células T foram classificadas inicialmente em duas populações: padrão de produção T “helper” 1 (Th1) e padrão de produção

T “helper” 2 (Th2). As células Th1 atuam na imunidade mediada por células, promovem a inflamação, citotoxicidade e são responsáveis pela hipersensibilidade tardia, enquanto as células Th2 atuam na imunidade humoral e fazem regulação das ações inflamatórias de Th1 (RENGARAJAN et al. 2000). Outros perfis de citocinas também têm sido descritos para os linfócitos T CD4+, entre estes, Th3, Tr1, Th17 (REINHARDT ET AL, 2006).

No sobrepeso e na obesidade há controvérsias em relação ao equilíbrio entre citocinas de padrão de ativação celular de linfócitos T CD4+ Th1 e Th2. Enquanto alguns autores relatam um desvio para a produção de citocinas de perfil Th1 (PACÍFICO et al. 2006; SVEC et al. 2007; ROCHA et al. 2008; WINER et al. 2009), outros relatam aumento do perfil Th2 (HERSOUG & LINNEBERG, 2007; CIPRANDI et al. 2011; VAN DER WEERD et al. 2012).

Nos últimos anos, o tecido adiposo passou a ser reconhecido como um importante órgão endócrino e metabolicamente ativo que expressa e/ou secreta várias substâncias bioativas de ação local ou sistêmica. Essas substâncias chamadas adipocinas estão envolvidas em processos metabólicos, imunológicos e neuroendócrinos e podem apresentar ações antagonistas no processo inflamatório (TILG & MOSCHEN, 2006; KERSHAW & FLIER, 2004). Estão associados como adipocinas as citocinas tipicamente pró-inflamatórias, como as IL-1, IL-6, IL-8, a TNFα e as produzidas pelas células T-helper 1 (Th1) como a IL-2 e o IFN-γ (KELLY, 2001), a leptina e a resistina (HOLCOMB et al. 2000). Entre as adipocinas com ação antiinflamatória estão: receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra), a citocina fator transformador crescimento-β (TGF-β), e as citocinas produzidas pelas células T-helper 2 (Th2) como a IL-4, IL-5, IL-10 (KELLY, 2001), IL-13 (KANG et al. 2008) e a adiponectina (NEUMEIER et al. 2006).

A obesidade é caracterizada por uma produção anormal de citocinas e ativação de vias de sinalização proinflamatórias na qual alguns marcadores de inflamação se encontram elevados como a IL-6, o TNFα e a leptina, em detrimento da redução nos níveis de adiponectina e IL-10 (HERSOUG & LINNEBERG, 2007).

Os riscos associados à obesidade se tornam ainda mais preocupantes em mulheres em idade reprodutiva (GUELINCKX et al. 2008; POSTON et al. 2011), uma vez que a gestação está associada a uma resposta inflamatória generalizada onde ocorrem mudanças substanciais no sistema imunológico. Na gestação, enquanto há uma evidente ativação do sistema imunológico inato, o sistema imunológico adaptativo se encontra suprimido, o que pode representar um mecanismo compensatório particularmente importante na defesa imunológica materna para infecções.

A combinação de obesidade e gestação está associada não apenas com marcadores de hiperinsulinemia e dislipidemia, mas também com comprometimento da função endotelial, aumento na pressão sanguínea e nos níveis circulantes de citocinas e proteínas inflamatórias de fase aguda (RAMSAY et al. 2002; RETNAKARAN et al. 2003; MADAN et al. 2009; STEWART et al. 2007; FARAH et al. 2012; FAUCETT et al. 2016). Há relatos de que o estado de inflamação crônica decorrente da obesidade materna pode se estender para uma resposta inflamatória exagerada na placenta, com acumulação de macrófagos e produção de mediadores pró-inflamatórios (CHALLIER et al. 2008).

Evidências clínicas e experimentais sugerem que mesmo em gestações normais há uma ativação de componentes celulares e humorais da resposta imunológica inata. São observados aumentos tanto no número como na atividade fagocítica e ¨burst¨ oxidativo de monócitos e neutrófilos (SACKS et al. 1998; SHIBUYA et al. 1987; KOUMANDAKIS et al. 1986). Além disso, encontram-se elevados os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias IL-6 (AUSTGULEN et al. 1994), TNF-α e IL-1 (MELCZER et al. 2003) e de proteínas de fase aguda, incluindo a proteína C reativa (PCR) (SACKS et al. 2004). A resposta inflamatória materna parece ser modulada para possibilitar o estabelecimento e manutenção da gestação (GUILBERT, ROBERTSON & WEGMANN, 1993).

A inflamação é uma reação complexa associada com diversas doenças, mas também está envolvida em estados fisiológicos normais, tais como os processos reprodutivos, entre estes, a ovulação, a menstruação, a implantação e o parto. Porém, uma reposta inflamatória exagerada pode ser um fator desencadeante das mais frequentes complicações obstétricas como aborto espontâneo, parto prematuro, rotura prematura pré-termo de membranas, pré-eclâmpsia e lesão fetal (ROMERO et al. 2007; DENISON et al. 2010).

Acumulam-se evidências de que a inflamação na fase fetal pode ser um dos principais mecanismos que levam a complicações também no período neonatal, assim como durante a infância. Além disso, a reprogramação da resposta imunológica fetal pode ser um fator de predisposição para o desenvolvimento de doenças na idade adulta (ROMERO et al. 2007).

Durante a gestação, as citocinas desempenham um importante papel na modulação do sistema imunológico materno e podem exercer efeitos benéficos ou deletérios a depender dos níveis presentes. Assim, o sucesso reprodutivo está associado a uma fina regulação nas atividades de citocinas (AUSTGULEN et al. 1994) onde há necessidade de um balanço entre citocinas Th1 e Th2 para o crescimento e desenvolvimento do feto (AGARWAL et al. 2000).

O peso excessivo durante a gestação contribui para uma maior morbidade e mortalidade perinatal com potenciais consequências a longo prazo para a mãe e para a criança (THORTON et al. 2011). A exposição do feto a esse ambiente inflamatório durante seu desenvolvimento está relacionada com diversos resultados perinatais desfavoráveis, incluindo desde mortes fetais, nascimento prematuro (GUELINCKX et al. 2008), aumento das taxas de partos operatórios (ARENDAS, QIU & GRUSLIN, 2008), maior prevalência de fetos macrossômicos (TENENBAUM-GAVISH & HOD et al. 2013; NUCCI et al., 2001b), infecções respiratórias durante o período neonatal e infância (PARSONS et al. 2012; HÅBERG et al. 2009) a consequências negativas na programação metabólica da obesidade e da resistência à insulina (CHALLIER et al. 2008).

A obesidade materna exerce um efeito estatisticamente significante na redução da fertilidade e está associada com intercorrências gestacionais como abortos espontâneos, diabetes gestacional, hipertensão gestacional, pré-eclâmpsia (TENENBAUM-GAVISH & HOD et al. 2013; ARENDAS, QIU & GRUSLIN, 2008; GUELINCKX et al. 2008; LINNÉ, 2004; KABIRU & RAYNOR, 2004).

Há evidências de que a tolerância materna a aloantígenos fetais parece estar associada ao predomino da imunidade do tipo Th2 sobre o Th1, levando à proteção do feto do sistema imunológico materno. O predomínio de Th1 tem sido verificado nos casos de aborto recorrente (PICCINNI et al; 1998, SAITO et al. 2010), espontâneo (RAGHUPATHY et al. 1997; SAITO et al. 2010), e de pré-eclâmpsia (SAITO et al. 2003; SAITO et al. 2010). Porém, a existência de indícios de que o predomínio da imunidade Th2 pode estar associado a casos de aborto recorrente (CHAOUAT et al. 2003; SAITO et al. 2010) tornou o balanço Th1/Th2 insuficiente para explicar o mecanismo que previne a rejeição do aloenxerto fetal.

Estudos sugerem que respostas caracterizadas como Th17 e T reguladoras (Treg) também são relevantes na gestação (PECK et al. 2009, SAITO et al. 2010; D'ADDIO et al. 2011). As células Th17 representam subtipos das células T helper efetoras e parecem desempenhar papel na tolerância materno-fetal pela secreção da citocina IL-17 (PECK al. 2009; CROME et al. 2010; D'ADDIO et al. 2011). A IL-17 tem sido descrita como indutora de inflamação em doenças autoimunes e na rejeição aguda dos transplantes (PECK al. 2009; CROME et al. 2010).

As células Treg por sua vez expressam citocinas anti-inflamatórias específicas como IL-10 e Fator Transformante de Crescimento-β (TGF-β), as quais diminuem uma resposta imunológica efetora excessiva (JUTEL et al. 2003) e induzem a tolerância ao inibirem a produção e proliferação de citocinas nas células T CD4+ e CD8+, a produção de imunoglobulina pelas

células B, a atividade citotóxica das células natural killer e a maturação das células dendríticas (SAKAGUCHI et al. 2005; AKBAR et al. 2007; SAITO et al. 2010).

Na gestação, o sistema imunológico materno é modificado pelos antígenos fetais e as células Treg irão predominar sobre as células Th17 para garantir a sobrevivência fetal (FIGUEIREDO & SCHUMACHER, 2016). De fato, enquanto gestações normais estão relacionadas com uma redução na frequência de células Th17, um aumento na prevalência dessas células tem sido verificado em abortos espontâneos (WANG et al. 2010). Considerando a associação entre respostas imunológicas e resultados pré e pós-natal, a identificação de alterações no sistema imunológico seria de interesse na prevenção de resultados adversos durante a gestação e a amamentação. Entretanto, o perfil imunológico durante a gestação e a lactação associados a alterações de estado nutricional materno precisa ser melhor definido.

De acordo com os achados recentes há uma diminuição global de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-γ, IL-1β, e IL-6, e aumento de citocinas com atividades regulatórias, como a IL-10, na evolução da gestação. Tais alterações parecem reforçar o papel imunomodulador para a manutenção e desenvolvimento da gestação normal (DENNEY et al. 2011).

Sabe-se que interações materno-fetais são bidirecionais, enquanto o tecido feto placentário necessita de ambiente adequado em condições de homeostase, a mãe é influenciada por fatores de adaptação em seu metabolismo. A imunidade Th2 e TGF-β produzido pelas células Th3 parecem desempenhar papéis protetores durante a gestação, evidenciando assim a relação entre o predomínio das respostas Th2/Th3 e o sucesso da gestação (RAGHUPATHY, 1997). As células reguladoras Th3 possuem ainda propriedades supressoras para Th1 e Th2 (WEINER, 2001).

Estudos com animais verificaram que no período neonatal, os linfócitos T estimulados *in vitro* podem proliferar na presença das citocinas IL-4 e IL-7, demonstrando que são células imaturas, passíveis de modulação (ADKINS, 1999). Sabe-se que ainda que a dieta pode interferir no perfil Th1/Th2 (KHAN et al. 2006). Estudos experimentais também relatam que a transferência materna durante a gestação, e a persistência através do leite materno são importantes fatores imunomoduladores sobre o sistema imunológico do neonato (NGUYEN et al. 2007).

A imunidade passiva adquirida pelo feto através do aleitamento materno é fundamental para a adaptação do neonato no ambiente extra-uterino. A existência de variação rítmica nos componentes celulares, imunológicos e bioquímicos do leite humano tem sido relatada e

representa um mecanismo adicional de amamentação para melhorar a adaptação às mudanças ambientais do recém-nascido e um mecanismo auxiliar fisiológico de defesa da criança para infecções (FRANÇA et al. 2010).

Ao nascimento, a transferência do recém-nascido de um ambiente estéril para um ambiente povoado de microrganismos, expõe-no a diferentes agentes microbianos, alguns dos quais potencialmente patogênicos. Os neonatos apresentam sistema imunológico imaturo e, para suprir esta deficiência de imunidade, e a manutenção de transferência passiva, o colostro e o leite materno são importantes, pois são ricos em componentes de defesa e atuam como um suplemento imunológico importante quando considerado a situação de imaturidade do sistema de defesa do recém-nascido (CARNEIRO-SAMPAIO et al. 1982).

Os neonatos carecem da capacidade de produzir respostas imunológicas eficazes para microorganismos, e durante vários meses após o nascimento, a principal defesa para a infecção é a imunidade passiva através da amamentação (HANSON et al. 1998; HANSON, 2007). O leite materno não contém apenas uma quantidade balanceada de nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos bebês, mas também uma grande variedade de componentes imunológicos que fornecem proteção para os recém-nascidos, particularmente para infecções respiratórias e gastrintestinais (CHANTRY et al., 2006; FRANÇA et al. 2011). Esses fatores incluem anticorpos, proteínas do sistema complemento, células imunocompetentes (ISLAM et al. 2006, SMITH & GOLDMAN 1968), oligossacarídeos (NEWBURG, 2005), hormônios (LONNERDAL, 2000; ABDULLA et al. 2005; ÇATL et al. 2014), antioxidantes como a enzima superóxido dismutase (SOD) (FRIEL et al. 2008; FRANÇA et al, 2011), fatores de crescimento (HAMOSH, 2001) e citocinas (DAHLGERN et al. 2001, KVERKA et al. 2007; GAROFALO, 2010) que parecem modular o desenvolvimento do sistema imunológico, a tolerância e as respostas inflamatórias do recém-nascido.

Muitos dos componentes de proteção do leite humano podem interagir sinergicamente entre si ou com outros fatores relacionados às respostas imunes sistêmicas e de mucosa (ISAACS, 2005) desempenhando efeitos protetores que parecem ser mantidos além do período de amamentação.

O colostro e leite humanos diferem da maioria das outras secreções, por apresentarem leucócitos viáveis. No colostro, o conteúdo celular é maior que no leite maduro e diminui rapidamente durante o primeiro mês de lactação (GOLDBLUM & GOLDMAN, 1994). A concentração de leucócitos no colostro varia de 1 a 3 x 10^9 células/ ml (TSUDA et al. 1984; GOLDMAN, 1993), e a freqüência relativa de cada tipo celular é a seguinte : 5 a 10 % de

linfócitos, 55 a 60 % de neutrófilos e 30 a 40 % de macrófagos (GOLDMAN, 1993). Os macrófagos presentes no colostro apresentam alta atividade fagocítica e são capazes de produzir radicais livres de oxigênio (TSUDA et al. 1984; RÜDIGER et al. 2001).

Estudos vêm demonstrando a presença de citocinas como IL2, IL3, IL4, IL-6, IL10, IFN-γ, TGF-β e TNF-α no leite humano que não somente influenciam o sistema imunológico do neonato, mas também são importantes para seu desenvolvimento adequado (DAHLGERN et al. 2001; GAROFALO, 2010).

Além do papel protetor anti-infeccioso do leite materno amplamente difundido na literatura cientifica, estudos experimentais e epidemiológicos têm sugerido que o aleitamento materno confere proteção para a obesidade num momento posterior da vida, desempenhando um importante papel no processo de "programação metabólica" no início da vida. Entre os possíveis mecanismos relacionados com a proteção da amamentação contra o rápido ganho de peso no período pós-natal e consequentemente para a obesidade numa fase posterior da vida, encontram-se um melhor desenvolvimento da auto-regulação de ingestão de alimentos das crianças amamentadas e das substâncias bioativas do leite materno participando no processo de "programação metabólica", alterando, por exemplo, o número e/ou tamanho das células gordurosas ou induzindo o fenômeno de diferenciação metabólica (DEWEY, 2003).

Foram identificadas adipocinas no leite humano (SAVINO et al. 2010) associadas à regulação energética, ao do apetite, à resposta inflamatória e imunológica (MAFRA & FARAGE, 2006). Dentre as principais adipocinas encontradas no leite humano estão a leptina e a adiponectina que podem estar envolvidas na regulação do crescimento e desenvolvimento neonatal e infantil com efeitos em longo prazo no processo de programação do balanço energético (SAVINO et al. 2010).

A leptina também tem sido associada à regulação da função imunológica em vários níveis: estimulando a proliferação de monócitos e diferenciação de macrófagos, modulando a ativação de linfócitos natural killer, ou induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-6, ou IL-12 (MARTÍ, MARCOS, MARTÍNEZ, 2001; TILG& MOSCHEN, 2006). Por outro lado, a adiponectina, um hormônio de caráter anti-inflamatório, apresenta funções imunomodulatórias opostas às da leptina: inibe a atividade fagocítica e a produção de TNF-α por macrófagos, a diferenciação de monócitos em macrófagos (KOERNER, KRATZSCH & KIESS. 2005), além de estimular a liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (TILG& MOSCHEN, 2006).

A literatura relata que o leite de mães com excesso de peso apresenta concentrações mais elevadas de leptina (ILCOL, HIZLI e OZKAN, 2006; EILERS et al. 2011) e menores de adiponectina (MARTIN et al. 2006). É possível que essas alterações possam interferir nos componentes imunológicos presentes no leite destas nutrizes. Existem ainda hipóteses de que as alterações imunológicas induzidas pela obesidade na gestação podem ser transmitidas ao sistema imunitário fetal por herança epigenética aumentando o risco para o desenvolvimento de doenças atópicas no recém-nascido (HERSOUG & LINNEBERG, 2007).

Modelos com animais revelam que a obesidade e/ou a dieta hipercalórica durante a gestação têm efeitos potencialmente danosos no desenvolvimento neonatal (THORNTON et al. 2011). Estudos clínicos disponíveis sobre o assunto indicam que a obesidade materna está associada com respostas inflamatórias pela placenta com aumento das citocinas IL-1, TNF-α e IL-6 (CHALLIER et al. 2008; ROBERTS et al 2011) e aumento dos níveis de TNF-α e PCR no líquido amniótico, indicando uma exposição do fetal a altas quantidades de citocinas pró-inflamatórias e mediadores (BUGATTO et al. 2010).

Evidências científicas sugerem ainda que os processos inflamatórios associados a elevados índices de massa corporal (IMC) maternos podem influenciar o crescimento fetal pela alteração das funções da placenta (AYE et al. 2014). Entretanto, não foram encontrados na literatura dados sobre o perfil de citocinas do sangue e colostro de nutrizes com excesso de peso. Visto que ocorre uma intensa inter-relação entre mãe e filho, tanto no ambiente intrauterino quanto durante o aleitamento, pode se supor que a modulação do sistema imunológico da criança possa ser influenciada pelo padrão imunológico materno.

Pelo exposto, há necessidade de entendimento do conteúdo de citocinas e outros mediadores presentes no sangue materno e no colostro de mães com excesso de peso. Estudos capazes de verificar a influência de alterações metabólicas sobre as interações de citocinas e composição bioquímica e hormonal do colostro humano podem ser importantes, à medida que, contribuem para o conhecimento dos processos que possam melhorar os resultados pré e pós natal de mães com excesso de peso, bem como refletir em melhor qualidade de vida, tanto para as mães com sobrepeso e obesidade como para seus filhos.

2. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a associação entre estado nutricional materno com perfis de citocinas TH1, TH2, TH3 e TH17, anticorpos e proteínas do complemento, parâmetros bioquímicos e hormonais no sangue e no colostro de mães com excesso de massa corporal.

3.2. Específicos

- ✓ Analisar a concentração de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-17A e TGF-β no sangue materno e colostro de mães com exceso de massa corporal;
- ✓ Analisar a concentração de anticorpos IgA, IgM e IgG, de proteínas o complemento C3 e C4 e PCR em sangue e no colostro de mães com excesso de massa corporal;
- ✓ Analisar os níveis de leptina e adiponectina no sangue e colostro de mães com excesso de massa corporal;
- ✓ Comparar o conteúdo calórico e de gordura do colostro de mães com peso normal com o de mães com excesso de massa corporal.
- ✓ Analisar a concentração de colesterol total, triglicérides, glicose e proteínas totais presentes no sangue e colostro de mães com excesso massa corporal.

3. MÉTODO

3.1. DESENHO E LOCAL DO ESTUDO

Foi realizada uma coorte histórica, considerando-se os estado nutricional pré-gestacional (normal e excesso de peso) e as avaliações dos perfis Th1, Th2, Th3 e Th17 e a verificação dos parâmetros bioquímicos e hormonais no Hospital da Mulher Maria José dos Santos Stein, conveniado à Faculdade de Medicina do ABC, Santo André - SP.

3.2. TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho amostral proposto neste estudo baseou-se em amostra de conveniência (demanda do serviço X tempo de conclusão doutorado) e no cálculo do tamanho amostral (ARMITAGE & BERRY, 1987). Assim, considerou-se a diferença das médias entre as medidas de avaliações e os grupos controle e excesso de peso com a menor distância entre os resultados e o maior tamanho da amostra. Assumindo uma perda de seguimento da ordem de 10% e corrigindo para os efeitos dos erros α (5%) e β (20%) atribuídos ao estudo, estimou-se a necessidade de avaliar, no mínimo, 30 gestantes por grupo. O tamanho amostral estimado foi constituído de 60 gestantes, assim distribuídas: 30 no grupo controle; 30 no grupo excesso de peso. Por força das circunstâncias não foi possível a obtenção de todas as mães propostas no cálculo amostral e o número final obtido está detalhado nos artigos apresentados em “Resultados e Discussão”.

3.3. VARIÁVEIS

3.3.1. Variáveis de controle

a) presença (sim) ou ausência (não) de tabagismo, diabetes mellitus (prévia ou gestacional), anemia, consumo de álcool e hipertensão arterial;

b) idade gestacional, em semanas completas, na entrada do grupo de atendimento pré-natal da unidade de saúde;

c) manutenção (sim) ou (não) da classificação do IMC pré-gestacional (peso normal e excesso de peso) na última consulta de pré-natal.

3.3.2. Variáveis Independentes

a) Eutróficas (controle) – IMC pré-gestacional entre 18,5 a 24,9 kg/m^2
b) Sobrepeso – IMC pré-gestacional entre 25.0 a 29.9 kg/m^2
c) Obesidade – IMC pré-gestacional ≥30 kg/m^2

3.3.3. Variáveis Dependentes

a) determinação da concentração de anticorpos (IgA, IgM e IgG), proteínas do complemento (C3, C4), PCR e dos níveis citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10,TNF-α, IFN-γ, IL-17A e TGF-β) no soro e no sobrenadante do colostro;

b) determinação dos parâmetros bioquímicos (glicose, proteínas totais, colesterol, triglicérides) e hormonais (leptina e adiponectina) do soro e do colostro.

3.4. SELEÇÃO DOS SUJEITOS

3.4.1. Identificação dos sujeitos

As gestantes com potencial para a inclusão no estudo foram identificadas nos serviços do Hospital da Mulher Maria José dos Santos Stein, FMABC, Santo André - SP. Para essa finalidade foi desenvolvido protocolo específico, considerando os critérios de inclusão, exclusão e descontinuidade pré-definidos. Diante de um caso elegível, o pesquisador principal explicava os objetivos e as técnicas de coleta de sangue e de obtenção do colostro e, se de acordo com a participação, a gestante assinava o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os critérios de inclusão, exclusão e descontinuidade estão descritos a seguir.

3.4.2. Critérios de inclusão

a) Ser classificada nos grupos definidos no delineamento do estudo;
b) Peso pré-gestacional conhecido ou medido até o final da 13ª semana gestacional;
c) Idade gestacional no parto entre 37 a $41^{6/7}$ semanas, reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis;
d) Realizar assistência pré-natal no Serviço e não apresentar restrição alimentar;
e) Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.4.3. Critérios de exclusão

a) Gravidez gemelar;
b) Malformações fetais e parto antes da 37ª semana de gestação.

3.4.4. Critérios de descontinuidade

a) Abandono do pré-natal no Serviço;
b) Malformação fetal diagnosticada no momento do parto;
c) Perda de dados relativos ao parto e ao período neonatal.

3.5. TÉCNICAS DE COLETA

As amostras de sangue materno foram coletadas entre 37 a 42 semanas de gestação, em tubos de coleta à vácuo. A coleta de colostro foi efetuada por ordenha manual, com técnica adequada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009) sempre no período da manhã e no intervalo entre duas mamadas, no período correspondente às primeiras 48 a 72 horas após o parto. A quantidade máxima de sangue e colostro coletada foi de 10 ml. Essas técnicas seguiram as orientações protocolares das boas práticas clínicas.

3.5.1. Estado Nutricional Pré-Gestacional

Para determinar o estado nutricional pré-gestacional, foi utilizado como indicador o índice de massa corporal pré-gestacional. A definição do IMC pré-gestacional foi obtida por meio da fórmula: índice de massa corpórea=peso pré-gestacional (kg)/ altura (m^2). Foi utilizado o peso pré-gestacional referido pela gestante durante a primeira consulta de pré-natal, ou, na ausência dessa informação, foi utilizado o peso obtido em consulta realizada até a 13ª semana de gestação – o peso aferido neste período tem sido utilizado como proxy do peso pré-gestacional, possibilitando uma estimação do estado nutricional pré-gestacional (WHO, 1995). Apesar de o valor do peso pré-gestacional referido estar sujeito a erros de memória ou de super ou subestimação, pesquisadores como Steven-Simon et al. (1992) verificaram uma alta correlação entre o referido e o aferido na consulta. A classificação do IMC foi definida de acordo com o *Institute of Medicine* dos Estados Unidos (IOM, 2009). Os critérios empregados para cada categoria foram: baixo peso (IMC<18,5 kg/m^2); eutrófica (IMC entre 18,5 a 24,9 kg/m^2); sobrepeso (IMC entre 25.0 a 29.9 kg/m^2) e obesidade (IMC≥30 kg/m^2). Para efeito de resultados de análises estatísticas, as gestantes com sobrepeso e obesas foram alocadas no grupo com "excesso de peso" (IMC ≥ 25,0 kg/m^2), adotando-se os níveis de corte propostos pelo *Institute of Medicine* (2009).

Peso e altura foram mensurados em duplicata de acordo com protocolo padronizado (FRISANCHO, 1990) em balança digital, marca Tanita®, com carga máxima de 150 kg e precisão de 100g, sendo utilizado o valor médio. A altura foi aferida na primeira consulta de pré-natal com estadiômetro da marca Seca® com precisão de 1mm e capacidade de 205 cm; foi solicitado à paciente que ela retirasse o sapato e ficasse com o mínimo de roupas, se posicionasse de costas para o estadiômetro e se mantivesse ereta com os pés unidos, quando possível encostasse o calcanhar, a panturrilha, as nádegas, os ombros e a parte posterior da cabeça no estadiômetro.

3.5.2. Idade gestacional

A idade gestacional foi calculada utilizando, primeiramente, o resultado da ultra-sonografia com data inferior a 20 semanas. Para gestantes que tiveram ultrassonografia maior que 20 semanas, a idade gestacional foi calculada fazendo-se a média entre a idade informada pela ultra-sonografia e aquela calculada pela data da última menstruação.

3.6. MÉTODOS DE PROCESSAMENTO

3.6.1. Obtenção de sobrenadante de colostro humano

As amostras de colostro foram centrifugadas durante 10 minutos sob refrigeração a 4ºC para obtenção do sobrenadante de colostro, armazenadas em freezer – 80ºC para posterior avaliações bioquímicas, imunológicas e hormonais.

3.6.2. Obtenção do Soro Sanguíneo

As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 160G a temperatura ambiente. O soro foi separado e armazenado a -80°C para análises posteriores. O soro foi separado e armazenado a -80ºC para posterior dosagens bioquímicas, imunológicas e hormonais.

3.7. TÉCNICAS DE ANÁLISE DAS AMOSTRAS

3.7.1. Determinação dos níveis de glicose

Os níveis de glicose foram quantificados pelo método colorimétrico enzimático. Para isso, utilizou-se 20µL de sobrenadante de colostro, soro e o padrão (concentração 100 mg / dL – Doles, Brasil) e foram colocados em solução tampão fosfato 2,0 mL a 05 M, pH7.45, (contendo 0.03mm aminoantipiridina, 15 mM de hidroxibenzoato de sódio, 12U/L glicose e 0,8 U/L oxidase peroxidase). As suspensões foram misturadas e incubadas por 5 min a 37oC. As reações foram lidas em espectrofotômetro na faixa de DDO a 510 nm (MORCELI et al. 2011).

3.7.2. Determinação da concentração de proteínas totais

As proteínas totais foram mensuradas pelo método colorimétrico. Foram pipetados 20 µl de amostras de colostro, soro e o padrão (concentração de 4g/dL – Labtest, Brasil) e colocados em 1,0 mL de reagente Bioret (íons de cobre em meio alcalino). As suspensões foram misturadas e incubadas por 10 min a 37ºC. A seguir as reações foram lidas em espectrofotômetro na faixa de DDO a 545 nm (MORCELI et al. 2011).

3.7.3. Determinação dos níveis de colesterol

As concentrações de colesterol foi determinada pelo método colorimétrico enzimático. Amostras de colostro/soro 10 μL e 200 mg/dL de padrão (BioTécnica®, Brasil) foram colocados em 1 mL de buffer solução tampão (Tampão Pipes 100 mmol/L pH 7,0; Colato de sódio 8 mmol/L; colesterol esterase (CHE) >750 U/L; Colesterol oxidase>200U/L; peroxidase>2000 U/L; 4-aminoantipirina 0,6 mmol; fenol 20 mmol/L; azida sódica 0,05% p/v). As suspensões foram misturadas e incubadas por 10 minutos a 37°C. As leituras foram realizadas em espectofotômetro a 505 nm.

3.7.4. Determinação da concentração de triglicérides

As concentrações de triglicérides por método colorimétrico enzimático. Amostras de 10 μL de colostro/soro e 200 mg/dL de padrão (BioTécnica®, Brasil), foram colocados em 1 mL de buffer solução tampão (Tampão Pipes 50 mmol/L pH 7,2, Glicerolquinase > 1000 U/L; Peroxidase > 1000U/L; Lipoproteína lípase > 2000 U/L; Glicerol-3-fosfato oxidase > 5000 U/L; 4-cloro fenol 2,7 mmol/L; 4 - aminoantipirina 0,3 mmol/L; ATP - adenosina trifosfato 2,0 mmol/L; azida sódica 0,01% p/v). As suspensões foram misturadas e incubadas por 10 minutos a 37 °C. As leituras foram realizadas em espectofotômetro a 505 nm.

3.7.5. Determinação de Proteína C Reativa

As concentrações de PCR foram mensuradas utilizando o Kit PCR Turbilátex (BioTécnica®, Brazil) pelo método de turbidimetria. Amostras de 5 μL de colostro/soro e padrão foram colocados em 1000 μL de solução (Tampão Fosfato 40 mmol/L pH 7,2, azida sódica 0,95 g/L, suspensão de partículas de látex sensibilizadas con IgG de cabra anti-Proteína C-Reativa Humana). As suspensões foram misturadas e colocas 37 °C e as reações foram imediatamente mensuradas e a 120 s. As leituras foram realizadas em 540 nm.

3.7.6. Análises de leptina e adiponectina

A quantificação das concentrações de adiponectina e leptina foram determinadas utilizando-se kits específicos para ensaios imunoenzimáticos ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Biovendor-Laboratory Medicine, República Checa) de acordo com instruções do fabricante e conforme descrito por Bronsky et al. 2006.

3.7.7. Determinação das concentrações de IgA, IgM e IgG

As concentrações de IgA, IgG e IgM no soro e no colostro foram determinadas por imunodifusão radial quantitativa (RID) de acordo com a técnica de Mancini et al. 1965. Tubos contendo 10 ml de agarose 1% foram aquecidos até a fusão em banho-maria, e a seguir

transferidos para banho a 56°C para estabilizar a temperatura. Os anticorpos foram adicionados à agarose e misturados por inversão do tubo. As misturas foram colocadas entre duas placas de vidro, separadas por um espaçador. Após a solidificação, as placas foram perfuradas e as amostras aplicadas.

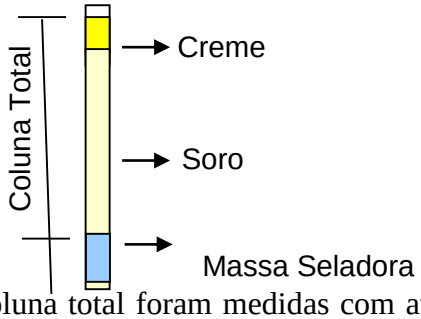
Para a determinação de IgA, IgG e IgM do colostro e do soro utilizou-se a curva padrão Kallestad.

3.7.8. Determinação da concentração de C3 e C4

As concentrações de C3 e C4 presentes no colostro e sangue foram determinadas pelo método de turbidimetria. Amostras de colostro foram diluídas 1:12 (v / v) com solução salina (9 g / l), os níveis de C3 e C4 foram determinados utilizando-se soros anti-C3 e anti-C4 (Bioclin®, Brazil). A curva padrão de calibração foi obtida pelo Multical (Bioclin®, Brazil). As suspensões foram misturadas e incubadas a 37ºC por 15 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 340 nm (MORCELLI et al. 2011).

3.7.9. Análise do Crematócrito

Para análise do crematócrito as amostras de colostro humano foram aquecidos à 40ºC por 15 minutos em banho-maria e posteriormente agitados em vortex. Foram preenchidos ¾ aproximadamente de dois microcapilares para cada amostra, vedados com massa seladora e posteriormente centrifugados por 15 minutos a 1000 rpm sem interrupção. A centrifugação permitiu a separação da amostra em creme e soro.



A coluna de creme e a coluna total foram medidas com auxílio de uma régua e o teor de gordura e Kcal foram calculadas utilizando-se as seguintes relações:

Teor de Gordura = % creme (mm) – 0,59/1.46,

onde a % creme = coluna de creme (mm) x 100/coluna total (mm);

Kcal/L = (66,8% x % creme) + 290.

3.7.10. Quantificação das Citocinas

As concentrações de citocinas presentes nas amostras de plasma e sobrenadante de colostro foram avaliadas pelo Kit “Cytometric Bead Array” (CBA, BD Bioscience, USA – FAGUNDES

et al. 2016). As análises destas citocinas foram realizadas através de citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). Os dados serão analisados através do software FCAP *Array*.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação das concentrações dos parâmetros bioquímicos, imunológicos e hormonais no sangue e colostro, utilizou-se Análise de Variância (ANOVA) para amostras independentes e dependentes quando necessário, considerando-se os grupos estudados e os líquidos biológicos (colostro ou soro), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Para o estudo das correlações, entre citocinas e hormônios do sangue materno e colostro, utilizou-se o teste de correlação de Pearson. Para todos os testes, considerou-se $p < 0,05$, como limite de significância estatística.

3.9. ASPECTOS ÉTICOS

As considerações éticas foram baseadas no uso do material biológico para fins científicos, com sigilo da identidade da nutriz, livre de coação ou conflito de interesses da instituição ou de pessoas envolvidas no projeto. As coletas respeitaram os protocolos técnicos dos serviços envolvidos. As nutrizes foram previamente informadas e o material somente foi coletado ou utilizado sob expresso consentimento em formulário específico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, Anexo 2), conforme Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, submetido via Plataforma Brasil, sob protocolo de número CAAE: 05269612.7.0000.5421 (Anexo 3).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Artigo 1: Fujimori M, França EL, Fiorin V, Morais TC, Honorio-França AC, Abreu LC. Changes in the biochemical and immunological components of serum and colostrum of overweight and obese mothers. BMC Pregnancy Childbirth.2015:15:166.

4.2. Artigo 2: Fujimori M, França EL, Fiorin V, Morais TC, Abreu LC, Honorio-França AC. Cytokine and adipokine association in blood and colostrum of obese mothers. Clinical Science (*submitted*).

4.3. Artigo 3: Fujimori M, França EL, Fiorin V, Morais TC, Honorio-França AC, Abreu LC. Perfil de citocinas no sangue e colostro de mães obesas.

Fujimori *et al. BMC Pregnancy and Childbirth* (2015) 15:166
DOI 10.1186/s12884-015-0574-4

BMC Pregnancy & Childbirth

RESEARCH ARTICLE Open Access

Changes in the biochemical and immunological components of serum and colostrum of overweight and obese mothers

Mahmi Fujimori[1], Eduardo L. França[2], Vanessa Fiorin[3], Tassiane C. Morais[1,2], Adenilda C. Honorio-França[2*] and Luiz C. de Abreu[1]

Abstract

Background: Obesity in pregnancy is associated with systemic inflammation, immunological changes and adverse maternal-fetal outcomes. Information on the association between maternal obesity and breast milk composition is scarce. This study describes changes and relationships between biochemical and immunological parameters of colostrum and serum of overweight and obese women.

Methods: Colostrum and blood samples were collected from 25 normal weight, 24 overweight and 19 obese women for determination of glucose, total protein, triglycerides, cholesterol, immunoglobulins, complement proteins (C3 and C4), fat and calorie content and C-reactive protein (CRP).

Results: Glucose was higher in colostrum of obese women ($p = .002$). In normal weight and obese women, total protein content was higher in colostrum than in serum ($p = .001$). Serum triglycerides ($p = .008$) and cholesterol ($p = .010$) concentrations were significantly higher in overweight and obese women than in their normal weight counterparts, but in colostrum their concentrations were similar across the three groups. Secretory IgA (sIgA) in colostrum and IgA in serum concentrations were significantly higher ($p = .001$) in overweight and obese mothers, whereas IgG and IgM concentrations did not vary among the groups ($p = .825$). Serum C3 ($p = .001$) and C4 ($p = .040$) concentrations were higher in obese women. No differences in colostrum complement proteins were detected among the groups. Calorie content ($p = .003$) and fat ($p = .005$) concentrations in colostrum and serum CRP ($p = .002$) were higher in obese women.

Conclusions: The results corroborate the hypothesis that colostrum of overweight and obese women undergoes biochemical and immunological changes that affect its composition, namely increasing glucose concentrations, calorie content, fat and sIgA concentrations.

Keywords: Colostrum, Obesity, Antibody, Complement protein, Fat

Background

Breastfeeding promotion is one of the main strategies for reducing child mortality worldwide [1]. Breast milk contains a balanced content of macro and micronutrients that are essential for infant growth and development, and several immunological components that provide protection to newborns [2–4]. Antibodies, complement proteins, hormones, immunocompetent cells [3, 5–9] cytokines [10–12] and other milk components appear to play a role in the modulation and development of the immune system and inflammatory responses of newborns.

In recent decades, due to changes in lifestyle the incidence of overweight and obesity are increasing among breastfeeding mothers. Obesity and overweight are common metabolic disorders and their growing frequencies worldwide are a major public health concern [13]. Obesity has been shown to increase the expression and secretion of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis alpha factor (TNF-α) and interleukin 6 (IL-6) and raises plasma C-reactive protein (CRP) concentrations, leading to the chronic low-grade inflammation that characterizes the disease [14] and appears to play a central role in the

* Correspondence: adenildachf@gmail.com
[2]Institute of Biological and Health Science, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2015 Fujimori et al. Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

development of a variety of metabolic disorders and hormonal dysfunctions [15–17]. The fact that obesity affects components of the cellular and humoral immune response may result in a state of immunodeficiency [18]. Epidemiological and clinical findings corroborate this, showing a higher incidence and severity of infectious diseases in the obese [19].

The risks associated with obesity become even more relevant in women of reproductive age [20, 21] because pregnancy is another condition that affects immune response. Moreover, excess weight during pregnancy contributes to increasing perinatal morbidity and mortality, posing risks of long-term consequences for mother and child [22].

Other studies show that chronic inflammation caused by obesity may be related to an exaggerated inflammatory response in the placenta of pregnant women, with an accumulation of macrophages and pro-inflammatory mediators [23]. However, it is unclear whether the effects of obesity in pregnancy are accompanied by changes in colostrum composition in the post partum period.

Changes in maternal metabolism and immunological response may affect the developing immune system of newborns because of the intense interplay between mother and child during pregnancy and breastfeeding. To clarify this issue, the present study investigated the association between maternal weight and immunological, biochemical and nutritional parameters of colostrum.

Methods

This cross-sectional study evaluated 68 mothers (18–36 years of age), divided into three groups according to their prepregnancy body mass index (BMI): normal weight ($n = 25$); overweight ($n = 24$) and obese ($n = 19$). Group definition was based on the World Health Organization [24] criterion, considering normal weight for BMI 18.5–24.9, overweight for BMI 25–29.9, and obesity for BMI of 30 or more. Participants were recruited from the Pregnancy and Obstetric Service of the Maria José dos Santos Stein Hospital, managed by the School of Medicine of ABC, Santo André, SP, Brazil. The volunteers signed an informed consent form before entering the study, which was approved by the local ethics committee of the Faculty of Public Health of the University of São Paulo (Protocol Number CAAE: 05269612.7.0000.5421).

A number of variables were controlled in both groups. These patients were characterized by the age, gestational age at delivery, smoking status, hypertension, body mass indexes before pregnancy, diabetes prior to pregnancy and gestational diabetes.

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria were as follows: (a) women with breasts without nipple fissures or mastitis; (b) who were exclusively breastfeeding their babies; and (c) signed a Consent Form. Women with multiple pregnancies, fetal malformations and deliveries before the 37th week of gestation were excluded.

Colostrum sampling

About 48–72 h post-partum, 10 mL colostrum was collected from the volunteers. Supernatant was obtained by colostrum centrifugation at 160 × g for 10 min at 4 °C. The upper fat layer was discarded, and the aqueous supernatant was stored at −80 °C for later biochemical and immunological analyses.

Blood sampling

Samples of 10 mL of blood were collected prior to the beginning of labor from each mother in tubes without anticoagulant and the blood samples were centrifuged at 160 × g for 15 min, until serum separation. Serum samples were stored individually at −80 °C for further glucose, enzyme and protein determination.

Glucose determination

Glucose concentrations of colostrum supernatant and maternal serum were determined by the enzymatic system [25]. Samples of 20 μL colostrum, serum and standard of 100 mg/dL (BioTécnica®, Ref 10.008.00, Brazil) were placed in 2.0 mL phosphate buffer solution (0.05 M, pH7.45, with aminoantipyrine 0.03 mM, 15 mM sodium p-hydroxybenzoate, 12 kU/L glucose oxidase and 0.8 kU/L peroxidase). The suspensions were mixed and incubated for 5 min at 37 °C. The reactions were read on a spectrophotometer at 510 nm.

Total protein determination

Total protein of colostrum supernatant and maternal serum was determined by the Biuret colorimetric method [25]. Samples of 20 μL of colostrum, serum and standard of 4 g/dL (BioTécnica®, Ref 10.009.00, Brazil) were placed in 1.0 mL Biuret reagent (ions of copper in alkaline medium). The suspensions were mixed and incubated for 10 min at 37 °C. The reactions were read on a spectrophotometer at 545 nm.

Cholesterol determination

Cholesterol concentrations of colostrum supernatant and maternal serum were determined by enzymatic colorimetric method [26]. Samples of 10 μL colostrum/serum and standard of 200 mg/dL BioTécnica®, Ref 10.004.00, Brazil), were placed in 1 mL of buffer solution (100 mmol/L, pH 7.0; Sodium cholate 8 mmol/L; cholesterol esterase 750 U/L; Cholesterol oxidase/200 U/L; Peroxidase > 2000 U/L; 4-aminoantipyrine 0.6 mmol; phenol 20 mmol /L; Sodium azide 0.05 % v/v). The suspensions were mixed and incubated for 10 min at 37 °C. The reactions were read on a spectrophotometer at 505 nm.

Triglycerides determination

Triglycerides concentrations in colostrum supernatant and maternal serum were determined by the enzymatic colorimetric method [26]. Samples of 10 μL of colostrum/serum, standard of 200 mg/dL (BioTécnica®, Ref 10.010.00, Brazil), were placed in 1.0 mL of buffer solution (50 mmol/L pH 7.2 Glicerol kinase/1000 U/L; Peroxidase/1000 U/L; Lipoprotein lipase/2000 U/Ll; Glycerol-3-phosphate oxidase/5000 U/L; 4-chlorophenol 2.7 mmol/L; 4-aminoantipyrine 0.3 mmol/L; ATP - adenosine triphosphate 2.0 mmol/L; Sodium azide 0.01 % v/v). The suspensions were mixed and incubated for 10 min at 37 °C. The reactions were read on a spectrophotometer at 505 nm.

Immunoglobulin, C3 and C4 complement determination

The immunoglobulin (Ig), complement protein (C) 3 and 4 concentrations in colostrum and serum were determined by turbidimetric method [11].

For sIgA in colostrum and IgA in serum determinations, the samples were diluted at 1:5 (v/v) with saline solution (9 g/L), for IgM at 1:11 (v/v) and for IgG at 1:15 (v/v), and the antibody concentrations were determined using IgA (Bioclin®, Brazil, Ref K061), IgM (Bioclin®, Brazil, Ref K063) and IgG antiserum (Bioclin®, Brazil, Ref K062) diluted at 1:12 (v/v). A calibration curve obtained by the Multical (Bioclin®, Brazil, Ref K064) calibrator was used to determine the standard curve for each immunoglobulin. Samples of colostrum, serum, standards, positive and negative control sera were placed in 500 μL of buffer solution (sodium chloride 0.15 moL/L, Tris 50 mmol/L, 6.0000 PEG 50 g/L, sodium azide 15.38 nmol/L). The suspensions were mixed and incubated at 37 °C for 10 min. The reactions were read on a spectrophotometer at 340 nm.

For C3 and C4 concentration determination the samples (colostrum and serum) were diluted at 1:12 (v/v) with saline solution (9 g/L), and the C3 and C4 concentrations in sample supernatants were determined using C3 and C4 antiserum (Bioclin®, Brazil) diluted at 1:12 (v/v). A calibration curve obtained by the Multical (Bioclin®, Brazil), Ref K064) calibrator was used to determine the standard curve. Ten microliter samples of colostrum, serum, standards, positive and negative control sera were placed in 500 μL of buffer solution (sodium chloride 0:15 mol/L, Tris 50 mmol/L, 6.0000 PEG 50 g/L, sodium azide 15:38 nmol/L). The suspensions were mixed and incubated at 37 °C for 15 min. The reactions were read on a spectrophotometer at 340 nm.

Creamatocrit analysis

Colostrum samples were water-bath-heated at 40 °C for 15 min and subjected to vortex mixing. Capillary tubes (2 μL) were filled to approximately three quarters with the samples, sealed with sealing wax and centrifuged for 15 min. Centrifugation separated the samples into cream and serum [2]. The cream column and the total column were measured, and fat and Kcal content calculated using the following formulae:

$$\begin{aligned}\text{Fat content} &= \%\ \text{cream} - 0.59/1.46,\ \text{where the}\ \%\ \text{cream}\\ &= \text{cream column (mm)}\\ &\quad \times\ 100\ /\text{total column (mm)};\end{aligned}$$

$$\text{Kcal/L} = (68.8 \times \%\ \text{cream}) + 290$$

C-Reactive Protein assay

C-Reactive Protein (CRP) concentrations in human colostrum and serum were measured using the PCR Turbilatex Kit (BioTécnica®, Brazil, Catalog 20.015.00) by turbidimetric method [26]. Samples of 5 μL of colostrum, serum and standard were placed in 1000 μL of solution (phosphate Buffer 40 mmol, sodium azide 0.95 g/L, suspension of latex particles sensitized with goat IgG anti Human C-reactive protein). The suspensions were mixed and placed at 37 °C and the reactions were measured immediately and at 120 s. The reactions were read on a spectrophotometer at 540 nm.

Statistical analysis

Two-way Analysis of variance (ANOVA) with calculation of F statistic and Tukey's multiple comparison test were used to evaluate glucose, total protein, cholesterol, triglycerides, antibody concentration, complement protein, CRP, calories and fat considering the BMI status as one factor and the biological materials (colostrum or serum) as the other. Statistical significance was considered when the p-value was less than .05.

Results

Clinical characteristics from all groups are shown in Table 1. Maternal age, gestational age at birth and height before pregnancy were similar among groups. The cesarean birth percentage was higher in overweight and obese groups. Neonates from the groups studied (normal weight, overweight and obese) exhibited similar somatometry at birth (Table 1).

We evaluated biochemical (Table 2) and immunological (Table 3) parameters in the blood and colostrum of mothers with different body mass index (BMI).

Colostrum glucose concentrations were higher in obese ($p = .002$) than in overweight and normal weight groups. Serum glucose concentrations were higher ($p = .001$) than colostrum glucose concentrations in overweight mothers (Table 2). Total protein concentrations were similar ($p = .758$) across the groups. In normal weight and obese groups, total protein concentrations were higher in colostrum ($p = .001$) than in maternal serum (Table 2).

Table 1 Clinical characteristics of woman included in the study according to pregestacional BMI group (normal, overweight and obese)

Variables	Normal weight ($n = 25$)	Overweight ($n = 24$)	Obese ($n = 18$)
Mothers			
Age (year)	25.0 (18–37)	24.1 (18–37)	26.8 (21–38)
height before pregnancy (cm)	161.0 (150.0-171.0)	162.8 (150.0-172.0)	160.4 (144.0-189.0)
Weight before pregnancy (kg)	56.2 (43.0-68.5)	71.2 (56.5-82.0)	87.3 (66.0-110.0)
BMI before pregnancy (kg/m^2)	21.4 (18.4-24.4)	26.6 (25.2-28.6)	34.7 (30.1-47.9)
Cesarean (%)	6/25 (24.0 %)	11/24 (45.8 %)	10/18 (55.5 %)
Gestational age at delivery (week)	39.7 (37.0-41.3)	39.5 (37.6-41.0)	39.5 (37.0-40.7)
Primipara (%)	13/25 (52.0 %)	11/24 (45.8 %)	8/18 (44.4 %)
Diabetes	0/25 (0.0 %)	0/24 (0.0 %)	0/18 (0.0 %)
Gestational diabetes	0/25 (0.0 %)	0/24 (0.0 %)	2/18 (11.0 %)
Hypertension	1/25 (4.0 %)	1/24 (4.0 %)	2/18 (11.0 %)
Smoking status	4/25 (16.0 %)	2/24 (8.0 %)	2/18 (11.0 %)
Infants			
Infant gender (% female)	12/25 (48.8 %)	10/24 (41.6 %)	8/18 (44.4 %)
Weight (kg)	3.6 (2.40-4.20)	3.2 (2.54-3.91)	3.4 (2.54-4.34)
Height (cm)	48.1 (44.0-52.0)	48.2 (44.5-53.0)	49.2 (46–52)

Data for all mothers included are shown as median, minimum and maximum values or number and percentages (%)

Intergroup colostrum triglyceride concentrations were similar, but in serum they were significantly higher ($p = .008$) in the obese group. Irrespective of the BMI, triglyceride concentrations were higher ($p = .001$) in colostrum than in serum (Table 2). No statistical intergroup differences ($p > 0.05$) in cholesterol concentrations were detected in colostrum. However, obese women exhibited higher cholesterol concentrations in serum ($p = .010$) than normal weight individuals. In the obese group, cholesterol concentrations were higher in serum ($p = .001$) than in colostrum (Table 2).

As shown in Fig. 1 and Table 2, fat ($p = .005$) and calorie ($p = .003$) content of colostrum was higher in the obese group. Colostrum CRP concentrations were similar among

Table 2 Biochemical parameters in colostrum and serum from normal weight, overweight and obese mothers

Parameter		Normal weight	Overweight	Obese	Statistical
Glucose concentrations (mmol/L)	Colostrum	1.9 (0.7–2.9) [3]	2.6 (2.1–3.1) [1,3]	3.2 (2.0–4.5) [1,2,3]	F = 5.94; p = .002 (comparing the groups)
	Serum	4.3 (4.2–5.1)	4.4 (3.7–5.4)	4.3 (3.7–5.7)	F = 139.15; p = .001 (comparing the colostrum and serum)
Total Protein (g/L)	Colostrum	101.0 (91.0–115.0) [3]	89.0 (76.0–127.0)	86.0 (61.0–157.0) [3]	F = 0.25; p = .758 (comparing the groups)
	Serum	59.0 (57.0–67.0)	62.5 (58.0–83.0)	66.5 (54.0–76.0)	F = 47.53; p = .001 (comparing the colostrum and serum)
Triglyceride concentrations (mmol/L)	Colostrum	5.3 (2.5–6.6) [3]	5.1 (2.5–6.3) [3]	4.6 (2.6–8.0) [3]	F = 10.59; p = .008 (comparing the groups)
	Serum	1.6 (0.8–2.2)	1.9 (0.9–3.3)	2.9 (2.0–5.5) [1]	F = 57.47; p = .001 (comparing the colostrum and serum)
Cholesterol concentrations (mmol/L)	Colostrum	4.3 (2.1–6.2)	4.1 (2.7–5.9)	5.2 (2.9–8.2) [3]	F = 5.05; p = .010 (comparing the groups)
	Serum	5.1 (4.7–5.4)	5.4 (4.6–5.9)	6.0 (5.2–12.3) [1]	F = 11.08; p = .002 (comparing the colostrum and serum)
CRP concentrations (mg/L)	Colostrum	4.0 (0.0–8.0)	5.0 (0.0–11.0)	6.0 (0.0–12.0)	F = 12.30; p = .002 (comparing the groups)
	Serum	9.0 (5.0–28.0)	16.0 (0.0–26.0) [3]	85.0 (17.0–201.0) [1,2,3]	F = 20.71; p = .001 (comparing the colostrum and serum)
Fat (%)	Colostrum	3.3 (0.4–6.7)	3.6 (1.2–9.4)	5.6 (2.0–11.9) [1]	F = 7.27; p = .005 (comparing the groups)
Calories (Kcal)	Colostrum	537.9 (396.7–764.3)	543.6 (396.7–944.6)	688.2 (450.3–1111.6) [1]	F = 6.90; p = .003 (comparing the groups)

Data presented as media, minimum and maximum values

[1]Statistically significant differences in relation to the normal weight category, considering the same sample (colostrum or serum)

[2]Statistically significant differences in relation to the overweight category, considering the same sample (colostrum or serum)

[3]Statistically significant differences between colostrum and serum, considering the same group (normal weight, overweight and obese)

Table 3 Immunoglobulins and complement protein concentrations in colostrum and serum from normal weight, overweight and obese mothers

Parameter		Normal weight	Overweight	Obese	Statistical
IgA (g/L)	Colostrum	3.3 (2.3-5.5) [3]	3.8 (2.1-5.0)	5.1 (3.3-9.6) [1,2,3]	F = 12.44; p = .001 (comparing the groups)
	Serum	2.2 (1.6-3.1)	2.7 (2.2-3.5)	3.9 (2.1-4.7) [1]	F = 21.69; p = .002 (comparing the colostrum and serum)
IgM (g/L)	Colostrum	1.3 (0.85-2.2)	1.2 (0.8-2.1)	1.4 (1.0-3.4)	F = 0.19; p = .825 (comparing the groups)
	Serum	1.3 (1.1-1.8)	1.4 (0.8-2.4)	1.0 (0.8-2.0)	F = 1.84; p = .177 (comparing the colostrum and serum)
IgG (g/L)	Colostrum	0.4 (0.1-0.6) [3]	0.3 (0.2-0.5) [3]	0.4 (0.2-0.6) [3]	F = 0.05; p = .947 (comparing the groups)
	Serum	11.3 (9.2-14.2)	9.3 (8.5-16.7)	10.8 (7.6-18.4)	F = 495.8; p = .001 (comparing the colostrum and serum)
C3 (mg/dL)	Colostrum	91.7 (50.5-110.2) [3]	90.3 (44.1-97.9) [3]	95.7 (41.3-130.9) [3]	F = 14.98; p = .001 (comparing the groups)
	Serum	121.1 (109.5-139.3)	152.4 (90.6-250.0)	249.8 (119.1-312.9) [1,2]	F = 117.30; p = .001 (comparing the colostrum and serum)
C4 (mg/dL)	Colostrum	30.1 (15.6-34.8) [3]	24.2 (19.6-40.7) [3]	28.8 (17.7-40.2)	F = 5.91; p = .040 (comparing the groups)
	Serum	16.4 (9.9-25.6)	17.2 (7.1-25.8)	22.9 (13.3-37.1) [1,2]	F = 20.68; p = .001 (comparing the colostrum and serum)

Data presented as median, minimum and maximum values (within parentheses)
[1]Statistically significant differences in relation to the normal weight category, considering the same sample (colostrum or blood)
[2]Statistically significant differences in relation to the overweight category, considering the same sample (colostrum or blood)
[3]Statistically significant differences between colostrum and serum, considering the same group (normal weight, overweight and obese)

the groups, but in serum, they were significantly higher in the obese group (p = .002) than in the other groups. The highest concentrations of CRP (p = .001) were found in serum (Fig. 2 and Table 2).

The obese group showed significantly higher (p = .001) colostrum sIgA and serum IgA concentrations than normal weight women. IgM concentrations did not vary (p = .825) among the groups and between serum and colostrum samples (p = .177). IgG concentrations were significantly higher in serum (p = .001) than in colostrum (Table 3).

In serum, the concentrations of complement proteins C3 (p = .001) and C4 (p = .040) were significantly higher (p = .010) in the obese group than in normal weight and overweight groups, but in colostrum did not differ among the groups. Irrespective of weight status, C3 concentrations were significantly higher in serum (p = .001) than in colostrum, and in normal weight and overweight groups, C4 concentrations were significantly higher in serum (p = .001) than in colostrum samples (Table 3).

Discussion

The immune protection that breast milk provides and its nutritional importance has been widely described, and the composition of this secretion is known to undergo inter-and intra-individual variations [27]. These variations in breast milk can be affected by several factors, such as maternal diet, nutritional status, smoking, parity and period of the day [2, 28, 29].

Other studies report that maternal anemia, hypertension and diabetes can change nutritional and immunological features of breast milk [11, 30–32]. The present study shows that although serum cholesterol, triglycerides, CRP, C3 and C4 protein concentrations were higher in obese women, their concentrations in colostrum were similar across the groups. On the other hand, although glucose and IgA concentrations were similar among serum samples of the different groups, in colostrum samples sIgA concentrations were significantly higher in obese mothers. An increase in glucose concentrations in the breast milk of diabetic women are associated with

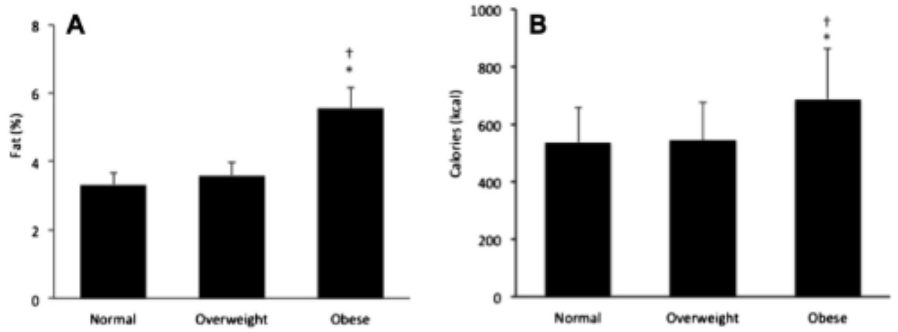


Fig. 1 Fat **a** and calories **b** in the colostrum of normal, overweight and obese mothers. Data presented as mean ± standard error (SE). F(A) = 7.27; p = .005; F(B) = 6.90; p = .003. *Statistically significant differences between normal and obese groups. †Statistically significant differences between overweight and obese groups

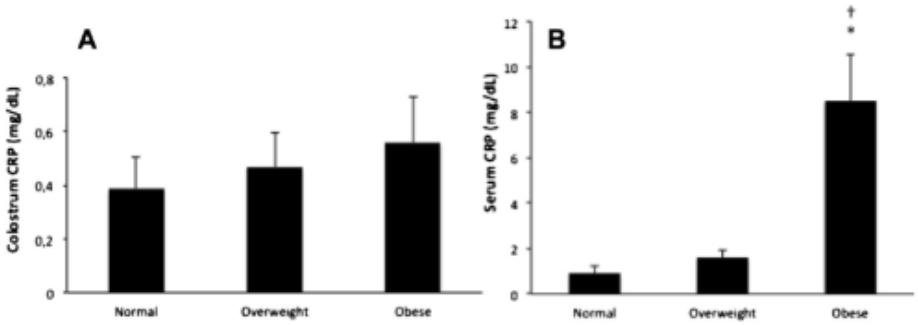


Fig. 2 CRP concentrations in the colostrum **a** and serum **b** of normal, overweight and obese mothers. Data presented as mean ± standard error (SE). F = 12.30; $p = .002$ comparing the groups; F = 20.71; $p = .001$ comparing the samples (colostrum and serum). * Statistically significant differences between normal and obese groups. †Statistically significant differences between overweight and obese groups

long-term consequences for their children, such as an increase in weight gain and metabolic changes [33, 34]. This suggests that infants born to and breastfed by women with high prepregnancy BMI may be heavier and predisposed to develop obesity and related disorders in adulthood. Other studies should investigate the effects of maternal weight on the glucose content of breast milk and its impact on infant weight gain and metabolism.

The association between maternal obesity and dyslipidemia has been extensively described [35–37], and it likely contributes to vascular diseases including preeclampsia and the development of macrosomia [38]. The present study also found increased of dyslipidemia markers in higher BMI groups in colostrum samples, given that in obese and overweight groups this secretion contained higher fat and calorie content compared to normal weight women. The effects of maternal BMI on the energy content of breast milk are controversial, with studies showing that fat content in the milk of obese women does not differ from that of other weight classes [39], whereas others report lower fat content in milk from overweight mothers [28].

The immaturity of the immune system of newborns makes it susceptible to infections by viruses and bacteria. Accordingly, the transfer of antibodies *via* placenta during uterine life and then *via* colostrum and breast milk after birth is important in reducing this deficiency [30]. In the present study, overweight and obese mothers exhibited higher IgA concentrations in serum and sIgA concentrations in colostrum than normal weight women. Earlier studies report that obesity increases serum IgA concentrations in both sexes [40]. The present study is the first to evaluate the concentrations of antibodies and complement proteins in colostrum of overweight pregnant women. The increase in sIgA concentrations in colostrum might be associated with conditions determined by the metabolic syndrome, including hyperglycemia, hypertriglyceridemia and abdominal obesity. The mechanisms by which obesity increases sIgA concentrations are not known, but they are possibly associated with chronic low-grade inflammation, characterized by elevated concentrations of serum pro-inflammatory marker IL-6 [40]. IL-6 is one of the main cytokines in human milk, and its content has been shown to correlate with sIgA concentrations in colostrum in other studies [41, 42].

Unlike IgG, which is transferred transplacentally, the action of immunoprotective components of colostrum and milk is usually local, in the newborn's intestinal mucosa [3]. sIgA is able to inhibit bacterial adhesion and neutralize virus infection in the intestinal mucosa, preventing tissue damage and loss of energy [43] through a non-inflammatory process called immune exclusion [44]. The IgG antibodies activate the complement system and granulocytes and induce cytokine production, which results in inflammation. sIgA can also act as opsonin, signaling the presence of antigens to phagocytes by binding to the surface of bacteria and facilitating aggregation. The opsonizing activity of sIgA is of great biological significance, and given that colostrum is the secretion containing the highest concentration of this antibody class, it provides a complete micro-environment where components found in both its soluble portion and cells act together [3, 44].

The increased serum C3 concentrations in overweight and obese women and serum C4 in the obese group was not accompanied by an increase in these concentrations in colostrum. It was previously reported that obese individuals exhibit higher concentrations of circulating C3 [45, 46] and C4 [47]. The complement system consists of proteins that interact to provide many of the effector functions of humoral immunity and inflammation [45]. C3 and C4, the central components of the complement pathway of the immune system, are synthesized by stimulation of pro-inflammatory cytokines [46]. The C3 and C4 proteins are mainly produced in the liver, but they can also be synthesized and expressed in other tissues such as the adipose [47]. It has been suggested that diagnosis of chronic low-grade inflammation, which characterizes obesity, is

responsible for activation of the complement system, which, in turn, would cause the associated metabolic complications [48].

Obese mothers exhibited higher concentrations of serum CRP, but not in colostrum. CRP secretion by the liver is stimulated by several inflammatory cytokines, which are released in response to trauma, infection and inflammation, and this protein rapidly reduces the resolution of these conditions [49]. Another study found an association between serum CRP concentrations and prepregnancy BMI [50]. High CRP concentrations in the amniotic fluid of obese mothers expose the fetus to high amounts of inflammatory mediators, which may contribute to fetal programming, account for various complications during pregnancy and impact health condition in adulthood [51].

It should be considered that these data were evaluated in one period of collection and only one milk maturation stage that may be considered a limitation of this study. It is necessary to continue investigations focusing on other factors that may be involved during breastfeeding of the mothers with BMI alterations.

Conclusions

The data obtained in the present study support the hypothesis that metabolic changes promoted by obesity can change the biochemical and immunological parameters of breast milk. Nevertheless, we did not observe any changes that could cast doubt on the protection that breastfeeding provides to newborns or that could reflect the inflammatory state observed in maternal serum, because the only immunological component that increased in serum the obese women was IgA, which is known to be a non-inflammatory antibody. However, the increased calorie and fat content and glucose concentrations detected in colostrum from obese women deserve further attention.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MF carried out the assay, participated in the sequence alignment, and drafted the manuscript. ELF participated in the design of the study and coordination and helped to draft the manuscript. VF participated in the collect of samples, carried out the assays. TCM participated in the collect of samples, carried out the assays and help to draft the manuscript. ACHF carried out the assay, conceived of the study, carried out the assays and participated in its design and coordination and help to draft the manuscript. LCA participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP-N° 2012-17843-8; N° 2012-16662-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-N° 308702/2013-1; N° 475238/2013-3).

Author details

[1]Department of Maternal and Child Health, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. [2]Institute of Biological and Health Science, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil. [3]Laboratory of Scientific Writing, Department of Morphology and Physiology, School of Medicine of ABC, Santo André, SP, Brazil.

Received: 18 October 2014 Accepted: 28 May 2015
Published online: 12 August 2015

References

1. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation, World Health Organization Technical Report Series. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000.
2. França EL, Nicomedes TR, Calderon IMP, Honório-França AC. Time-dependent alterations of soluble and cellular components in human milk. Biol Rhythm Res. 2010;41:333–47.
3. França EL, Bitencourt RV, Fujimori M, Morais TC, Calderon IMP, et al. Human colostral phagocytes eliminate enterotoxigenic Eschechia coli opsonized by colostrum supernatant. J Microbiol Immunol Infec. 2011;44:1–7.
4. Newburg DS. Innate immunity and human milk. J Nutr. 2005;135:1308–12.
5. Morceli G, Honorio-França AC, Fagundes DLG, Calderon IMP, França EL. Antioxidant effect of melatonin on the functional activity of colostral phagocytes in diabetic women. PLoS One. 2013;8:e56915.
6. Fagundes DLG, França EL, Hara CCP, Honorio-França AC. Immunomodulatory effects of poly (ethylene glycol) microspheres adsorbed with cortisol on activity of colostrum phagocytes. Int J Pharmacol. 2012;8:510–8.
7. Islam SK, Ahmed L, Khan MN, Huque S, Begum A, Yunus AB. Immune components (IgA, IgM, IgG immune cells) of colostrum of Bangladeshi mothers. Pediatr Int. 2006;48:543–8.
8. Honorio-França AC, Hara CCP, Ormonde JVJ, Triches GN, França EL. Human colostrum melatonin exhibits a day-night variation and modulates the activity of colostral phagocytes. J Appl Biomed. 2013;11:153–62.
9. Richani K, Soto E, Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Nien JK, et al. Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system. J Matern Fetal Neonatal Med. 2005;17:239–45.
10. Fagundes DLG, França EL, Morceli G, Rudge MVC, Calderon IMP, Honório-França AC. The role of cytokines in the functional activity of phagocytes in blood and colostrum of diabetic mothers. Clin Develop Immunol. 2013;2013:1–8.
11. Massmann PF, França EL, Souza EG, Souza MS, Brune MFSS, Honorio-França AC. Maternal hypertension induces alterations in immunological factors of colostrum and human milk. Front Life Sci. 2013;7:155–63.
12. Kverka M, Burianova J, Lodinova-Zadnikova R, Kocourkova I, Cinova J, Tuckova L, et al. Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. Clin Chem. 2007;53:955–62.
13. World Health Organization. Obesity and Overweight. Fact Sheet#311. 2013. (updated March 2013). [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/].
14. Womack J, Tien PC, Feldman J, Shin JH, Fennie K, Anastos K, et al. Obesity and immune cell counts in women. Metabolism. 2007;56:998–1004.
15. Schmatz M, Madan J, Marino T, Davis J. Maternal obesity: the interplay between inflammation, mother and fetus. J Perinatol. 2010;30:441–6.
16. Kopelman P. Health risks associated with overweight and obesity. Obes Rev. 2007;8:13–7.
17. Andreasen KR, Andersen ML, Schantz AL. Obesity and pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand. 2004;83:1022–9.
18. Karlsson EA, Beck MA. The burden of obesity on infectious disease. Exp Biol Med (Maywood). 2010;235:1412–24.
19. Falagas ME, Kompoti M. Obesity and infection. Lancet Infect Dis. 2006;6:438–46.
20. Guelinckx I, Devlieger R, Beckers K, Vansant A. Maternal obesity: pregnancy complication, gestational weight gain and nutrition. Obes Rev. 2008;9:140–50.
21. Poston L, Harthoorn LF, Van der Beek EM. Obesity in pregnancy: implications for the mother and lifelong health of the child. A consensus statement. Pediatr Res. 2011;69:175–8.
22. Thornton CA, Jones RH, Doekhie A, Bryant AH, Beynon AL, Davies JS. Inflammation, obesity, and neuromodulation in pregnancy and fetal development. Adv Neuroimmune Biol. 2011;1:193–203.
23. Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. Placenta. 2008;29:274–81.

responsible for activation of the complement system, which, in turn, would cause the associated metabolic complications [48].

Obese mothers exhibited higher concentrations of serum CRP, but not in colostrum. CRP secretion by the liver is stimulated by several inflammatory cytokines, which are released in response to trauma, infection and inflammation, and this protein rapidly reduces the resolution of these conditions [49]. Another study found an association between serum CRP concentrations and prepregnancy BMI [50]. High CRP concentrations in the amniotic fluid of obese mothers expose the fetus to high amounts of inflammatory mediators, which may contribute to fetal programming, account for various complications during pregnancy and impact health condition in adulthood [51].

It should be considered that these data were evaluated in one period of collection and only one milk maturation stage that may be considered a limitation of this study. It is necessary to continue investigations focusing on other factors that may be involved during breastfeeding of the mothers with BMI alterations.

Conclusions

The data obtained in the present study support the hypothesis that metabolic changes promoted by obesity can change the biochemical and immunological parameters of breast milk. Nevertheless, we did not observe any changes that could cast doubt on the protection that breastfeeding provides to newborns or that could reflect the inflammatory state observed in maternal serum, because the only immunological component that increased in serum the obese women was IgA, which is known to be a non-inflammatory antibody. However, the increased calorie and fat content and glucose concentrations detected in colostrum from obese women deserve further attention.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MF carried out the assay, participated in the sequence alignment, and drafted the manuscript. ELF participated in the design of the study and coordination and helped to draft the manuscript. VF participated in the collect of samples, carried out the assays. TCM participated in the collect of samples, carried out the assays and help to draft the manuscript. ACHF carried out the assay, conceived of the study, carried out the assays and participated in its design and coordination and help to draft the manuscript. LCA participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP-N° 2012-17843-8; N° 2012-16662-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-N° 308702/2013-1; N° 475238/2013-3).

Author details

[1]Department of Maternal and Child Health, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. [2]Institute of Biological and Health Science, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil. [3]Laboratory of Scientific Writing, Department of Morphology and Physiology, School of Medicine of ABC, Santo André, SP, Brazil.

Received: 18 October 2014 Accepted: 28 May 2015
Published online: 12 August 2015

References

1. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation, World Health Organization Technical Report Series. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000.
2. França EL, Nicomedes TR, Calderon IMP, Honório-França AC. Time-dependent alterations of soluble and cellular components in human milk. Biol Rhythm Res. 2010;41:333–47.
3. França EL, Bitencourt RV, Fujimori M, Morais TC, Calderon IMP, et al. Human colostral phagocytes eliminate enterotoxigenic Eschechia coli opsonized by colostrum supernatant. J Microbiol Immunol Infec. 2011;44:1–7.
4. Newburg DS. Innate immunity and human milk. J Nutr. 2005;135:1308–12.
5. Morceli G, Honorio-França AC, Fagundes DLG, Calderon IMP, França EL. Antioxidant effect of melatonin on the functional activity of colostral phagocytes in diabetic women. PLoS One. 2013;8:e56915.
6. Fagundes DLG, França EL, Hara CCP, Honorio-França AC. Immunomodulatory effects of poly (ethylene glycol) microspheres adsorbed with cortisol on activity of colostrum phagocytes. Int J Pharmacol. 2012;8:510–8.
7. Islam SK, Ahmed L, Khan MN, Huque S, Begum A, Yunus AB. Immune components (IgA, IgM, IgG immune cells) of colostrum of Bangladeshi mothers. Pediatr Int. 2006;48:543–8.
8. Honorio-França AC, Hara CCP, Ormonde JVJ, Triches GN, França EL. Human colostrum melatonin exhibits a day-night variation and modulates the activity of colostral phagocytes. J Appl Biomed. 2013;11:153–62.
9. Richani K, Soto E, Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Nien JK, et al. Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system. J Matern Fetal Neonatal Med. 2005;17:239–45.
10. Fagundes DLG, França EL, Morceli G, Rudge MVC, Calderon IMP, Honório-França AC. The role of cytokines in the functional activity of phagocytes in blood and colostrum of diabetic mothers. Clin Develop Immunol. 2013;2013:1–8.
11. Massmann PF, França EL, Souza EG, Souza MS, Brune MFSS, Honorio-França AC. Maternal hypertension induces alterations in immunological factors of colostrum and human milk. Front Life Sci. 2013;7:155–63.
12. Kverka M, Burianova J, Lodinova-Zadnikova R, Kocourkova I, Cinova J, Tuckova L, et al. Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. Clin Chem. 2007;53:955–62.
13. World Health Organization. Obesity and Overweight. Fact Sheet#311. 2013. (updated March 2013). [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/].
14. Womack J, Tien PC, Feldman J, Shin JH, Fennie K, Anastos K, et al. Obesity and immune cell counts in women. Metabolism. 2007;56:998–1004.
15. Schmatz M, Madan J, Marino T, Davis J. Maternal obesity: the interplay between inflammation, mother and fetus. J Perinatol. 2010;30:441–6.
16. Kopelman P. Health risks associated with overweight and obesity. Obes Rev. 2007;8:13–7.
17. Andreasen KR, Andersen ML, Schantz AL. Obesity and pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand. 2004;83:1022–9.
18. Karlsson EA, Beck MA. The burden of obesity on infectious disease. Exp Biol Med (Maywood). 2010;235:1412–24.
19. Falagas ME, Kompoti M. Obesity and infection. Lancet Infect Dis. 2006;6:438–46.
20. Guelinckx I, Devlieger R, Beckers K, Vansant A. Maternal obesity: pregnancy complication, gestational weight gain and nutrition. Obes Rev. 2008;9:140–50.
21. Poston L, Harthoorn LF, Van der Beek EM. Obesity in pregnancy: implications for the mother and lifelong health of the child. A consensus statement. Pediatr Res. 2011;69:175–8.
22. Thornton CA, Jones RH, Doekhie A, Bryant AH, Beynon AL, Davies JS. Inflammation, obesity, and neuromodulation in pregnancy and fetal development. Adv Neuroimmune Biol. 2011;1:193–203.
23. Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. Placenta. 2008;29:274–81.

ARTIGO 2

CYTOKINE AND ADIPOKINE ASSOCIATION IN BLOOD AND COLOSTRUM OF OBESE MOTHERS

Mahmi Fujimori[1], Eduardo Luzia França[2], Tassiane Cristina Morais[1], Vanessa Fiorin[3], Luiz Carlos de Abreu[1,3], Adenilda Cristina Honório-França[2]

1- Department of Maternal and Child Health, School of Public Health, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil.

2- - Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil

3- Laboratory of Scientific Writing, Department of Morphology and Physiology, School of Medicine of ABC, Santo André, SP, Brazil

Corresponding author:

Adenilda Cristina Honório-França

Federal University of Mato Grosso

Institute of Biological and Health Sciences

Av. Valdon Varjão 6390 Barra do Garças – MT. Brazil 78600-000

Phone: +55-64-3638-2227 / +55-66-81135313

E-mail: adenildachf@gmail.com

Short title: Cytokine and adipokine in maternal obesity

SUMMARY STATEMENT

We examine changes in the level of cytokines and hormones in blood and colostrum of obese mothers.

Maternal systemic inflammation that is present in obese women influences adipokines and cytokine levels of colostrum.

A different mechanism to produce and regulate inflammatory mediators probably operates in the colostrum.

ABSTRACT

Breast milk contains bioactive components that contribute to newborn development. However, colostrum may undergo biochemical and immunological changes as a function of maternal overweight and obesity. To investigate this hypothesis, this study determined the levels of hormones and immunological markers in the blood and colostrum of overweight and obese mothers. Colostrum and blood samples were collected from 15 normoweight, 15 overweight and 15 obese women for determination of leptin, adiponectin, cytokines (TNF-α, IL-6, IL-10) and C-reactive protein (CRP). Obese mothers exhibited higher levels of blood TNF-α, IL-6 and CRP, serum and colostrum leptin and colostrum adiponectin and lower levels of blood adiponectin. Leptin levels in maternal blood and colostrum were positively correlated, as was pre-pregnancy BMI and blood TNF-α, IL-6, CRP and leptin. Adiponectin levels in colostrum and serum were negatively correlated. The results suggest that obesity changes hormonal and immunological components of maternal blood and colostrum. The modifications can have short-term and long-term effects on newborn development.

Keywords: colostrum, maternal blood, adiponectin, leptin, cytokines, obesity.

ABBREVIATIONS LIST

BMI	Body Mass Index
CRP	C-reactive Protein
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
Th	T-helper
Th1	T-helper 1
TNF-α	Tumour Necrosis Factor-α

INTRODUCTION

Obesity is associated with chronic low-grade inflammation, and its prevalence is associated with an increase in inflammatory markers such as IL-6, TNF, C-reactive protein (CRP) and leptin and decrease in anti-inflammatory adipokines (e.g. adiponectin) and IL-10 (1).

The chronic inflammation promoted by obesity can be aggravated during pregnancy, causing changes in the immune system and metabolism that may result in health complications (2,3). Maternal obesity also affects the fetus, given that inflammation during gestation is one of the main factors leading to complications in the neonatal period and childhood. Furthermore, the immune response programming of the fetus may be a predisposing factor for the development of diseases in adulthood (2).

Several epidemiological, clinical and experimental studies confirm the protective role of colostrum and milk against infectious diseases (4-6) and prevention of allergic (7) and chronic (8) diseases. The long-term benefits of breastfeeding include a decrease in systolic and diastolic blood pressure, decrease in total cholesterol and lower risk of type 2 diabetes, overweight and obesity (9).

Breast feeding effects on the metabolic programming of the individual include the prevention of obesity later in life. The mechanisms underlying the prevention of rapid weight gain in the postnatal period and in later stages of life are likely associated to the ability to self-regulate food intake and changes in the metabolic programming of the individual by bioactive substances of breast milk that can affect parameters such as the number and size of adipocytes and metabolic differentiation (10,11).

Adipokines identified in human milk have been (12) associated with energy regulation, appetite and anti-inflammatory immune response (13). Leptin and adiponectin are among the

main milk adipokines and likely involved in growth regulation and development of newborns and children, exhibiting long-term effects on the programming of energy balance (12). Leptin has an inflammatory nature, whereas adiponectin exhibits anti-inflammatory effects (14,15).

Maternal obesity is associated with an increase in leptin levels (16), decrease in adiponectin (17) and inflammatory responses in placenta, with high levels of pro-inflammatory cytokines such as IL- 1, MCP-1, TNF-α and IL-6 (18). Owing to the intense interrelationship between mother and child during the intrauterine and lactation periods, the immunological response of the mother can affect the immunological system of the child.

Immunological patterns of maternal metabolism affect the immune system development of newborns, through blood and colostrum, possibly increasing their susceptibility to infections. Thus, the aim of the study was to determine hormone and immunological markers in blood and colostrum of overweight and obese mothers.

MATERIALS AND METHODS

Cytokines prolife and hormones in maternal blood and colostrum from normoweight, overweight and obese mothers was evaluated in a cross-sectional study enrolled at the Pregnancy and Obstetric Service of the Maria José dos Santos Stein Hospital, managed by the School of Medicine of ABC, Santo André, SP, Brazil. The volunteers signed an informed consent form before entering the study, which was approved by the local ethics committee of the School of Public Health of the University of São Paulo (Protocol Number CAAE: 05269612.7.0000.5421). All the women were evaluated at the service.

Subjects

Blood and colostrum samples from 45 pregnant women (18-38 years old) were analyzed according to their prepregnancy BMI (calculated as weight (kg) divided by the square of the height (m^2): normoweight (n=15) subjects were recruited as control; overweight (n=15) and obese (n=15). Group definition was based on the World Health Organization criterion, considering normal weight for BMI 18,5-24.9, overweight for BMI 25-29.9, and obesity for BMI of 30 or more (19).

The controlled variables in all groups during pregnancy were smoking status (yes⁄no), hypertension (yes⁄no) and prepregnancy and gestational diabetes (yes/no). The inclusion criteria were as follows: (a) women with breasts without nipple fissures or mastitis; (b) who were exclusively breastfeeding their babies; and (c) signed a Consent Form. Exclusion criteria were fetal malformations and multiple pregnancy. Inflammatory and/or infectious processes or conditions were monitored, as the consumption of anti-inflammatory drugs. Details of delivery were collected after birth.

Colostrum sampling

We collected 8 mL of colostrum within 24-48h after delivery. Samples were centrifuged at 160 G and 4ºC for 10 min. The upper fat layer and cells were discarded, and the aqueous supernatant stored at -80oC for later cytokines, C-Reactive Protein and hormones analysis.

Blood sampling

Samples of 8 mL of maternal blood were collected at birth in tubes. We centrifuged them at 160 G for 15 min to separate serum from the cells. The serum was stored at -80ºC for later cytokines, C-Reactive Protein and hormones analysis.

Determination of hormones

Adiponectin and leptin concentrations in maternal serum and breast milk were measured with a commercially available ELISA kits (Biovendor-Laboratory Medicine, Czech Republic). Measurements of adiponectin and leptin in maternal serum were performed according to the manufacturer's instructions. The protocols were slightly modified for adiponectin and leptin in breast milk: to remove fat, samples were centrifuged at 160 G and 4ºC for 10 min. We used the fat-free phase for determination of adiponectin and leptin as described previously by Bronsky et al.(20).

Quantification of cytokines

Serum and colostrum supernatant were collected and stored at −80°C prior to analyses. The samples were thawed and cytokines (IL-6, IL-10, and TNF-α) were measured by cytometric bead array (CBA, BD Biosciences) according to the manufacturer procedures. A flow cytometer was used for these analyses (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). The data were analyses used the software FCAP Array 1.0 .

C-Reactive Protein assay

C-Reactive Protein (CRP) concentrations in human colostrum and serum were measured using the PCR Turbilatex Kit (BioTécnica®, Brazil, Catalog 20.015.00) by turbidimetric method. Samples of 5 µL of colostrum, serum and standard were placed in 1000 µL of solution (phosphate Buffer 40 mmol, sodium azide 0.95g/L, suspension of latex particles sensitized with goat IgG anti Human C-reactive protein). The suspensions were mixed and placed at 37°C and the reactions were measured immediately and at 120 seconds. The reactions were read on a spectrophotometer at 540 nm.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± standard error (SE). The statistically significant difference were evaluated using the Analysis of Variance (ANOVA) test with the Tukey multiple comparison test. Correlations were determined by Pearson correlation coefficients. A P value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The clinical characteristics of the normal weight, overweight and obese women studied are shown in Table 1. Their neonates exhibited similar somatometry at birth (Table 1).

As indicated by cytokine levels in colostrum and maternal blood (Table 2), obese mothers exhibited the highest levels of blood IL-6 and TNF-α, whereas in the colostrum these cytokines showed similar concentrations among the groups. Irrespective of the BMI, IL-10 levels were similar between maternal blood and colostrum. Obese mothers had the highest CRP levels in blood, but in colostrum they were similar among the groups (Table 2).

Adiponectin and leptin levels varied as a function of weight status and material sampled (blood or colostrum) . Blood leptin level was 21.16 ± 3.1 $ng.mL^{-1}$ in the normal weight group, 32.81 ± 3.77 $ng.mL^{-1}$ in overweight and 36.84 ± 1.92 $ng.mL^{-1}$ in obese women. In colostrum, leptin concentration was 0.19 ± 0.04, 0.16 ± 0.03 and 0.32 ± 0.06 $mg.dL^{-1}$ in normal weight, overweight and obese groups, respectively. Leptin levels were higher in maternal blood and colostrum of the obese group (Figure 1). In normal weight, overweight and obese groups, blood adiponectin levels were 8.65 ± 0.38, 7.71 ± 0.91 and 5.91 ± 0.69 $mg.mL^{-1}$ and colostrum adiponectin levels were 8.61 ± 1.03 9.69 ± 1.20 and 13.82 ± 02.08 $ng.mL^{-1}$, respectively. Obese women showed the highest levels of adiponectin in blood and the lowest levels in the colostrum

(Figure 2). Leptin levels in blood and colostrum were positively correlated, whereas adiponectin showed no correlation between the samples (Figure 3).

Pre-pregnancy BMI was positively correlated with TNF-α, IL-6, CRP and leptin in maternal blood an also leptin and adiponectin levels in colostrum. However, it was negatively correlated with adiponectin levels (Table 3).

The correlations between immunological marker and leptin and adiponectin levels are shown in Tables 4 and 5, respectively. Serum leptin was positively correlated with IL-6 cytokine and CRP, and serum adiponectin was negatively correlated TNF-α, IL-6 and CRP. No correlation were found between hormone levels and immunological components in colostrum.

DISCUSSION

Elevated levels of circulating cytokines and acute phase inflammatory proteins have been associated with maternal obesity (21-25). In obese mothers, the state of chronic inflammation can trigger an exaggerated inflammatory response in the placenta, with accumulation of macrophages and production of pro-inflammatory mediators (18). The present study identified high levels of cytokine and inflammatory markers in the blood of obese mothers, and the changes detected in leptin and adiponectin levels in their blood and colostrum may also be associated with this condition.

The high concentrations of cytokines IL-6, TNF-α and PCR in the blood of obese mothers was not observed in their colostrum. The course of pregnancy and postpartum is characterized by major changes in inflammatory mediators, and in obese women these modifications include increased levels of inflammatory markers in blood (6,24,25-28) amniotic fluid (29), placenta (18,30), fetal blood, (31) and newborns (6,32). Maternal obesity is known to increase the risk of morbidity and mortality of both the mother and the fetus, and aggravation of the

inflammation promoted by this condition appears to be involved in mediating a number of adverse effects during pregnancy.

Increased CRP levels during pregnancy, observed in mothers and their newborns, (32) can be considered a predictor of premature membrane rupture and preterm birth (28). High levels of serum IL-6 have also been described as a risk factor for preterm birth and subsequent intravascular hemorrhage in newborns (26). Increase in maternal BMI, in turn, is associated with systemic inflammation and activation of distinct inflammation pathways in the placenta (30). Furthermore, pre-pregnancy obesity is related to increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation (27). Fetal exposure to this pro-inflammatory milieu may lead to critical consequences for short and long-term obesity programming (18). Other studies report heightened CRP and TNF-α levels in the amniotic fluid of pregnant obese women, reinforcing fetal exposure to high concentrations of cytokines and pro-inflammatory mediators (29).

In the present study, obesity did not change the levels of cytokines in colostrum. The presence of these cytokines in breast milk may be an important compensatory mechanism for the delayed development of the newborn immune system (33).

Leptin levels were correlated with pre-pregnancy BMI, confirming that obese mothers had higher levels of adipokines in both blood and colostrum. The results corroborate other studies reporting that an increase in leptin secretion in blood (34) and colostrum (12) is associated with BMI. Similar to other investigations, the results indicate a positive correlation between leptin levels in colostrum and maternal blood (12,35). It is suggested that leptin levels in human milk are positively correlated with BMI (35) and maternal fat (37), but not with the calorie content of milk.

Leptin levels in colostrum during the first weeks after childbirth are negatively associated with baby weight gain at six months (3). This suggests that milk leptin reflects the association

between maternal body composition and infant growth and development, playing a critical role in the regulation of appetite and food intake during infancy (38). Part of the protective effects that breastfeeding provides against chronic diseases, especially obesity later in life, have been attributed to leptin (39). Furthermore, other studies report a positive correlation between leptin levels and blood pressure in pregnant women, suggesting increased risk of cardiometabolic complications (38).

Although blood adiponectin levels were low in obese mothers, their colostrum exhibited high levels of this hormone. Blood and colostrum adiponectin levels were not correlated, but maternal BMI was positively associated with blood adipokine levels and negatively correlated with colostrum adipokine levels. Other studies report a reduction in serum adiponectin in obese individuals (38, 40-42), suggesting that fetuses from obese mothers are less able to control inflammation because they exhibit lower circulating levels of these anti-inflammatory adipokines, limiting their optimal growth or even increasing the risk of miscarriage and premature delivery (31). Other studies show a negative correlation between maternal obesity and adiponectin levels, but a positive correlation between BMI and the levels of this hormone in breast milk (14,43).

A positive correlation has been reported between serum adiponectin levels in infants and the breast milk they consume (44). However, the implications of high adiponectin concentrations in breast milk are controversial. While some authors associate it with lower weight gain and a leaner body in 6-month old breastfed children (43), others suggest that high levels of adiponectin in breast milk may be a risk factor for the development of childhood obesity (35). Breast milk adiponectin is mostly in the active form, indicating that its adipokines are likely involved in regulating neonatal weight gain (43).

Leptin and adiponectin have been associated with immunomodulatory effects. In the present study, leptin levels were positively correlated with IL-6 and CRP in maternal blood, but showed no correlation with TNF-α in blood or colostrum. Adiponectin, in turn, was negatively correlated with inflammatory markers (TNF-α, IL-6 and CRP) in maternal blood. Leptin is a pleiotropic molecule known to be an important factor in satiety regulation and classified as a cytokine, playing an important role in innate and acquired immunity (45). Leptin participated in the regulation of T cell response, leading to polarization of Th cells into the Th1 phenotype and inducing the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF-α and IL-6 (15,46). Adiponectin, in turn, has an anti-inflammatory nature and induces the release of IL-10, its immunomodulatory action being opposite to that of leptin (15,47).

Other reports indicate that serum leptin concentrations are positively associated with circulating IL-6 and CRP, supporting the relationship between leptin and other immunological parameters (48). Low levels of adiponectin in the blood of obese women are associated with elevated IL-6 and CRP levels (49), whereas normal individuals show high levels of adiponectin and secretion of lower TNF-α levels in adipose tissue (50).

Obese mothers displayed a decrease in blood adiponectin levels and an increase in leptin levels, while, despite the increase in leptin levels, their colostrum exhibited surprisingly high concentrations of adiponectin. Adiponectin exerts anti-inflammatory activity, and is capable of reducing the production of pro-inflammatory and increasing the production of anti-inflammatory cytokines. In colostrum, an increase in adiponectin is likely associated with the regulatory role of breast milk in the promotion of adequate growth in addition to the immunological and metabolic programming of newborns.

In conclusion, the results suggest an interaction between hormonal components and immune mediators in the blood of obese mothers. A different mechanism to produce and

regulate inflammatory mediators probably operates in the colostrum, which exhibits immunological components that protect newborns without triggering inflammatory processes.

SOURCE OF FUNDINGS

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP - Nº 2012-17843-8; Nº 2012-16662-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Nº 308702/2013-1; Nº 475238/2013-3), Fundação de Amparo a Pesquisa de Mato Grosso (FAPEMAT).

DECLARATION OF INTEREST

No conflict of interest regarding sources of financial support, corporate involvement, patent holding etc. has to be disclosed for the present study.

AUTHOR CONTRIBUTION

Mahmi Fujimori carried out the assay, participated in the sequence alignment, and drafted the manuscript. Eduardo Luzia França participated in the design of the study and coordination and helped to draft the manuscript. Tassiane Cristina Morais participated in the collect of samples, carried out the assays and help to draft the manuscript. Vanessa Fiorin participated in the collect of samples, carried out the assays. Luiz Carlos de Abreu participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. Adenilda Cristina Honório-França carried out the assay, conceived of the study, carried out the assays and participated in its design and coordination and help to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

CLINICAL PERSPECTIVES

Increase in maternal BMI is associated with systemic inflammation and fetal exposure in pro-inflammatory milieu may lead to critical consequences for short and long-term programming obesity. Thus, the use of breastmilk with alternative therapy can minimize inflammation and interfere with fetal metabolic programming. For the mothers the encouragement for breastfeeding can help to control weight, and consequently decrease inflammation resulting from obesity.

REFERÊNCIAS

1. Hersoug LG, Linneberg A. The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: does obesity induce decreased immune tolerance? Allergy. 2007;62:1205–1213.

2. Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. Nutr Rev. 2007 Dec;65(12 Pt 2):S194-202.

3. Schuster S, Hechler C, Gebauer C, Kiess W, Kratzsch J. Leptin in maternal serum and breast milk: association with infants' body weight gain in a longitudinal study over 6 months of lactation. Pediatr Res. 2011 Dec;70(6):633-7.

4. Chantry CJ, Howard CR, Auinger P. Full breastfeeding duration and associated decrease in respiratory tract infection in US children. Pediatrics. 2006;117:425-32.

5. França EL, Bitencourt RV, Fujimori M, Morais TC, Calderon IMP, Honorio-França AC: Human colostral phagocytes eliminate enterotoxigenic Eschechia coli opsonized by colostrum supernatant. J. Microbiol Immunol Infec 2011, 44:1-7.

6- Fagundes DLG, França EL, Fernandes RTS, Hara CCP, Morceli G, Honorio-França AC, Calderon IMP. Changes in T cell phenotype and cytokines profile in maternal blood, cord blood and colostrum of diabetic mothers. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016 Mar, 29(6):998-1004.

7. Minniti F, Comberiati P, Munblit D, Piacentini GL, Antoniazzi E, Zanoni L, Boner AL, Peroni DG. Breast-milk characteristics protecting against allergy. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2014 Mar;14(1):9-15.

8. Kelishadi R, Farajian S. The protective effects of breastfeeding on chronic non-communicable diseases in adulthood: A review of evidence. Adv Biomed Res. 2014 Jan 9;3:3.

9. Horta BL, Bahl R, Martinés JC, Victora CG. Geneva: World Health Organization; 2007. World Health Organization. Evidence on the long-term effects of breastfeeding Systematic reviews and meta-analysis.

10. Dewey KG. Is breast feeding protective against child obesity? J Hum Lact 2003;19:9-18.

11. Metzger MW, McDade TW. Breastfeeding as obesity prevention in the United States: A sibling difference model. Am J Hum Biol 2010;22:291-6. 31.

12. Savino F, Liguori SA, Petrucci E, Lupica MM, Fissore MF, Oggero R, Silvestro L. Evaluation of leptin in breast milk, lactating mothers and their infants. Eur J Clin Nutr. 2010;64:972-7.

13. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. J Immunol. 2005 Mar 15;174(6):3137-42.

14. Martin LJ, Woo JG, Geraghty SR, Altaye M, Davidson BS, Banach W, Dolan LM, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. Am J Clin Nutr. 2006;83:1106-11.

15. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nature. 2006; 6,772-83.

16. Misra VK, Trudeau S. The influence of overweight and obesity on longitudinal trends in maternal serum leptin levels during pregnancy. Obesit; 2011;19:416e21.

17. Hendler I, Blackwell SC, Mehta SH, Whitty JE, Russell E, Sorokin Y, Cotton DB. The levels of leptin, adiponectin, and resistin in normal weight, overweight, and obese pregnant women with and without preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 2005 Sep;193(3 Pt 2):979-83.

18. Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, Hauguel-de Mouzon S. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. Placenta. 2008; 29:274-281.

19.WHO. World Health Organization. Division of Noncommunicable Diseases. Programme of Nutrition Family and Reproductive Health. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation on obesity. Geneva: WHO; 1999.

20. Bronsky J, Karpisek M, Bronska E, Pechova M, Jancikova B, Kotolova H, Stejskal D, Prusa R, Nevoral J. Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: proteins newly identified in human breast milk. Clin Chem. 2006 Sep;52 (9):1763-70.

21. Ramsay JE, Ferrell WR,Crawford L et al. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87: 4231-7.

22. Retnakaran R, Hanley AJ, Raif N, Connelly PW, Sermer M, Zinman B. C-reactive protein and gestational diabetes: the central role of maternal obesity. J Clin Endocrinol Metab 2003;8(8):3505–6.

23. Stewart FM, Freeman DJ, Ramsay JE et al. Longitudinal assessment of maternal endothelial function and markers of inflammation and placentalfunction throughout pregnancy in lean and obese mothers. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92: 969-75.

24. Madan JC, Davis JM, Craig WY, Collins M, Allan W, Quinn R, Dammann O. Maternal obesity and markers of inflammation in pregnancy. Cytokine. 2009 Jul; 47(1):61-4.

25. Fujimori M, França EL, Fiorin V, Morais TC, Honorio-França AC, Abreu LC. Changes in the biochemical and immunological components of serum and colostrum of overweight and obese mothers. BMC Pregnancy Childbirth.2015:15:166.

26. Sorokin Y, Romero R, Mele L, Wapner RJ, Iams JD, Dudley DJ, Spong CY, Peaceman AM, Leveno KJ, Harper M, Caritis SN, Miodovnik M, Mercer BM, Thorp JM, O'Sullivan MJ, Ramin SM, Carpenter MW, Rouse DJ, Sibai B. Maternal serum interleukin-6, C-reactive protein, and matrix metalloproteinase-9 concentrations as risk factors for preterm birth <32 weeks and adverse neonatal outcomes. Am J Perinatol. 2010 Sep;27(8):631-40.

27. Basu S, Haghiac M, Surace P, Challier JC, Guerre-Millo M, Singh K, Waters T, Minium J, Presley L, Catalano PM, Hauguel-de Mouzon S. Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. Obesity (Silver Spring). 2011 Mar;19(3):476-82.

28. Banaem ML, Mohamadi B, Asghari Jaafarabadi M, Aliyan MN. Maternal serum C-reactive protein in early pregnancy and occurrence of preterm premature rupture of membranes and preterm birth. J Obstet Gynaecol Res. 2012 May;38(5):780-6.

29. Bugatto F, Fernández-Deudero A, Bailén A, Fernández-Macías R, Hervías-Vivancos B, Bartha JL. Second-trimester amniotic fluid proinflammatory cytokine levels in normal and overweight women. Obstet Gynecol. 2010; 115:127-33.

30. Aye IL, Lager S, Ramirez VI, Gaccioli F, Dudley DJ, Jansson T, Powell TL. Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. Biol Reprod. 2014 Jun;90(6):129.

31. Vega-Sanchez R, Barajas-Vega HA, Rozada G, Espejel-Nuñez A, Beltran-Montoya J, Vadillo-Ortega F. Association between adiposity and inflammatory markers in maternal and fetal blood in a group of Mexican pregnant women. Br J Nutr. 2010 Dec;104(12):1735-9.

32. Leibowitz KL, Moore RH, Ahima RS, Stunkard AJ, Stallings VA, Berkowitz RI, Chittams JL, Faith MS, Stettler N. Maternal obesity associated with inflammation in their children. World J Pediatr. 2012 Feb;8(1):76-9.

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

34. Szabová M, Jahnová E, Horváthová M, Ilavská S, Pružincová V, Nemessányi T, Tulinská J, Wsólová L, Volkovová K. Changes in immunologic parameters of humoral immunity and adipocytokines in obese persons are gender dependent. Hum Immunol. 2012;75:486-92

35. Weyermann M1, Beermann C, Brenner H, Rothenbacher D. Adiponectin and leptin in maternal serum, cord blood, and breast milk. Clin Chem. 2006; 52:2095-102.

36. Eilers E, Ziska T, Harder T, Plagemann A, Obladen M, Loui A. Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants. Early Hum Dev. 2011 Jun;87(6):415-9.

37. Houseknecht KL, McGuire MK, Portocarrero CP, McGuire MA, Beerman K. Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Nov 26;240(3):742-7.

38. Callegari SB, de Resende EA, Barbosa Neto O, Rodrigues V Jr, de Oliveira EM, Borges Mde F. Obesity and cardiometabolic risk factors during pregnancy. Rev Bras Ginecol Obstet. 2014 Oct;36(10):449-55.

39. Palou A, Picó C. Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life. Appetite. 2009 Feb;52(1):249-52.

40. Houseknecht KL, McGuire MK, Portocarrero CP, McGuire MA, Beerman K. Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Nov 26;240(3):742-7.

41. Miralles O, Sánchez J, Palou A, Picó C. A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. Obesity (Silver Spring). 2006 Aug;14(8):1371-7.

42. Fields DA, Demerath EW. Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF-α in human breast milk with infant growth and body composition. Pediatr Obes. 2012 Aug;7(4):304-12.

43. Woo JG, Guerrero ML, Altaye M, Ruiz-Palacios GM, Martin LJ, Dubert-Ferrandon A, Newburg DS, Morrow AL. Human milk adiponectin is associated with infant growth in two independent cohorts. Breastfeed Med. 2009 Jun;4(2):101-9.

44. Ozarda Y, Gunes Y, Tuncer GO. The concentration of adiponectin in breast milk is related to maternal hormonal and inflammatory status during 6 months of lactation. Clin Chem Lab Med 2012;50:911-917.

45. Faggioni R, Feingold KR, Grunfeld C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. FASEB J. 2001 Dec;15(14):2565-71.

46. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. Leptin regulates proinflammatory immune responses. FASEB J. 1998 Jan;12(1):57-65.

47. Heredia FP, Sonia GM, Ascension M. Chronic and degenerative diseases: obesity, inflammation and the immune system. Proc Nutr Soc 2012, 71:332-338.

48. Meyers JA, Liu AY, McTiernan A, Wener MH, Wood B, Weigle DS, Sorensen B, Chen-Levy Z, Yasui Y, Boynton A, Potter JD, Ulrich CM. Serum leptin concentrations and markers of immune function in overweight or obese postmenopausal women. J Endocrinol. 2008 Oct;199(1):51-60.

49. Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K, Hartwig F, Heintze U, Janke J, Möhlig M, Pfeiffer AF, Luft FC, Sharma AM. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. Diabetes. 2003 Apr;52(4):942-7.

50. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. Diabetes. 2003 Jul;52(7):1779-85.

Table 1. Clinical characteristics of the women under study, according to pre-gestational BMI status (normoweight, overweight and obese).

Variables	Normoweight (n=15)	Overweight (n=15)	Obese (n=15)
Mothers			
Age (y)	25.8 ± 6.1	24.20 ± 6.3	29.40 ± 5.9
Height before pregnancy (cm)	162.6 ± 0.6	161.6 ± 0.5	160.6 ± 0.8
Weight before pregnancy (kg)	58.5 ± 6.0	71.46 ± 4.1	87.09 ± 11.1
BMI before pregnancy (kg/m^2)	22.1 ± 1.8	27.4 ± 1.3	34.4 ± 4.9
Weight gain over pregnancy (kg)	13.1 ± 4.6	10.6 ± 4.9	12.8 ± 7.8
Mode of delivery (% vaginal)*	11/15 (73.3%)	8/15 (53.3%)	7/15 (46.6%)
Duration of gestation (wk)[#]	39.0 ± 2.0	39.6 ± 1.1	40.1 ± 1.0
Primipara (%) *	8/15 (53.3%)	7/15 (46.6%)	5/15 (33.3%)
Glycemic levels	76.1 ± 7.6	75.7 ± 8.2	79.1 ± 8.3
Infants			
Infant gender (% female) *	8/15 (53.3%)	6/15 (40.0%)	7/15 (46.%)
Weight (kg)	3.3 ± 0.5	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.5
Height (cm)	48.3 ± 2.2	49.2 ± 1.8	48.7 ± 1.9

Data for all mothers included are shown as mean and SD.
[#] Median
* Percentages (%).

Table 2. Concentration of inflammation and immune biomarkers in maternal serum and colostrum.

	BMI category (Kg/m²)			
Biomarker	**Normoweight**	**Overweight**	**Obese**	**p**
TNF-α, pg/mL				
Colostrum	10.58±1.77	11.67±2.10	12.91±2.44	0.7353
Serum	5.49±0.70	5.86±0.64	8.63±0.61*	0.0383
IL-6, pg/mL				
Colostrum	34.73±7.68	38.20±7.07	44.04±10.28	0.5520
Serum	1.73±0.18	2.87±0.67	4.03±0.76*	0.0152
IL-10, pg/mL				
Colostrum	8.52±1.40	7.56±1.83	8.08±1.31	0.9061
Serum	4.27±0.74	4.03±0.69	4.09±0.72	0.9696
CPR, mg/dL				
Colostrum	0.38±0.12	0.47±0.13	0.56±0.18	0.7025
Serum	0.91±0.33	1.50±0.37*	8.50±2.01	<0.0001

* Indicates intergroup differences within each sample.

Data are presented as mean ±SE.

Table 3. Correlations of leptin and immune biomarker concentrations in maternal serum and colostrum. [a]

	Median (Range)	Correlation coeficient	p
Maternal Serum			
TNF-α, pg/mL	6.98 (2.16-14.9)	0.1478	0.3502
IL-6, pg/mL	2.88 (0.83-7.15)	0.4858	0.0102
IL-10, pg/mL	4.26 (1.38-8.12)	0.2906	0.085
CPR, mg/dL	3.67 (0.00-20.10)	0.3944	0.031
Colostrum			
TNF-α, pg/mL	12.03 (3.14-34.53)	0.2805	0.0719
IL-6, pg/mL	39.00 (9.39-87.6)	0.2324	0.24433
IL-10, pg/mL	8.13 (2.47-19.22)	-0.2236	0.1897
CPR, mg/dL	0.47 (0.00-1.45)	0.1571	0.4245

[a] Results shown are for correlations for leptin.

Table 4. Correlations of adiponectin and cytokines and CRP concentrations in maternal serum and colostrum. [a]

	Median (Range)	Correlation coeficient	p
Maternal Serum			
TNF-α, pg/mL	6.98 (2.16-14.9)	-0.3967	0.0093
IL-6, pg/mL	2.88 (0.83-7.15)	-0.4621	0.0152
IL-10, pg/mL	4.26 (1.38-8.12)	0.0783	0.6499
CPR, mg/dL	3.67 (0.00-20.10)	-0.3729	0.0423
Colostrum			
TNF-α, pg/mL	12.03 (3.14-34.53)	0.0857	0.5893
IL-6, pg/mL	39.00 (9.39-87.60)	0.2159	0.2794
IL-10, pg/mL	8.13 (2.47-19.22)	0.0776	0.6530
CPR, mg/dL	0.47 (0.00-1.45)	-0.0849	0.5578

[a] Results shown are for correlations for adiponectin.

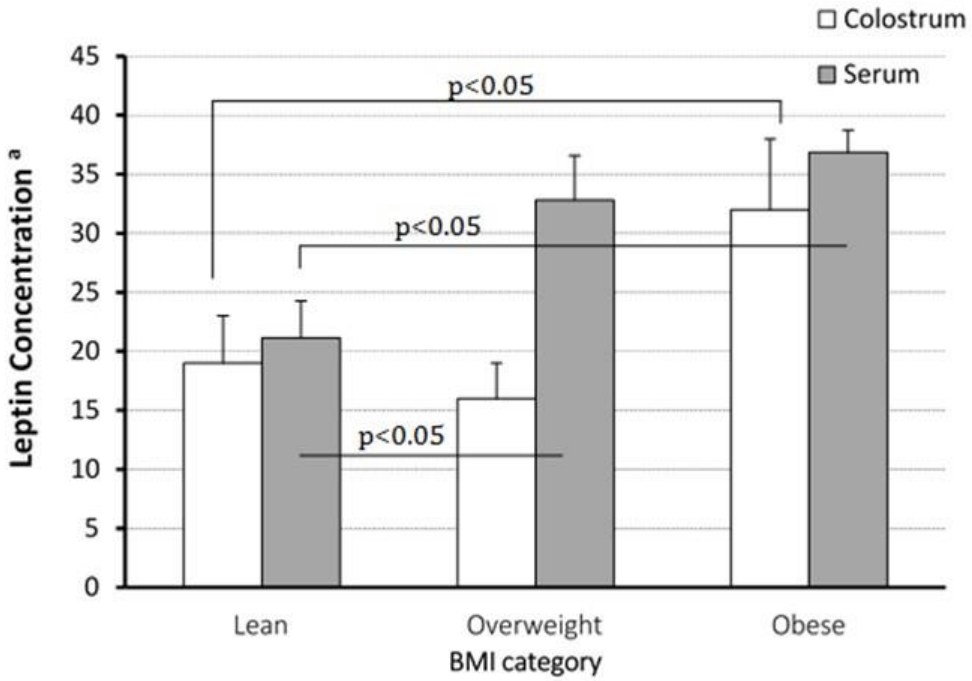


Figure 1. Leptin levels in the samples and study groups. Data correspond to mean ± SE. Statistical significance was set at $p < 0.05$. [a] Leptin levels were measured in $ng.dL^{-1}$ in colostrum and $ng.mL^{-1}$ in serum.

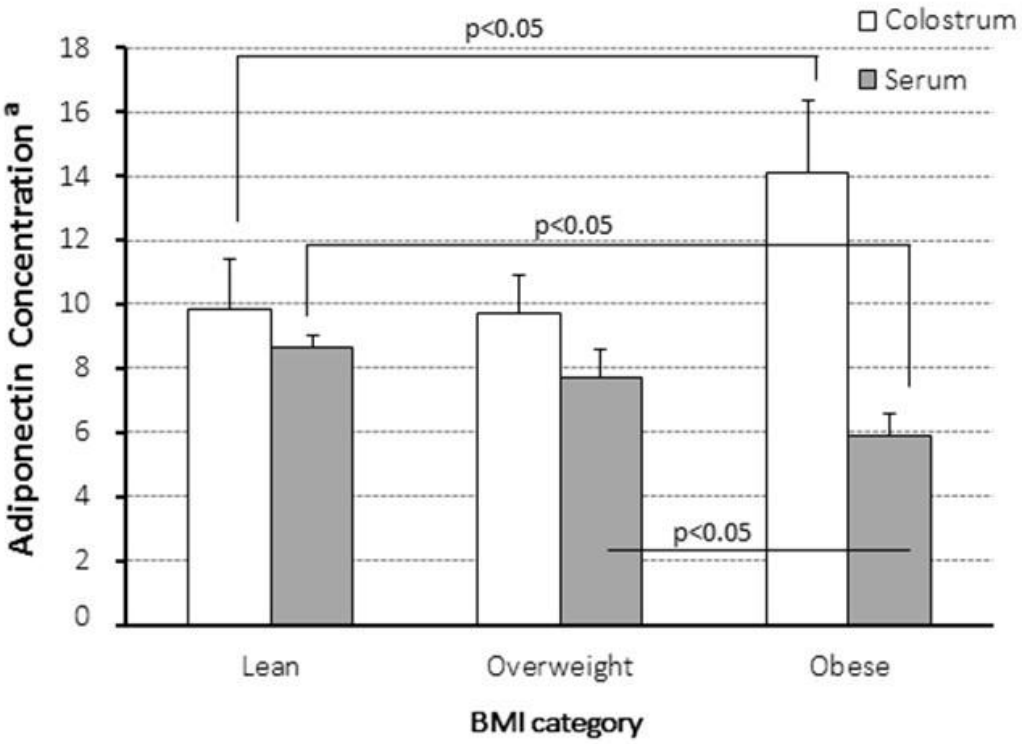


Figure 2. Adiponectin levels in the blood and colostrum samples of the groups. Data correspond to mean ± SE. Statistical significance was set at $p < 0.05$. [a] Adiponectin levels were measured in $ng.mL^{-1}$ in colostrum and $\mu g.mL^{-1}$ in serum.

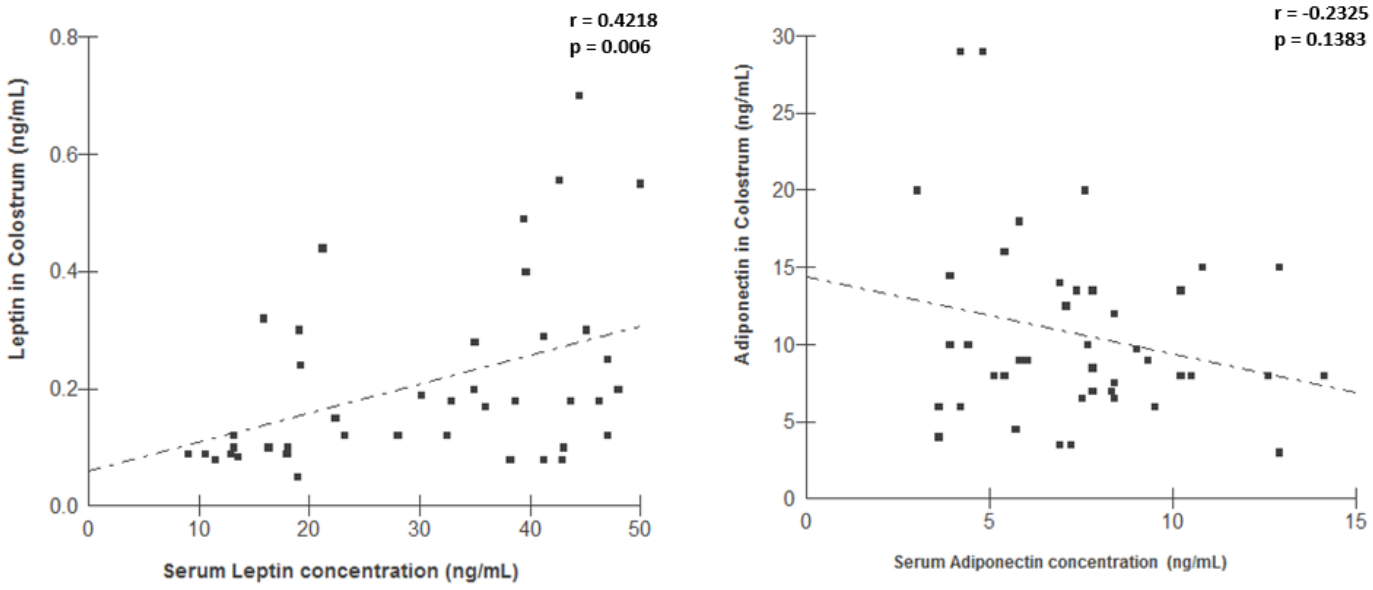


Figure 3. Correlations of leptin (A) and adiponectin (B) concentrations in maternal serum and colostrum.

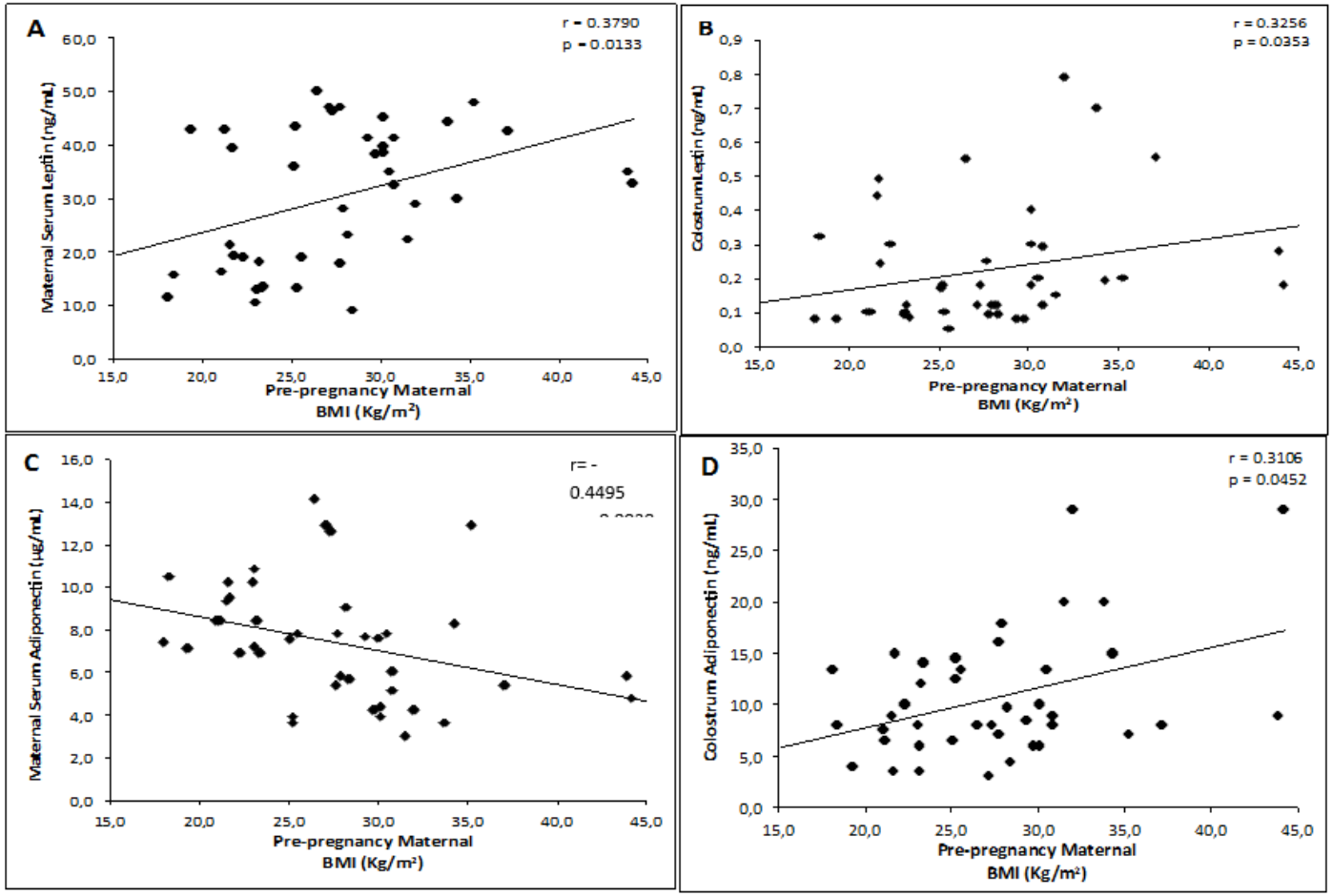


Figure 4. Leptin and Adiponectin concentrations by maternal BMI in serum (A,C) and colostrum (B,D) samples.

ARTIGO 3

Perfil de citocinas do sangue e colostro de mães obesas

Fujimori M[1], Fiorin V[2], Morais TC[3], França EL[3], Dafneh Herrero[1], Honório-França AC[3], Abreu LC[1,2]

1- Department of Maternal and Child Health, School of Public Health, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil.

2- Laboratory of Scientific Writing, Department of Morphology and Physiology, School of Medicine of ABC, Santo André, SP, Brazil

3- Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Pontal do Araguaia – MT, Brazil

Corresponding author: AC Honorio-França

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde –UFMT – Pontal do Araguaia– MT

Rodovia MT100, Km 3,5 s/nº , Pontal do Araguaia– MT, Brazil. Telephone number: 55-66340121121; Fax number: 55-6634021117 CEP: 78698-000 e-mail: denifran@terra.com.br

ABSTRACT

Obesity is an inflammatory condition, cytokines have been implicated in its physiopathology. The present study evaluated the cytokine profile present in maternal blood and colostrum of overweight and obese mothers. The women were divided for maternal blood and colostrum sampling according to their body mass index status: lean (N=15), overweight (N=15) and obese (N=15) groups. We determined cytokines levels by flow cytometer and the data were analyses used the software FCAP Array 1.0. No significant variations were detected in the IL2, IL4, IL-10, and IL-17 concentrations between colostrum and maternal blood and at either different groups studied. IL6 and TNF- α was increased in maternal blood from obese mothers. When available between groups we observed that, independently of BMI, IL6, TNF-α and IFN-γ concentration was higher in colostrum, and TGF- β is higher in maternal blood. Maternal IL-6 was found significantly correlated with colostrum cytokines. The lowest concentration of TGF-β was observed in colostrum from obese mothers. These data suggest maternal obesity modified the cytokines profile in colostrum and maternal blood and corroborate the hypothesis that BMI alters the roles of cytokines thus in the systemic and mucosal immune response.

Key words: colostrum, maternal blood, cytokines, obesity.

INTRODUÇÃO

A obesidade está associada a uma série de doenças metabólicas e representa uma das principais preocupações de saúde pública na atualidade devido ao significativo avanço de sua prevalência nos últimos anos (MASOODI et al. 2014). Existem fortes evidências de que obesidade pode comprometer funções imunológicas (MILNER & BECK, 2012), levando a uma maior incidência e severidade de doenças infecciosas (FALAGAS & KOMPOTI, 2006). Os mecanismos responsáveis por essa imunocompetência reduzida parecem ser resultado do estado de inflamação crônica de baixo grau decorrentes do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo (WOMACK et al. 2007; DAS, 2001).

A obesidade exerce forte impacto na saúde perinatal por representar um importante fator associado com complicações na gravidez e no aumento da morbidade e mortalidade materno-fetal (AVCI et al 2014). A obesidade materna pode intensificar a inflamação crônica associada à gestação se estendendo para uma resposta inflamatória exacerbada no ambiente intra-uterino capaz de influenciar o desenvolvimento do feto (CHALLIER et al 2008). Durante a gestação, as citocinas desempenham um importante papel na modulação do sistema imunológico materno (AUSTGULEN et al. 1994) no sentido de possibilitar o estabelecimento e a manutenção de uma gestação viável (GUILBERT, ROBERTSON & WEGMANN, 1993).

Os linfócitos T $CD4^+$ atuam na regulação do sistema imunológico através de sua diferenciação em diferentes subtipos que secretam perfis de citocinas característicos com funções dinstintas. As células T $CD4^+$ foram classificadas inicialmente em Th1, que secretam principalmente as citocinas interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, interferon gamma (IFN-γ), e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e promovem a inflamação e as respostas mediadas por células; e em TH2 que são fonte das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e estão envolvidas principalmente na regulação das respostas humorais (CHALLIS et al. 2009; RENGARAJAN et al. 2000).

Estudos sugerem que durante a gestação há um predomínio de citocinas produzidas pelas células Th2 e inibição das respostas citotóxicas das células Th1 aos antígenos fetais, possibilitando a manutenção da gestação e a sobrevivência do feto (WEGMANN et al. 2003). Processos inflamatórios e infecciosos podem alterar o balanço Th1/Th2 ocasionando um predomínio do perfil Th1, que inicia a cascata de produção de citocinas inflamatórias envolvidas em desfechos gestacionais adversos como aborto espontâneo, parto prematuro, restrição do crescimento intrauterino e pré-eclampsia (CHALLIS et al. 2009).

Atualmente o paradigma Th1/Th2 se tornou insuficiente para explicar a ocorrência de casos de aborto de repetição associados ao padrão Th2 (SAITO et al. 2010; CHAOUAT et al. 2003). Assim, respostas Th3 e Th17 tem sido apontadas como fatores relevantes na gestação (SAITO et al. 2010; PECK et al. 2009). As células Th17 secretam IL-17, uma citocina pró-inflamatória, e estão associadas com doenças autoimunes, rejeição aguda a transplantes e pré-eclampsia; enquanto as células Th3 formam um subtipo específico de células T que secreta principalmente fator de crescimento transformante (TGF-β), citocina envolvida na imunorregulação e tolerância e que apresenta propriedades supressoras sobre as células Th1 eTh17 (SAITO et al. 2010; WEINER, 2001).

No sobrepeso e na obesidade há controvérsias em relação ao equilíbrio entre perfis de citocinas. Alguns autores relatam um desvio para a produção de citocinas de perfil Th1 (WINER et al. 2009; ROCHA et al. 2008; SVEC et al. 2007; PACÍFICO et al. 2006), outros relatam aumento do perfil Th2 (VAN DER WEERD et al. 2012; CIPRANDI et al. 2011; HERSOUG & LINNEBERG, 200) e TH17 (WINER et al. 2009). Dada a importância de uma fina regulação de citocinas durante a gestação (DENNEY et al. 2011; AUSTGULEN et al. 1994), condições como a obesidade que alteram o balanço de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias podem estar associados com desfechos gestacionais adversos.

Na literatura há poucos dados em relação ao perfil de citocinas no sangue e colostro de mães obesas. Sabe-se que a dieta pode influenciar o perfil Th1/Th2 (KHAN et al. 2006). Estudos tem revelado que a transferência materna de fatores imunológicos durante a gestação e a persistência durante a amamentação são importantes para o recém-nascido (NGUYEN et al. 2007). Assim, o presente estudo avaliou os perfis de citocinas presentes no colostro e sangue materno de mães portadoras de obesidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

O perfil de citocinas do sangue e colostro humano de mães eutróficas, sobrepeso e obesidade foram avaliadas em uma coorte histórica. As amostras foram obtidas nos Serviços Obstétricos do Hospital Maria José dos Santos Stein, conveniado à Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil. As mães foram consultadas sobre sua disponibilidade em doar uma amostra de sangue e uma de colostro, e as coletas só foram realizadas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarescido. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética

e Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil sob protocolo .

Sujeitos

Amostras de sangue e colostro de 45 gestantes, entre 18 a 38 anos, foram analisados de acordo com o IMC pré-gestacional (calculado como peso (kg) dividido pelo quadrado da altura (m^2)): gestantes eutróficas (n=15) foram recrutadas para compor o grupo controle; sobrepeso (n=15) e obesidade (n=15). A definição dos grupos baseou-se nos Critérios da Organização Mundial de Saúde, considerando peso normal IMC entre 18,5-24.9, sobrepeso para IMC entre 25-29.9, e obesidade para IMC igual a 30 ou mais (WHO, 1995).

As variáveis de controle em todos os grupos durante a gestação foram consumo de cigarro (sim/não), hipertensão (sim/não), diabetes gestacional ou pré-gestacional (sim/não). Os critérios de exclusão foram malformações fetais e gestações múltiplas. Dados relativos aos parto foram coletados após o nascimento.

Obtenção de sobrenadante de colostro humano

Amostras de 8 ml de colostro foram coletadas e posteriormente centrifugadas durante 10 minutos sob refrigeração a 4ºC para obtenção do sobrenadante de colostro, armazenadas em freezer – 80ºC para posterior dosagens bioquímicas, imunológicas e hormonais.

Obtenção do Soro Sanguíneo

Amostras de 8 ml de sangue foram coletadas e posteriormente centrifugadas por 15 minutos a 160G a temperatura ambiente. O soro foi separado e armazenado a -80°C para análises posteriores. O soro foi separado e armazenado a -80ºC para posterior dosagens bioquímicas, imunológicas e hormonais.

Quantificação das Citocinas

As concentrações de citocinas presentes nas amostras de plasma e sobrenadante de colostro foram avaliadas pelo Kit “Cytometric Bead Array” (CBA, BD Bioscience, USA – Fagundes et al. 2016). As análises destas citocinas foram realizadas através de citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). Os dados foram analisados através do software FCAP *Array*. As concentrações de TGF-β1 foram mensuradas utilizando kits comerciais ELISA para essas moléculas (R&D Systems, Minneapolis, EUA).

Análise estatística

Os resultados foram expressos em media ± erro padrão (EP). Para análise estatística utilizou-se Análise de Variância (ANOVA), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Para o estudo das correlações, entre citocinas do sangue materno e colostro, utilizou-se o teste de correlação de Pearson. As análises estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor 0.05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

As características antropométricas das mães e de seus recém-nascidos são apresentados na tabela 1. Em todos os grupos estudados (eutróficos, sobrepeso e obesidade) os neonatos tem características somatométricas similares ao nascimento.

As citocinas IL-2, TNF-α, INF-γ, IL-4, IL-6, IL-10, TGF-β e IL-17 foram avaliadas no colostro e sangue materno dos diferentes grupos (Tabela 2). As concentrações de IL-2, IL-10 e IL-17foi similar entre os grupos estudados, tanto no sangue como no colostro. Houve aumento de IL-6 e TNF-α no sangue de mães obesas em comparação com os grupos de mães com sobrepeso e eutróficas (tabela 2).

As amostras de colostro (independente do IMC) apresentaram maiores concentrações de IL6, IL-4, TNF-α, IFN-γ e TGF-β (Tabela 2). Os níveis de TGF-β foram menores no colostro de mães obesas. Na figura 1 está apresentada a intensidade de fluorescência das diferentes citocinas presentes no colostro e no sangue materno dos grupos estudados

As citocinas presentes no sangue materno e no colostro foram correlacionadas. Observou-se que houve correlação entre as concentrações de IL-6 presentes no sangue e no colostro. Entretanto, não houve correlação entre as concentrações de IL-2, INF-γ, TNF-α, IL-4, IL-10, TGF-β e IL-17 nas amostras de sangue e de colostro (Figura 2).

DISCUSSÃO

A obesidade é caracterizada por um estado de inflamação crônica de baixo grau com produção anormal de citocinas e ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias (LANG & RATKE, 2009) que exercem papel central na patogênese de diversas doenças crônicas

associadas à obesidade (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al. 2013). Estudos tem mostrado consistentes associações entre a obesidade materna e morbidade perinatal (LU et al. 2001) e riscos a longo prazo para a saúde do neonato (O´REILY & REYNOLDS, 2013). A obesidade na gestação também induz inflamação e alterações metabólicas e imunológicas que podem ser a causa das múltiplas complicações verificadas nessas gestações (SCHMATZ et al. 2010). No presente estudo foram descritos o perfil de citocinas no colostro e sangue materno de mulheres com excesso massa corporal, bem como a correlação destas citocinas no colostro e sangue.

No sobrepeso e na obesidade há controvérsias em relação ao balanço entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Enquanto alguns autores relatam um desvio para a produção de citocinas pró-inflamatórias (WINER et al. 2009; ROCHA et al. 2008; SVEC et al. 2007), outros relatam aumento de citocinas anti-inflamatórias (VAN DER WEERD et al. 2012; CIPRANDI et al. 2011; HERSOUG & LINNEBERG, 2007). Durante a gestação, os linfócitos do sangue periférico materno secretam mais citocinas Th2 (como IL-4, IL-6, IL-10) e menos citocinas Th1, caracterizada pela produção de citocinas como IL-2, IFN-γ e TNF-α, em relação a mulheres não gestantes. O sucesso da gestação está associado com o predomínio do perfil Th2 (DAHER et al. 2004; WEGMANN et al. 1993), enquanto a dominância do perfil Th1 tem sido associada com pré-eclampsia e abortos (SAITO et al. 1999; SAITO & SAKAI, 2003).

As gestações complicadas pela obesidade ou diabetes mellitus levam a contínuos estímulos adversos que estão associados com disregulações metabólicas, vasculares e de vias inflamatórias (HAUQUEL DE-MOUZON & GUERRE-MILLO, 2006). No presente trabalho o sobrepeso e a obesidade materna não influenciaram os níveis de IL-2, IL4, IL-10, IL-17 e IFN-γ presentes no colostro e sangue materno. Por outro lado, foram verificadas elevações nos níveis de IL-6 e TNF-α no sangue materno de mães obesas, enquanto que no colostro houve redução na concentração de TGF-β. Interessante notar que a IL-6 materna apresentou correlação positiva com o colostro, mas o mesmo não foi observado para TNF-α e TGF-β.

A literatura relata que a IL-6 é crítica no início da gestação, no período peri-conceptual, atuando na implantação do blastocisto. No presente estudo foram encontrados níveis elevados desta citocina no sangue materno de mães com obesidade. A IL-6 tem sido mais frequentemente classificada como uma citocina anti-inflamatória do perfil Th2, representando um importante ambiente anti-inflammatório na interface materno-fetal, uma vez que esta citocina desempenha papel fundamental na manutenção da gestação com efeitos benéficos à unidade feto-placentária, inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (CONTI et al. 2003). Porém esta classificação

entre os subtipos Th1 e Th2 permanece controversa para esta citocina, e alguns autores a analisam como pró-inflamatória. Os achados recentes sugerem o envolvimento de ações pró-inflamatórias da IL-6 em todos os tipos de aborto espontâneos avaliados no estudo (DROZDZIK et al. 2013). Outros autores também relatam o envolvimento do papel inflamatório da IL-6 no nascimento pré-termo (STALLMACH et al. 1995), pré-eclampsia (TAYLOR et al. 2015), e em associação com outras citocinas pró-inflamatórias com diabetes gestacional (FAGUNDES et al. 2016).

Os resultados deste estudo mostraram uma maior concentração de IL-6 no colostro em relação ao sangue materno. O colostro é uma importante fonte desta citocina para o lactente, uma vez que já foi mostrado que esta secreção apresenta níveis mais elevados de IL-6 quando comparado ao sangue de cordão de neonatos saudáveis (MILLER et al. 1990). Além disso, os monócitos do sangue de recém-nascidos são menos efetivos que os monócitos de adultos na produção de IL-6 em resposta a IL-1α (SCHIBLER et al. 1992). A IL-6 está fortemente associada com a produção local de IgA pela glândula mamaria (SAITO et al. 1991) Elevados níveis de IL-6 no colostro humano tem sido associados com menor peso relativo, ganho de peso, percentual de gordura e de massa magra nos lactentes, enquanto altos níveis de TNF-α está associado com menor massa magra. Esses resultados sugerem que essas citocinas pró-inflamatórias, juntamente com as adipocinas reguladoras do apetite podem exercer um importante papel no ganho de gordura e massa corporal (FIELDS & DEMERATH, 2012).

Neste estudo, verificou-se uma maior concentração de TNF-α no sangue de mães com sobrepeso e obesidade. Diversos estudos tem investigado a resposta inflamatória e a produção de citocinas de gestantes obesas. A relação entre obesidade e inflamação que tem sido hipotetizada é de que a inflamação pode também implicar na pato-fisiologia de doenças. Alguns autores relataram níveis elevados de TNF-α em mães obesas (AYE et al. 2014; WINKLER et al. 2002). Bugatto et al. 2010 verificaram níveis de TNF-α elevados no liquido amniótico de gestantes obesas, e esta citocina apresentou correlação positiva com o BMI materno, sugerindo exposição do feto a elevados níveis desta citocina pró-inflamatória (BUGATTO et al. 2010).

O TNF-α também é um importante imunomodulador encontrado em quantidades subtanciais no leite materno durante a fase inicial de lactação, e é provavelmente secretado pelos macrófagos do leite (RUDLOFF et a. 1992), assim como pelo tecido epitelial (BASOLO et al. 1991). Existem evidências de que receptores solúveis de TNF-α no colostro se ligam a rTNF-α e podem neutralizar a sua bioatividade, e por conseguinte, podem contribuir para o caráter anti-inflamatório do colostro e leite humano (BUESCHERr & MCWILLIAMS-KOEPPEN, 1998).

O colostro de mães obesas apresentou menor concentração de TGF-β. A amamentação não confere apenas imunidade passiva mas também estimula o desenvolvimento do sistema imune e das respostas inflamatórias do recém-nascido, o TGF-β tem um importante papel nesse processo ao regular a produção de IgA e a indução da tolerância oral (BOTTCHER et al. 2008; STROBEL, 2002). O leite materno é uma fonte rica dessa citocina que possui fundamental importância para o recém-nascido uma vez que a produção endógena de TGF-β é escassa nos primeiros dias de vida e aumentam gradualmente com o tempo. Diversos estudos tem mostrado associação de elevados níveis de TGF-β no leite humano na prevenção de doenças alérgicas durante a infância (KALLIOMAKI et al. 1999). A literatura relata que as variações nos níveis de TGF-β no leite humano não se relacionam com os níveis plasmáticos (HAWKES, BRYAN & GIBSON, 2002), o que corrobora com os resultados do presente estudo uma vez que a diminuição nos níveis desta citocina no colostro não foram precursionadas por reduções no soro materno.

Esses achados sugerem que o estado nutricional materno pode modificar o perfil do colostro e sangue materno, o que corrobora com a hipótese de que a obesidade altera o papel das citocinas na resposta imune sistêmica e de mucosas, e consequentemente, com os efeitos protetores oriundos do leite materno que parecem ser mantidos além do período de amamentação.

REFERÊNCIAS

Austgulen R, Lien E, Liabakk NB, Jacobsen G, Arntzen KJ. Increased lev.;:els of cytokines and cytokine activity modifiers in normal pregnancy. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 1999; 57:149–155.

Avcı ME, Sanlıkan F, Celik M, Avcı A, Kocaer M, Göçmen A. Effects of Maternal Obesity on Antenatal, Perinatal, and Neonatal Outcomes. J Matern Fetal Neonatal Med. 2014; 20:1-13.

Aye IL, Lager S, Ramirez VI, Gaccioli F, Dudley DJ, Jansson T, Powell TL. Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. Biol Reprod. 2014; 90:129.

Basolo F, Elliott J, Tait L, Chen XQ, Maloney T, Russo IH, Pauley R, Momiki S, Caamano J, Klein-Szanto AJ. Transformation of human breast epithelial cells by c-Ha-ras oncogene. Mol Carcinog. 1991;4(1):25-35.

Bottcher MF, Abrahamsson TR, Fredriksson M, Jakobsson T, Bjorksten B. Low breast milk TGF- beta2 is induced by Lactobacillus reuteri supplementation and associates with reduced risk of sensitization during infancy. Pediatr Allergy Immunol. 2008; 19:497-504.

Buescher E, McWilliams-Koeppen P. Soluble tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in human colostrum and milk bind to TNF-alpha and neutralize TNF-alpha bioactivity. Pediatr Res. 1998 Jul;44(1):37-42.

Bugatto F, Fernández-Deudero A, Bailén A, Fernández-Macías R, Hervías-Vivancos B, Bartha JL. Second-trimester amniotic fluid proinflammatory cytokine levels in normal and overweight women. Obstet Gynecol. 2010; 115:127-33.

Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, Hauguel-de Mouzon S. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. Placenta. 2008; 29:274-281.

Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, MD, Strauss JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. 2009; Reprod Sci 16, 206–215.

Chantry CJ, Howard CR, Auinger P. Full breastfeeding duration and associated decrease in respira- tory tract infection in US children. 2006; Pediatrics 117, 425–432.

Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? Semin Immunopathol. 2007; 29: 95-113.

Ciprandi G, Filaci G, Negrini S, De Amici M, Fenoglio D, Marseglia G: Serum leptin levels in patients with pollen-induced allergic rhi- nitis. Int Arch Allergy Immunol 2009;148: 211–218.

Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Di Gioacchino M, Barbacane RC, Castellani ML, , Felaco M, Boucher W, Letourneau R, Theoharides TC. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. Immunol Lett 2003;86(2)123-129.

Daher S, de Arruda Geraldes Denardi K, Blotta MH, Mamoni RL, Reck AP, Camano L, Mattar R: Cytokines in recurrent pregnancy loss. J Reprod Immunol 2004; 62:151–157.

Das UN. Is obesity an inflammatory condition? Nutrition. 2001; 17:953-966.

Denney JM, Nelson EL, Wadhwa PD, Waters TP, Mathew L, Chung EK, Goldenberg RL, Culhane JF. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. Cytokine. 2011; 53:170-177.

Drozdzik M, Szlarb N, Kurzawski M. Interleukin-6 level and gene polymorphism in spontaneous miscarriage. Tissue Antigens. 2013 Sep;82(3):171-6.

Ehlers S, Smith KA. Differentiation of T cell lymphokine gene expression: the in vitro acquisition of T cell memory. J Exp Med. 1991;173(1):25-36.

Fagundes DLG, França EL, da Silva Fernandes RT, Hara Cde C, Morceli G, Honorio-França AC, Calderon IM. Changes in T-cell phenotype and cytokines profile in maternal blood, cord blood and colostrum of diabetic mothers. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016 Mar;29(6):998-1004.

Falagas ME, Kompoti M. Obesity and infection. Lancet Infect Dis. 2006; 6:438-446.

Fields DA, Demerath EW. Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF-α in human breast milk with infant growth and body composition. Pediatr Obes. 2012; 7:304-312.

França EL, Bitencourt RV, Fujimori M, Morais TC, Calderon IMP, Honorio-França AC: Human colostral phagocytes eliminate enterotoxigenic Eschechia coli opsonized by colostrum supernatant. J. Microbiol Immunol Infec 2011, 44:1-7.

Garofalo RP, Goldman AS. Expression of functional immunomodulatory and anti-inflammatory factors in human milk. Clin Perinatol. 1999;26(2):361–377.

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

Guilbert, L., Robertson, S.A. and Wegmann, T.G. The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network. Immunol. Cell Biol. 1993; 71:49–57.

Hanson LA. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. Ann Allergy Asthma Immunol. 1998;81(6):523-33; quiz 533-4, 537.

Hanson LA. Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function. Proc Nutr Soc. 2007;66(3):384-96.

Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M. The placenta cytokine network and inflammatory signals. Placenta. 2006;27(8):794-8.

Hawkes JS1, Bryan DL, Gibson RA. Variations in transforming growth factor beta in human milk are not related to levels in plasma. Cytokine. 2002 Feb 21;17(4):182-6.

Hersoug LG, Linneberg A. The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: does obesity induce decreased immune tolerance? 2007; Allergy;62:1205-13.

Kalliomaki M, Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. J Allergy Clin Immunol. 1999; 104:1251-1257.

Khan NA, Yessoufou A, Kim M, Hichami A. N-3 fatty acids modulate Th1 and Th2 dichotomy in diabetic pregnancy and macrosomia. J Autoimmunity. 2006; 26:268-277.

Kverka M, Burianova J, Lodinova-Zadnikova R, Kocourkova I, Cinova J, Tuckova L, Tlaskalova-Hogenova H: Cytokine Profiling in Human Colostrum and Milk by Protein Array. Clin Chem 2007, 53:955-962.

Lang K. Ratke J. Leptin and adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. Cell Commun Signal 2009; 23:7–27.

Lu GC, Rouse DJ, DuBard M, Cliver S, Kimberlin D, Hauth JC. The effect of the increasing prevalence of maternal obesity on perinatal morbidity. Am J Obstet Gynecol. 2001;185(4):845-9.

Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, Flachs P, Kopecky J. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. Biochim Biophys Acta. 2014; 1981:209-211.

Meki A-R MA, Saleem TA, Al-Ghazali MH, Sayed AA. Interleukins-6, -8 and -10 and tumor necrosis factor-alpha and it soluble receptor I in human milk at different periods of lactation. Nutrition Research. 2003;23:845–855.

Miller, L.C., lsa, S., LoPreste, G., Schaller, J.G. and Dinarello, C.A. Neonatal interleukin-13, interleukin-6, and tumor necrosis factor: Cord blood levels and cellular production. 1990; J. Pediatr. 117, 961-965.

Milner JJ, Beck MA. Micronutrients, immunology and inflammation The impact of obesity on the immune response to infection. Proc Nutr Soc. 2012; 14:1-9.

Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica nº. 23. Saúde da Criança: Nutrição Infantil. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

Nguyen TV, Yuan L, Azevedo SP, Jeong K, Gonzalez AM, Saif LJ. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: In vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. Vet Immunol Immunopathol. 2007; 117:236-48.

O'Reilly JR, Reynolds RM. The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. Clin Endocrinol (Oxf). 2013;78(1):9-16.

Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. Immunology. 2009; 129:147–153.

Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. Immunol Today. 2000; 21:479-83.

Rocha, V.Z., Folco, E.J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A.H., Libby, P. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. Circ Res. 2008; 103:467–476.

Rodríguez-Hernández H, Simental-Mendía LE, Rodríguez-Ramírez G, Reyes-Romero MA. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. Int J Endocrinol. 2013; 2013:678159.

Rudloff HE1, Schmalstieg FC Jr, Mushtaha AA, Palkowetz KH, Liu SK, Goldman AS. Tumor necrosis factor-alpha in human milk. Pediatr Res. 1992 Jan;31(1):29-33.

Saito S, Maruyama M, Kato Y, Moriyama I, Ichijo M. Detection of IL-6 in human milk and its involvement in IgA production. J Reprod Immunol. 1991; 20:267-276.

Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M: Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2010; 63:601–610.

Schibler, K.R., Liechty, K.W., White, W.L., Rothstien, G. and Christensen, R.D. Defective production of interleukin-6 by monocytes: a possible mechanism underlying several host defense deficien- cies of neonates.1992; Pediatr. Res. 31, 18-21.

Schmatz M, Madan J, Marino T, Davis J: Maternal obesity: the interplay between inflammation, mother and fetus. J Perinatol. 2010, 30: 441-446.

Stallmach T, Hebisch G, Joller-Jemelka HI, Orban P, Schwaller J, Engelmann M. Cytokine production and visualized effects in the feto-maternal unit. Quantitative and topographic data on cytokines during intrauterine disease. Lab Invest. 1995 Sep;73(3):384-92.

Strobel S. Oral tolerance, systemic immunoregulation, and autoimmunity. Ann N Y Acad Sci. 2002; 958:47-58.

Svec P, Vásárhelyi B, Pászthy B, Körner A, Kovács L, Tulassay T, Treszl A. Do regulatory T cells contribute to Th1 skewness in obesity? Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2007 Jul;115(7):439-43.

Taylor BD, Tang G, Ness RB, Olsen J, Hougaard DM, Skogstrand K, Roberts JM, Haggerty C. Elevated serum inflammatory markers and preeclampsia: Results from a large national cohort study. Pregnancy Hypertens. 2015 Jan;5(1):90.

van der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, Schweitzer DH, Langerak AW, Drexhage HA, Kiewiet RM, van Aken MO, van Huisstede A, van Dongen JJ, van der Lelij AJ, Staal FJ, van Hagen PM. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4? T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. 2012; Diabetes 61, 401–408.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol Today. 1993; 14:353-6.

Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev. 2001; 182:207-14.

Winer S, Paltser G, Chan Y, Tsui H, Engleman E, Winer D, Dosch HM. Obesity predisposes to Th17 bias. Eur J Immunol. 2009; 39:2629-2635.

WHO. World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of athropometry. World Health Organization technical report series 854, Geneva, Switzerland: World Health Organization. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 1995; 854:1-452.

Winkler G, Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Speer G, Hajós P, Salamon F, Turi Z, Kovács M, Vargha P, Karádi I. Tumor necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2002; 56:93-99.

Tabela 1. Características clínicas das mães do estudo de acordo com o status do IMC pré-gestacional (eutrófico, sobrepeso e obesidade).

Variáveis	Eutrófico (n=15)	Sobrepeso (n=15)	Obesidade (n=15)
Mães			
Idade (anos)	25.8 ± 6.1	24.20 ± 6.3	29.40 ± 5.9
Altura antes da gestação (cm)	162.6 ± 0.6	161.6 ± 0.5	160.6 ± 0.8
Peso antes da gestação (kg)	58.5 ± 6.0	71.46 ± 4.1	87.09 ± 11.1
IMC pré-gestacional (kg/m^2)	22.1 ± 1.8	27.4 ± 1.3	34.4 ± 4.9
Ganho de peso durante a gestação(kg)	13.1 ± 4.6	10.6 ± 4.9	12.8 ± 7.8
Tipo de parto (% vaginal)*	11/15 (73.3%)	8/15 (53.3%)	7/15 (46.6%)
Duração da gestação (wk)[#]	39.0 ± 2.0	39.6 ± 1.1	40.1 ± 1.0
Primipara (%) *	8/15 (53.3%)	7/15 (46.6%)	5/15 (33.3%)
Níveis glicêmicos	76.1 ± 7.6	75.7 ± 8.2	79.1 ± 8.3
Recém-nascido			
Gênero (% feminino) *	8/15 (53.3%)	6/15 (40.0%)	7/15 (46.%)
Peso (kg)	3.3 ± 0.5	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.5
Comprimento (cm)	48.3 ± 2.2	49.2 ± 1.8	48.7 ± 1.9

Os dados do binônio mãe-filho foram apresentados em média e DP.
[#] Mediana
* Porcentagem (%).

Tabela 2. Concentração de citocinas (pg/ml) no colostro e sangue materno dos grupos eutrófico, sobrepeso e obesidade.

Perfil Citocina	Citocina	Amostras	Concentração (pg/ml)		
			Eutrófico	Sobrepeso	Obesidade
Th1	IL-2	Colostro	3.35±1.25	1.59±0.23	1.65±0.14
		Sangue Materno	1.97±0.71	2.0±0.35	2.05±0.25
	TNF-α	Colostro	10.58±1.77#	11.67±2.1#	12.91±2.44#
		Sangue Materno	5.49±0.70	5.86±0.64	8.63±0.61*
	IFN-γ	Colostro	6.98±1.08#	6.83±0.81#	7.87±0.89#
		Sangue Materno	3.68±0.3	4.41±0.63	4.68±0.65
Th2	IL-4	Colostro	8.92±2.59#	11.44±5.03#	9.36±3.33#
		Sangue Materno	1.84±0.21	2.42±0.41	2.61±0.20
	IL-6	Colostro	34.73±7.68#	38.20±7.07#	44.04±10.28#
		Sangue Materno	1.73±0.18	2.87±0.67	4.03±0.76*
	IL-10	Colostro	8.52±1.40	7.56±1.83	8.08±1.31
		Sangue Materno	4.27±0.743	4.03±0.69	4.09±0.72
Th3	TGF-β	Colostro	1,937.77±187.51#	1,355.55±231.15#	1,043.11±238.72*#
		Sangue Materno	2,2044.84±831.05	2,028.69±960.56	2,157.76±2,551.39
Th17	IL-17	Colostro	33.79±5.32	31.70±4.98	40.93±4.74
		Sangue Materno	23.79±3.52	32.87±5.96	34.79±5.03

Os resultados foram representados em média e DP da concentração de citocinas do sangue e colostro materno.
* Indica variação intergrupo entre cada amostra, e #indica diferenças entre as amostras (sangue e colostro) considerando a mesma citocina.

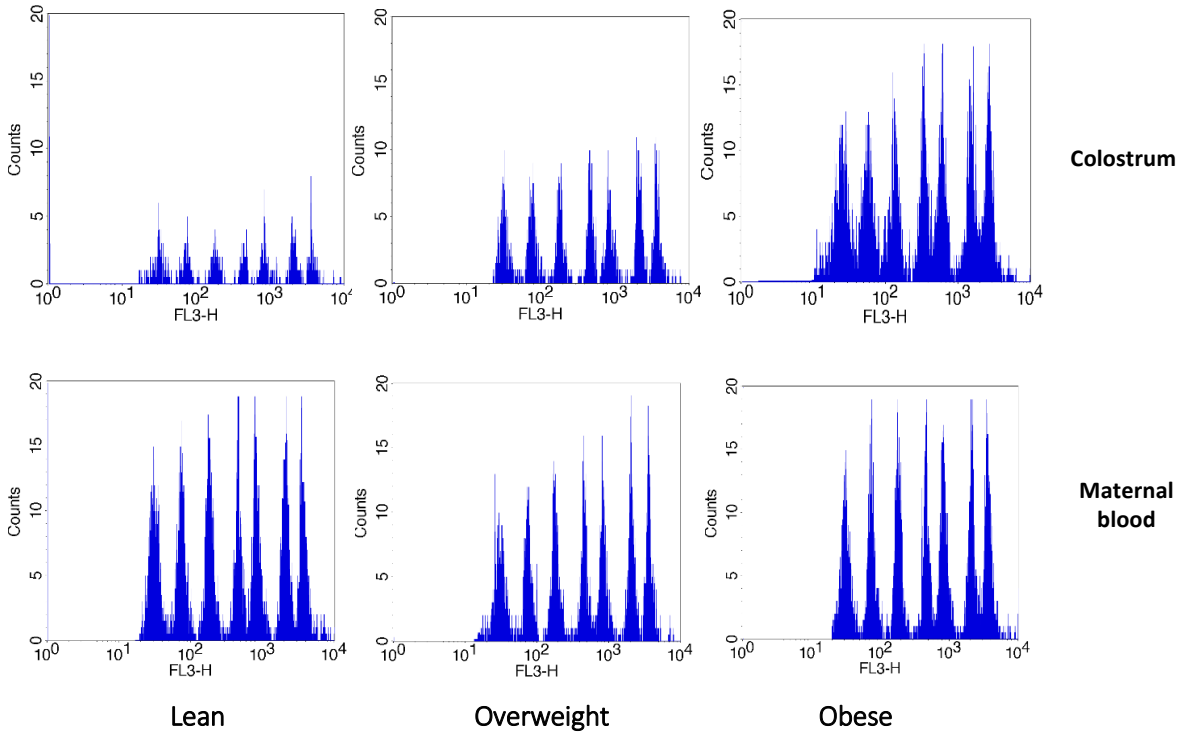


Figure 1. Fluorescence intensity of cytokines concentrations from lean, overweight and obese mothe Fluorescence analyses were carried out by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, EUA). T sequence of figures left to right represents the fluorescence intensity of IL2, IL4,IL6, IL10, TNF-α, IFN-γ a IL17 respectively.

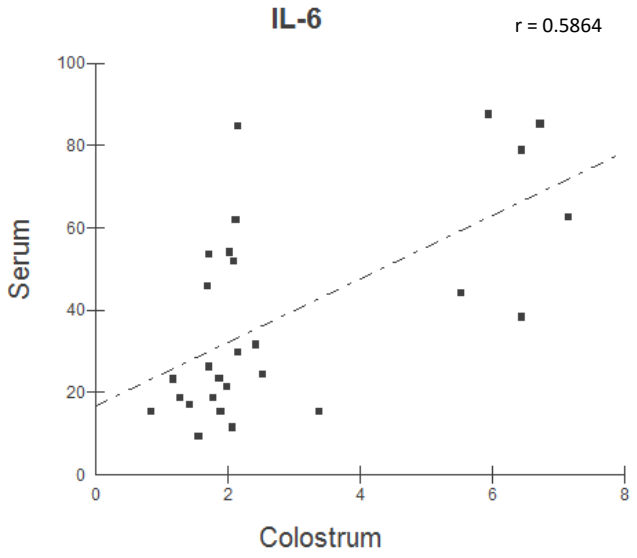


Figure 2. Correlação das concentrações IL-6 entre as amostras de sangue e colostro.

5. CONCLUSÕES

- ✓ O colostro de mães obesas apresentou maiores concentrações de IgA, maior teor de gordura e calorias e aumento nos níveis de glicose. O sangue materno de mães obesas possui níveis mais elevados de IgA, de proteínas do complemento C3 e C4, de colesterol, triglicérides e PCR.
- ✓ As mães obesas apresentaram os maiores níveis séricos de IL-6 e TNF-α e as menores concentrações de TGF-β no colostro. Não foram detectadas significantes variações entre os grupos estudados nas concentrações das citocinas IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 tanto no sangue materno como no colostro.
- ✓ As concentrações de leptina e adiponectina foram maiores no colostro de mães obesas. O sangue de mães obesas apresentou as concentrações mais elevadas de leptina, porém as menores de adiponectina. As concentrações de leptina em ambas as amostras mostraram estar positivamente correlacionadas. Os níveis séricos de leptina de correlacionam positivamente com a citocina IL-6 e PCR, enquanto as concentrações de adiponectina se correlacionam negativamente com TNF-α e PCR.

Os achados do presente estudo apoiam a hipótese de que alterações metabólicas oriundas da obesidade da gestante podem interferir nos parâmetros bioquímicos, imunológicos e hormonais do sangue e do colostro materno ocasionando repercussões tanto para os efeitos imunomodulatórios quanto para características nutricionais do leite materno, essenciais para o desenvolvimento do recém-nascido.

6. REFERÊNCIAS

Abdulla EM, Zaidi FE, Zaidi A. Immune factors in breast milk: a study and review. Pak J Med Sci 2005;21:178-86.

Adkins B. T cells function in newborn mice and humans. Immunol Today.1999; 20:330-5.

Agarwal R, Loganath A, Roy AC, Wong YC, Ng SC. Effect of T-helper 1 cytokines on secretion of T-helper 2 cytokines by term trophoblast cells in culture. Gynecol Endocrinol, 2000; 14:305-10.

Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M, Taams LS et al. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. Nat Rev Immunol. 2007;7:231–7.

Arendas K, Qiu Q, Gruslin A. Obesity in pregnancy: pre- conceptional to postpartum consequences. J Obstet Gynaecol Can 2008;30:477–88.

Armitage P, Berry G. The planning os statistical investigations. In: Statistical methods in medical research. 2.ed. Oxford, Blackwell, 1987;179-85.

Austgulen R, Lien E, Liabakk NB et al. (1994) Increased levels of cytokines and cytokine activity modifiers in normal pregnancy. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 57, 149–55.

Aye IL, Lager S, Ramirez VI et al. Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. Biol Reprod. 2014; 90(6):129.

Brasil. Ministério da Saúde. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.

Bronsky J, Karpisek M, Bronska E, Pechova M, Jancikova B, Kotolova H, Stejskal D, Prusa R, Nevoral J. Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid

binding protein: proteins newly identified in human breast milk. Clin Chem. 2006;52 (9):1763-70.

Bugatto F, Fernández-Deudero A, Bailén A et al. Second-trimester amniotic fluid proinflammatory cytokine levels in normal and overweight women. Obstet Gynecol. 2010;115(1):127-33.

Carneiro-Sampaio MMS. O desenvolvimento da resposta imune da criança. In: Carneiro-Sampaio MMS & Grumach AS. Alergia e Imunopatologia em Pediatria. São Paulo, Sarvier, 1992;15-27.

Çatl G, Olgaç Dündar N, Dündar BN. Adipokines in breast milk: an update. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2014;6(4):192-201.

Challier JC, Basu S, Bintein T et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. Placenta. 2008; 29:274-81.

Chantry CJ, Howard CR, Auinger P. Full breastfeeding duration and associated decrease in respiratory tract infection in US children. Pediatrics. 2006;117:425-32.

Chaouat G, Lédée-Bataille N, Zourbas S et al. Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1／Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. Am J Reprod Immunol. 2003;50:177–186.

Chen J, Liu XS. Development and function of IL-10 IFN-γ-secreting CD4+ T cells. J Leukoc Biol.2009; 86:1-5.

Ciprandi G, Caimmi D, Raschetti R et al. Adipokines and their role in allergies. Int J Immunopathol Pharmacol. 2011 Oct;24(4 Suppl):13-6.

Clark DA, Arck PC, Chaout G. Why did your mother reject you? Immunegenetics determinants of the response environmental selective pressure expressed at the uterine level. Am J Reprod Immuno.1999; 41:5-22.

Coughlan MT, Oliva K, Georgiou HM, Permezel JM, Rice GE. Glucose-induced release of tumour necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. Diabet Med. 2001; 18:921-7.

Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. Clin Exp Immunol.2010;159:109–1.

D'Addio F, Riella LV, Mfarrej BG et al. The link between the PDL1 costimulatory pathway and Th17 in fetomaternal tolerance. J Immunol 2011; 187:4530–41.

Dahlgern UI, Hanson LA, Telemo E. Maturation of immunocompetencein breast feed vs formula-fed infants. Adv Nutr Res. 2001;10:311-25.

Denison FC, Roberts KA, Barr SM et al. Obesity, pregnancy, inflammation and vascular function. Reproduction. 2010; 140: 373-85.

Denney JM, Nelson EL, Wadhwa PD et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. Cytokine.2011;53:170-7.

Dewey KG. Is breastfeeding protective against child obesity? J Hum Lact. 2003;19:9-18.

Eilers E, Ziska T, Harder T, Plagemann A, Obladen M, Loui A. Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants. Early Hum Dev. 2011;87(6):415-9.

Fagundes DLG, França EL, Fernandes RTS, Hara CCP, Morceli G, Honorio-França AC, Calderon IMP. Changes in T cell phenotype and cytokines profile in maternal blood, cord blood and colostrum of diabetic mothers. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016 Mar, 29(6):998-1004.

Falagas ME, Kompoti M. Obesity and infection. Lancet Infect Dis. 2006;6:438-46.

Farah N, Hogan AE, O'Connor N et al. Correlation between maternal inflammatory markers and fetomaternal adiposity. Cytokine. 2012; 60(1):96-9.

Faucett AM, Metz TD, DeWitt PE, Gibbs RS. Effect of obesity on neonatal outcomes in pregnancies with preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol. 2016; 214(2):287.e1-5. [Epub ahead of print]

Forsthuberl T, Yip HC, Lehmann PV. Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. Science. 1996; 217:1728-30.

França EL, Nicomedes TR, Calderon IMP, Honorio-França AC. Time-dependent alterations of soluble and cellular components in human milk, Biol Rhythm Res. 2010; 41:333-47.

França EL, Bitencourt RV, Fujimori M, Morais TC, Calderon IMP, Honorio-França AC. Human colostral phagocytes eliminate enterotoxigenic Eschechia coli opsonized by colostrum supernatant. J. Microbiol Immunol Infec, 2011; 44:1-7.

França-Botelho Ac; Honorio-França Ac.; França El; Gomes Ma; Costa-Cruz, JM. Phagocytosis of Giardia lamblia trophozoites by human colostral leukocytes. Acta Paediatr. 2006; 95, (4)438 – 43,.

Friel JK, Tsopmo A, Diehl-Jones B et al. Antioxidant Properties of Human Milk Fractions. FASEB J. 2008;22:446.

Frisancho AR. Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status. Ann Arbor, Michigan: Univesity of Michigan Press; 1990.

Jutel M, Akdis M, Budak F et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. Eur J Immunol. 2003;33(5):1205-14.

Garofalo R. Cytokines in human milk. J Pediatr. 2010;156:S36-40.

Goldblum, R.M. & Goldman, A.S. Immunological components of milk: formation and function. In: Ogra, P.L.; Lamm M.E.; Mcghee J.R.; Mestecky, J.; Strober, W.; Bienenstock, J. Handbook Mucosal Immunol. New York, Academic Press, 1994.

Goldman, A.S. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. Pediatr Infect Dis J, 1993; 12: 664-74.

Guelinckx I, Devlieger R, Beckers K et al. Maternal obesity: pregnancy complication, gestational weight gain and nutrition. Obes Rev 2008; 9: 140 – 150.

Guilbert L, Robertson SA, Wegmann TG. The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network. Immunol. Cell, Biol. 1993; 71, 49–57.

Håberg SE, Stigum H, London SJ et al. Maternal obesity in pregnancy and respiratory health in early childhood. Paediatr Perinat Epidemiol. 2009;23(4):352-62.

Hanson LA. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. Ann Allergy Asthma Immunol. 1998;81(6):523-3.

Hanson LA. Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function. Proc Nutr Soc. 2007;66(3):384-96.

Hersoug LG, Linneberg A. The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: does obesity induce decreased immune tolerance? Allergy. 2007;62:1205–13.

Honorio-França AC, Launay P, Carneiro-Sampaio MMS, Monteiro RC. Colostral neutrophils express IgA Fc receptors (CD89) lacking y chain association that mediate non-inflammatory properties of secretory IgA. J Leuk Biol, 2001; 69, 2, 289-96

Honorio-França AC, Carvalho MPSM, Isaac L, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MMS. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill Enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. Scand J Immunol, 1997; 46: 59-66.

Ilcol YO, Hizli ZB, Ozkan T. Leptin concentration in breast milk and its relationship to duration of lactation and hormonal status.Int Breastfeed J. 2006;17;1:21.

Isaacs CE. Human milk inactivates pathogens individually, additively, and synergistically. J Nutr. 2005;135:1286–8.

Islam N, Ahmed L, Khan NI et al. Immune components (IgA, IgM, IgG immune cells) of colostrums of Bangladeshi mothers. Pediatr Int 2006;48:543-8.

IOM. Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines; Rasmussen KM, Yaktine AL, editors. Weight gain during pregnancy: reexamining the guidelines. Washington, DC: National Academies Press; 2009.

Kabiru W, Raynor BD. Obstetric outcomes associated with increase in BMI category during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2004; 191: 928–32.

Kang K, Reilly SM, Karabacak V et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. Cell Metab. 2008;7(6):485-95.

Kelly DA. The use of anti-interleukin-2 receptor antibodies in pediatric liver transplantation. Pediatr Transplant. 2001;5:386-9.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:2548-56.

Khan NA, Yessoufou A, Kim M, Hichami A. N-3 fatty acids modulate Th1 and Th2 dichotomy in diabetic pregnancy and macrosomia. J Autoimmunity.2006; 26: 268-77.

Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin-the classical, resisten- the controversial, andiponectin-the promising, and more to come. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2005;19, 525-46.

Koumandakis E et al. Enhanced phagocytosis of mononuclear phagocytes in pregnancy. Br. J. Obstet. Gynaecol. 1986; 96, 1150-4.

Kverka M, Burianova J, Lodinova-Zadnikova R et al. Cytokine Profiling in Human Colostrum and Milk by Protein Array. Clin Chem 2007;53:955-62.

Linné Y. Effects of obesity on women's reproduction and complications during pregnancy. Obesity Rev 2004;5:137-43.

Lonnerdal B. Breast milk: a truly functional food. Nutrition 2000;16:509-11.

Madan JC, Davis JM, Craig WY et al. Maternal obesity and markers of inflammation in pregnancy. Cytokine. 2009; 47(1):61-4.

Mafra D, Farage NE. O papel do tecido adiposo na doença renal crônica. J Bras Nefrol 2006;28:108-13.

Mansour D. Implications of the growing obesity epidemic on contraception and reproductive health. J Fam Plann Reprod Health Care. 2004;30:209-11.

Martí A, Marcos A, Martínez JA. Obesity and immune function relationships. Obes Rev. 2001;2:131-40.

Martin LJ, Woo JG, Geraghty SR et al. Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. Am J Clin Nutr. 2006;83:1106-11.

Melczer Z, Banhidy F, Csomor S et al. Influence of leptin and the TNF system on insulin resistance in pregnancy and their effect on anthropometric parameters of newborns. Acta Obstet.Gynecol.Scand. 2003; 82:432 – 38.

Morceli G, França EL, Magalhães VB, Damasceno DC, Calderon IMP, Honorio França AC. Diabetes induced immunological and biochemical changes in human colostrum. Acta Paediatr, 100: 550-6, 2011.

National Audit Office. Tackling obesity in England. London: The Stationery Office, 2001.

Neumeier M, Weigert J, Schäffler A et al. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. J Leukoc Biol. 2006;79:803-8.

Newburg DS. Innate immunity and human milk. J Nutr 2005;135:1308-12.

Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 2014; 384(9945):766-81.

Nguyen TV, Yuan L, Azevedo SP et al. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: In vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. Vet Immunol Immunopathol.2007; 117:236-48.

Nucci LB, Schmidt MI, Duncan BB et al. Nutritional status of pregnant women: prevalence and associated pregnancy outcomes. Rev Saúde Pública. 2001; 35: 502-7.

Pacifico L, Di Renzo L, Anania C et al. Increased T-helper interferon-gamma-secreting cells in obese children. Eur J Endocrinol 2006; 154: 691–697.

Parsons EC, Patel K, Tran BT et al. Maternal pre-gravid obesity and early childhood respiratory hospitalization: a population-based case-control study. Matern Child Health J. 2013;17(6):1095-102.

Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. Immunology.2009; 129:147–53.

Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol.2007; 57:177-85.

Piccinni MP, Beloni L, Livi C et al. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. Nat Med.1998; 4:1020–4.

Poston L, Harthoorn LF, der Beek: ILSI Europe Workshop: Obesity in pregnancy: Implications for the mother and lifelong health of the child. A consensus statement. Ped Research 2011, 69(2):175–178.

Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. Immunol Today.1997;18:478–82.

Ramsay JE, Ferrell WR,Crawford L et al. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87: 4231-7.

Reinhardt RL, Kang SJ, Liang HE et al. T helper cell effector fates. Who, how and where? Curr Opin Immunol.2006;18:271-277.

Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. Immunol Today.2000; 21: 479-83.

Retnakaran R, Hanley AJ, Raif N et al. C-reactive protein and gestational diabetes: the central role of maternal obesity. J Clin Endocrinol Metab 2003;8(8):3505–6.

Roberts KA, Riley SC, Reynolds RM, Barr S et al. Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. Placenta. 2011; 32:247-54.

Rocha VZ, Folco EJ, Sukhova G, et al. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. Circ Res. 2008; 103:467–76.

Romero R, Gotsch F, Pineles B at el. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. Nutr Rev. 2007;65(12 Pt 2):S194-202.

Rüdiger A, Kuczera F, Köhler H, Schroten H. Superoxide anion generation in human milk macrophages: opsonin-dependent versus opsonin-independent stimulation compared with blood monocytes. Pediatr Res. 2001;49:435–9

Sacks GP, Studena K, Sargent K at al. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. Am J Obstet Gynecol 1998;179:80-6.

Saito S, Sakai M. Th1／Th2 balance in preeclampsia. J Reprod Immunol.2003; 59:161–73.

Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-Cell paradigm in pregnancy. Am J Reprod Immunol.2010; 63:601-10.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol.2005; 6:345–52.

Savino F, Liguori SA, Petrucci E et al. Evaluation of leptin in breast milk, lactating mothers and their infants. Eur J Clin Nutr. 2010;64:972-7.

Shibuya T, Izuchi K, Kuroiwa A et al. Study on nonspecific immunity in pregnant women: increased chemiluminescence response of peripheral blood phagocytes. Am J Reprod Immunol Microbiol. 1987; Sep: 15(1):19-23.

Smith CW, Goldman AS. The cells of human colostrum. I. In vitro studies of morphology and functions. Pediatr Res. 1968;2:103-9.

Smith KB, Smith MS. Obesity Statistics. Prim Care. 2016 Mar;43(1):121-35.

Steven-simon C, Roghmann K.J, Mcanarney, E.R. Relationship of self-reported prepregnant weight gain during pregnancy to maternal body habits and age. Journal of the American Dietetic Association. 1992;92:85-7.

Stewart FM, Freeman DJ, Ramsay JE et al. Longitudinal assessment of maternal endothelial function and markers of inflammation and placentalfunction throughout pregnancy in lean and obese mothers. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92: 969-75.

Svec P, Vásárhelyi B, Pászthy B et al. Do regulatory T cells contribute to Th1 skewness in obesity? Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2007;115:439-43.

Tenenbaum-Gavish K, Hod M. Impact of maternal obesity on fetal health. Fetal Diagn Ther. 2013;34(1):1-7.

Thornton CA, Jones RH, Doekhie A et al. Inflammation, Obesity, and Neuromodulation in Pregnancy and Fetal Development. Advances in Neuroimmune Biology. 2011; 1:193-203.

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and Immunity. Nature Publishing Group. 2006;6:772-83.

Thornton CA, Jones RH, Doekhie A et al. Inflammation, Obesity, and Neuromodulation in Pregnancy and Fetal Development. Advances in Neuroimmune Biology. 2011; 1:193-203.

Tsuda H, Dickey WD, Goldman AS. Separation of human colostral macrophages and neutrophils on gelatin and collagen-serum substrata. Cell Struct Funct 1984,8:367-71.

van der Weerd K, Dik WA, Schrijver B et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. Diabetes. 2012;61:401-8.

Wang WJ, Hao CF, Lin Y et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. J Reprod Immunol 2010; 84:164-70.

Weiner HL. Induced of mechanism of action of transforming growth factor-b secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev.2001; 182:207-14.

WHO. World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: World Health Organization; 1995.

WHO. World Health Organization. Division of Noncommunicable Diseases. Programme of Nutrition Family and Reproductive Health. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation on obesity. Geneva: WHO; 1999.

WHO. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organization technical report series, Geneva, 2000; 894:1-253.

Winer S, Chan Y, Paltser G et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. Nat Med. 2009;15:921–929.

Womack J, Tien PC, Feldman J, Shin JH, Fennie K, Anastos K, Cohen MH, Bacon MC, Minkoff H. Obesity and immune cell counts in women. Metabolism. 2007;56:998-1004.

ANEXO 1

Termo de Anuência do Hospital da Mulher Maria José dos Santos Stein

HOSPITAL DA MULHER
Maria José dos Santos Stein

DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA e TERMO DE COMPROMISSO

Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo de pesquisa intitulado *"INFLUÊNCIA DO SOBREPESO E OBESIDADE MATERNA SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E HORMONAIS NA RELAÇÃO MATERNO-INFANTIL"*.

Declaro, ainda, estar ciente da realização da pesquisa acima intitulada nas dependências do Hospital da Mulher Maria José dos Santos Stein e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.

Santo André – SP, 20 de setembro de 2012

Prof. Dr. Mauro Sancovski
Diretor Técnico

Dr. Mauro Sancovski
Médico
CRM 28286

ANEXO 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – TÍTULO DA PESQUISA: ***INFLUÊNCIA DO SOBREPESO E OBESIDADE MATERNA SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E HORMONAIS NA RELAÇÃO MATERNO-INFANTIL.***

1. Justificativa e objetivos: Prezada senhora, como já foi lhe falado, o sobrepeso e a obesidade podem ocasionar complicações que incluem a redução na resposta imune e contribuem para o aumento de infecções nestes pacientes, podendo levar a processos inflamatórios crônicos. O colostro e o leite maduro contêm uma grande variedade de fatores nutricionais e componentes imunologicamente envolvidos na proteção anti-infecciosa. É possível que os padrões imunológicos associados a alterações no metabolismo decorrentes do sobrepeso e da obesidade possam influenciar, via colostro na amamentação, o desenvolvimento do sistema imunológico do recém-nascido, e contribuir desta forma para maior susceptibilidade às infecções, observados em crianças de mães com excesso de peso. Por este motivo, será necessário a coleta de sangue materno, de cordão umbilical e colostro para a realização de exames laboratoriais para avaliarmos se o sobrepeso e a obesidade influenciam na proteção oferecida pelo leite materno a seu filho. O sangue será colhido de uma veia sob a pele com seringas e agulhas descartáveis, usadas uma única vez, e em pequena quantidade. No local da picada da agulha poderá sentir um pouco de dor e, às vezes poderá ficar uma mancha roxa que depois de alguns dias sumirá sozinha. Do mesmo modo será colhido o sangue do cordão, porém sem dor nem hematomas. A colheita do colostro será realizada por ordenha manual, sendo um processo indolor, apresentando incômodo ou não. Caso a senhora e seu filho(a) não queiram participar da pesquisa, você tem todo o direito de se recusar. Caso comece na pesquisa e depois deseje desistir, também estará garantido a assistência prestada por esta unidade de saúde para você e sua criança.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Será colhido sangue da mãe, do cordão umbilical e colostro para determinar o perfil de citocinas, a imunofenotipagem dos leucócitos e avaliar os parâmetros bioquímicos, imunológicos e hormonais dessas amostras.

3. Desconfortos e riscos esperados: O desconforto ocasionado à senhora será pequeno. No local da picada da agulha poderá sentir um pouco de dor e, às vezes poderá ficar uma pequena mancha roxa que depois de alguns dias sumirá sozinha. A colheita do colostro será um processo indolor, apresentando incômodo ou não.

4. Benefícios que poderão ser obtidos: O benefício a ser obtido será um melhor conhecimento sobre a influência das alterações metabólicas nas interações imunológicas entre mãe e filho via colostro e condutas que poderão beneficiar os pacientes evitando maiores riscos aos recém-nascidos.

II – OBSERVAÇÃO:

- A senhora terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para diminuir eventuais dúvidas.
- A senhora terá direito de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
- Disponibilidade de assistência, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
- Se for detectado, algum problema de saúde previamente ao início da pesquisa, a senhora será encaminhada ao Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento.
- Se houver intercorrência de saúde decorrente da pesquisa, a senhora será atendida no Hospital da Mulher Maria José dos Santos Stein, Santo André -SP segundo o critério de assistência do mesmo (hospital de atendimento secundário). Se houver necessidade de atendimento de maior complexidade, a encaminharemos ao SUS.
- A senhora terá total confidencialidade, sigilo e privacidade dos dados deste estudo.
- A duração prevista da pesquisa é de 4 anos.

III – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Nome dos pesquisadores envolvidos:
Pesquisadora executante: Mahmi Fujimori
Pesquisador responsável: Prof. Dr. Luiz Carlos de Abreu.
Faculdade de Saúde Pública – Universidade de São Paulo: Endereço: Av. Dr. Arnaldo, 715 – CEP:01.246-904 – São Paulo/SP. Telefone: 3061-7703

IV – INFORMAÇÕES DO PACIENTE

Nome do paciente: .....

Documento de identidade N°: .....

Data de nascimento: ...../...../.....

Endereço: .....Número:.....APTO:.....

Bairro: .....Cidade:.....

CEP:.....Telefone: DDD( ).....

V – ENCERRAMENTO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

"Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente projeto de pesquisa."

Santo André – São Paulo, ... de .....201.....

_____ _____

Assinatura do paciente ou responsável legal Assinatura do pesquisador

ANEXO 3

Aprovação do Comitê de Ética

FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DO SOBREPESO E OBESIDADE MATERNA SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E HORMONAIS NA RELAÇÃO MATERNO-INFANTIL.

Pesquisador: Mahmi Fujimori

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 05269612.7.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 123.919

Data da Relatoria: 16/11/2012

Apresentação do Projeto:

Dentre as complicações decorrentes do sobrepeso e da obesidade, a redução na resposta imune tem sido apontada como um fator relevante e contribui para o aumento de infecções nestes pacientes, podendo levar a processos inflamatórios crônicos. Um dos mais importantes mediadores desses sinais é uma classe de moléculas chamadas citocinas. No sobrepeso e na obesidade há controvérsias em relação ao equilíbrio entre citocinas de padrão de ativação celular de linfócitos Th1 e Th2. Enquanto alguns autores relatam um desvio para a produção de citocinas de perfil Th1, outros relatam aumento do perfil Th2. É possível que os padrões imunológicos associados a alterações no metabolismo decorrentes do sobrepeso e da obesidade possam influenciar, via sangue e colostro, o desenvolvimento do sistema imunológico do recém-nascido, e contribuir desta forma para maior susceptibilidade às infecções, observados em crianças de mães com excesso de peso.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a associação entre estado nutricional pré-gestacional com a imunofenotipagem de células,perfis de citocinas Th1, Th2, Th3, TH17 e parâmetros bioquímicos e hormonais no sangue materno, no sangue de cordão umbilical e no colostro materno.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Informa dos possíveis riscos e sobre os benefícios relata que conforme os resultados encontrados pode estabelecer novas estratégias de prevenção das

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 01.246-904
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 **Fax:** (11)3061-7742 **E-mail:** coep@fsp.usp.br

complicações que ocorrem na gestação dessas mães e melhorar o índice de amamentação nesta população, uma vez que mães com excesso de peso devem ser incentivadas a amamentar seus bebês, pois esta é uma estratégia importante para combater as infecções no recém-nascido.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, bem estruturada e exequível. Há trabalhar com grupo controle e com grupo de obesas para se poder fazer comparações dos resultados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Bem escrito contendo todas as informações.

Recomendações:

Pela aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto exequível.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 29 de Outubro de 2012

Assinador por:
Claudio Leone
(Coordenador)

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 01.246-904
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 **Fax:** (11)3061-7742 **E-mail:** coep@fsp.usp.br

ANEXO 4

Currículo lattes do orientador

Currículo Lattes

English

Dados gerais Formação Atuação Projetos Produções Educação e Popularização de C & T Eventos Orientações Bancas Citações +

Luiz Carlos de Abreu

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2 - CA BI - Biotecnologia

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/6796970691432850

Última atualização do currículo em 06/03/2016

Atualmente é Visiting Scientist at Program in Molecular and Integrative Physiological Sciences (MIPS), Department of Environmental Health, at Harvard T.H. Chan School of Public Health. Harvard Catalyst: https://connects.catalyst.harvard.edu/Profiles/display/Person/143812 **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Luiz Carlos de Abreu

Nome em citações bibliográficas

Abreu LC;Abreu, LC;ABREU, Luiz Carlos de;de Abreu, Luiz Carlos;de Abreu, L. C.;de Abreu, Luiz;Carlos de Abreu, Luiz;Luiz C de Abreu;DEABREU, LUIZ CARLOS;ABREU, LUIZ CARLOS;Luiz Carlos de Abreu;ABREU, LUIZ C;DE ABREU, LUIZCARLOS;ABREU, LUIZ CARLOSDE;de Abreu L.C.;DE ABREU, L.C.;DE ABREU, LUIZ C;DE ABREU, LUIZ C.

Endereço

Endereço Profissional

Faculdade de Medicina do ABC, Faculdade de Medicina do ABC.
Avenida Principe de Gales, 821
Principe de Gales
09060870 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 49937256
Fax: (11) 49935450
URL da Homepage: www.fmabc.br

Formação acadêmica/titulação

1999 - 2003

Doutorado em Ciências.
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
Título: Impacto da fisioterapia neonatal em recém-nascidos pré-termo com doença pulmonar das membranas hialinas em ventilação pulmonar mecânica e pós-reposição de surfactante exógeno, Ano de obtenção: 2003.
Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2001 - 2001

Doutorado em Ciências.
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
com **período sanduíche** em Harvard School of Public Health (Orientador: John Godleski).
Título: Impacto da fisioterapia neonatal em recém-nascidos pré-termo com doença pulmonar das membranas hialinas em ventilação pulmonar mecânica e pós-reposição de surfactante exógeno, Ano de obtenção: 2003.
Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

1996 - 1998

Mestrado em Reabilitação.
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
Título: Efeitos terapêuticos da fisioterapia pulmonar e motora em recém-nascidos pré-termo com hemorragia periventricular-intraventricular,Ano de Obtenção: 1998.
Orientador: Benjamin Israel Kopelman.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Palavras-chave: Recém-nascido, hemorragia, fisioterapia, ultrasson.
Grande área: Ciências da Saúde
Setores de atividade: Cuidado À Saúde das Populações Humanas.

2005 - 2007

Mestrado profissional em Terapia Intensiva.
Instituto Brasileiro de Terapia Intensiva, IBRATI, Brasil.
Título: Avaliação dos parâmetros da ventilação mecânica em recém-nascidos pré-termo criticamente enfermos após a reposição do surfactante exógeno por via respiratória, Ano de Obtenção: .
Orientador: Miguel Nassif.
Bolsista do(a): Instituto Brasileiro de Terapia Intensiva, IBRATI, Brasil.
Palavras-chave: neonatal; surfactante; baixo peso; membranas hialinas; respirador.
Grande área: Ciências da Saúde
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Fisioterapia e Terapia Ocupacional.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Fisioterapia e Terapia Ocupacional / Subárea: Neonatologia Pediatria.

ANEXO 5

Currículo lattes da aluna

Currículo Lattes

English

Dados gerais Formação Atuação Projetos Produções Eventos +

Mahmi Fujimori

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/7217088196378742

Última atualização do currículo em 14/03/2016

Possui graduação em Farmácia com Habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Federal de Mato Grosso. Mestre pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Atualmente é doutoranda pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Mahmi Fujimori

Nome em citações bibliográficas

FUJIMORI, M.;Fujimori, Mahmi;FUJIMORI, M;FUJIMOR, MAHMI

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo.
Avenida Doutor Arnaldo nº 715 - Cerqueira César
Pinheiros
01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617705
Ramal: 255

Formação acadêmica/titulação

2012

Doutorado em andamento em Doutorado em Ciências.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Influência do sobrepeso e obesidade materna sobre parâmetros imunológicos, bioquímicos e hormonais na relação materno-infantil,
Orientador: Luiz Carlos de Abreu.
Coorientador: Adenilda Cristina Honório-França.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2010 - 2012

Mestrado em Ciências (Nutrição em Saúde Pública).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Aleitamento materno: saberes e práticas na atenção básica à saúde de dois municípios do sudoeste mato-grossense,Ano de Obtenção: 2012.
Orientador: Marina Ferreira Rea.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Grande área: Ciências da Saúde

2003 - 2008

Graduação em Farmácia com habilitação en Análises Clínicas.
Instituto Universitário do Araguaia ? Universidade Federal de Mato Grosso, IUNIARAGUAIA, Brasil.
Título: Avaliação do Conhecimento de Meninas Escolares sobre o Aleitamento Materno no Município de Barra do Garças-MT.
Orientador: Olegário Rosa de Toledo.

Formação Complementar

2011 - 2011

Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos. (Carga horária: 24h).
Instituto de Saúde da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, IS, Brasil.

2010 - 2010

Visitantes da Alegria. (Carga horária: 30h).
Centro Cultural Aclimação, CCA, Brasil.

2008 - 2008