

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS EM
COLOSTRO HUMANO DE PUÉRPERAS DE VILA VELHA E SEU
SIGNIFICADO CLÍNICO**

ANGÉLICA MOTA ALVES DE CARVALHO

VILA VELHA
NOVEMBRO / 2019

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS EM
COLOSTRO HUMANO DE PUÉRPERAS DE VILA VELHA E SEU
SIGNIFICADO CLÍNICO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

ANGÉLICA MOTA ALVES DE CARVALHO

VILA VELHA
NOVEMBRO / 2019

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C331c Carvalho, Angélica Mota Alves de.
Contagem global e diferencial de leucócitos em colostro humano de puérperas de Vila Velha e seu significado clínico / Angélica Mota Alves de Carvalho. – 2019.

29 f. : il.

Orientador: Dominik Lenz.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas)
Universidade Vila Velha, 2019.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Leucócitos.
3. Amamentação. I. Lenz, Dominik. II. Universidade Vila Velha.
III. Título.

CDD 615

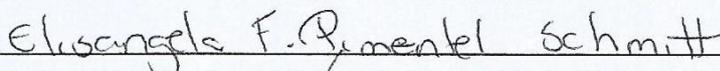
ANGÉLICA MOTA ALVES DE CARVALHO

**CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS EM
COLOSTRO HUMANO DE PUÉRPERAS DE VILA VELHA E SEU
SIGNIFICADO CLÍNICO**

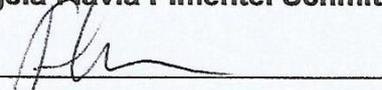
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 25 de novembro de 2019,

Banca Examinadora:



Elisângela Flávia Pimentel Schmitt - UFES


Fábio Ribeiro Braga - UVV


Dominik Lenz – UVV
Orientador

Dedicatória: Dedico esse trabalho aos familiares e muitos amigos que diretamente ou indiretamente contribuíram para que alcançasse êxito. Especialmente dedico a cada paciente que doou tempo e do seu próprio leite para pesquisa, tornando possível a atual realização.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer ao meu orientador, Prof Dr. Dominik Lenz que aceitou desbravar novos horizontes e trabalhar com esse maravilhoso e ainda, em muitos aspectos, misterioso fluido biológico que é o leite humano. Por sua atenção e disponibilidade, apoio e orientação, agradeço imensamente.

Também gostaria de agradecer ao Prof Dr. Márcio Fronza que esteve presente e acompanhou nosso crescimento desde a primeira reunião do projeto, à Profª Drª Elisângela Flávia Pimentel Schmitt pelos conselhos e interesse no progresso do trabalho e também agradeço à Profª Emy Hiura pela parceria e ensinamentos em cada lâmina de microscopia decifrada.

Agradeço a todos os funcionários administrativos da UVV sempre dispostos a ajudar nos vários percalços da condução deste trabalho.

À querida amiga Manuela Noda que auxiliou na formatação das tabelas e à também querida amiga Jeinnifer Zanardo pela parceria na coleta de dados e discussões dos resultados.

Em especial, quero agradecer a amiga e Profª Racire Sampaio Silva que em tantos momentos cedeu tempo, ofereceu conselhos preciosos e deu apoio nas situações mais difíceis.

Carinhosamente, agradeço ao meu amado esposo Fernando e meus filhos adorados Heitor e Beatriz. Sem eles, faltaria tempero para a conclusão do projeto.

Acima de tudo, agradeço a Deus, sem cuja Divina Providência não poderia ter chegado até aqui.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| 1.INTRODUÇÃO..... | 3 |
| 2.MATERIAL E MÉTODOS..... | 6 |
| 2.1- Tipo de estudo..... | 6 |
| 2.2- O estudo..... | 6 |
| 2.3- A amostra..... | 6 |
| 2.4 Forma de coleta do material biológico..... | 6 |
| 2.5. Metodologia..... | 7 |
| 2.6- Variáveis analisadas..... | 8 |
| 2.7- Análise estatística dos dados..... | 8 |
| 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 9 |
| 4.CONCLUSÕES..... | 14 |
| 5.REFERÊNCIAS..... | 15 |
| 6.ANEXOS..... | 19 |

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

| | |
|----------------|-----------|
| FIGURA 1..... | página 8 |
| GRÁFICO 1..... | página 10 |
| GRÁFICO 2..... | página 10 |
| GRÁFICO 3..... | página 11 |
| GRÁFICO 4..... | página 11 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---------------|-----------|
| TABELA 1..... | página 12 |
|---------------|-----------|

RESUMO

CARVALHO, ANGÉLICA MOTA ALVES, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, novembro de 2019. **CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS EM COLOSTRO HUMANO DE PUÉRPERAS DE VILA VELHA E SEU SIGNIFICADO CLÍNICO**. Orientador: Dominik Lenz

O leite humano é o primeiro alimento do recém-nascido, sendo responsável pela impressão epigenética entre a mãe e recém-nascido com transmissão de células maternas vivas que podem ser modificadas de acordo com condições maternas e da mama. Este estudo tem como objetivo estudar o perfil de leucócitos no colostro de puérperas saudáveis e doentes. Foram selecionadas 64 pacientes, moradoras de Vila Velha, que foram avaliadas de acordo com tipo de parto, características de saúde e alterações da mama. Foram coletadas amostras de leite colostro que foram analisadas em relação à presença de leucócitos e seu diferencial, comparando com a presença de intercorrências na gestação, parto e puerpério durante a lactação. Realizou-se estatística descritiva, com medidas de tendência central (média, mediana e intervalo de confiança de 95%). Foi encontrada relação positiva entre a presença de infecção durante a gestação e aumento na contagem de leucócitos no leite, independentemente do tipo de infecção. Conclui-se que as doenças maternas de maneira geral não interferem na contagem de leucócitos no colostro, porém, doenças infecciosas têm relação, se a ocorrência for durante a gravidez.

Palavras chaves: Leucócitos, amamentação, leite humano, colostro, infecção materna.

ABSTRACT

CARVALHO, ANGÉLICA MOTA ALVES, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, November 2019. **Global and differential leukocyte count in human colostrum of Vila Velha puerperal women and their clinical significance.** Advisor: Dominik Lenz

Human milk is the first food of the newborn and is responsible for epigenetic impression between the mother and newborn with transmission of living maternal cells that can be modified according to maternal and breast conditions. This study aims to study the profile of leukocytes in the colostrum of healthy and sick puerperal women. Sixty-four patients were selected, living in Vila Velha, who were evaluated according to type of delivery, health characteristics and breast alterations. Colostrum milk samples were collected that were analyzed in relation to the presence of leukocytes and their differential, comparing with the presence of complications during pregnancy, childbirth and puerperium during lactation. Descriptive statistics were performed, with measures of central tendency (mean, median and 95% confidence interval).

A positive relationship was found between the presence of infection during pregnancy and an increase in leukocyte count in colostrum, regardless of the type of infection. It is concluded that maternal diseases do not interfere with the count of leukocytes in the colostrum, however, infectious diseases are related if the occurrence is during pregnancy.

Keywords: Leucocytes, breastfeeding, human milk, colostrum, maternal infection

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (2017) reafirmou em seu último consenso que o leite materno é o melhor alimento para o recém-nascido, principalmente de maneira exclusiva até o sexto mês de vida e mantido por 2 anos ou mais com outros alimentos saudáveis. Uma das razões é que o aleitamento materno reduz mortalidade infantil (SANKAR MJ et al, 2015). Victora et al, em 2016, demonstraram em meta-análise que há evidências suficientes para estabelecer as vantagens da amamentação, independentemente do nível sócio-econômico do país. Resumidamente, o aleitamento materno protege as crianças contra infecções e problemas de oclusão dentária; há aumento do coeficiente de inteligência relacionado ao fato de ser amamentado; há provável redução no sobrepeso e diabetes, não havendo associação em relação a alergias, pressão arterial ou colesterol. Em relação à nutriz, houve evidência de proteção contra o câncer de mama e de ovário, além de proteção contra diabetes tipo 2 e espaçamento das gestações. A manutenção da amamentação traz benefícios a saúde do binômio mãe/bebê a curto e a longo prazo (VICTORA CG et al, 2016), tanto do ponto de vista orgânico como emocional (SMITH; FORRESTER, 2017). As vantagens do uso do leite humano na alimentação do recém nascido impulsionaram o crescimento dos bancos de leite humano, estimulando a doação do leite e o uso por recém-nascidos que não possuem o leite da própria mãe (ARNOLD, 2006).

O leite humano é uma solução biológica complexa composta de centenas de substâncias identificáveis, tais como lactoferrina, oligossacarídeos, agentes antioxidantes (BALLARD; MORROW, 2013), além de células do sistema imune e de bactérias cuja presença não é interpretada como infecção pela mama de acordo com as evidências atuais (BOIX-AMORÓS; COLLADO; MIRA, 2016). Os mamíferos produzem o leite com variações espécie – específicas (HASSIOTOU; GEDDES; HARTMANN, 2013). Essas variações correspondem às necessidades de cada espécie, promovendo o desenvolvimento ideal do seu filhote, inclusive se adaptando em situações como prematuridade (LI S. et al, 2019). Recentemente, demonstrou-se que a glândula sofre alterações estruturais específicas para aumentar a produção de leite e atender à demanda do recém-nascido (RIOS et al, 2016). Além de seu valor nutricional, o leite materno também fornece componentes que são biologicamente ativos, adaptados para atender a essas necessidades do bebê (LIS-KUBERKA J, ORCZYK-PAWIŁOWICZ M, 2019). O ácido polisiálico é exemplo, visto que interage

com a lactoferrina com ação imunomoduladora sobre neutrófilos (KÜHNLE A et al, 2019).

A nutrição pode apresentar papel importante na modulação da expressão gênica, estimulando ou inibindo essa expressão com consequências diversas para o indivíduo. Verduci et al (2014), demonstrou que a composição do leite materno interfere na metilação do DNA da prole, disparando mecanismos de regulação epigenética nos filhotes. Desde achados demonstrando alterações no metabolismo dos carboidratos e gorduras no filhote de acordo com a dieta materna, até a exposição a fórmula e redução do aleitamento materno relacionados com o aumento da obesidade no futuro. Há evidências de que o leite materno pode transferir informação e regulação genética através de vesículas extracelulares constituídas de dupla camada lipídica, contendo RNA em seu interior (KARLSSON et al, 2016). De acordo com Victora (2017), a relação entre a mãe e o bebê durante a amamentação pode ser definida como um diálogo biológico onde a criança diz para a mãe suas necessidades e a mãe responde alterando a quantidade e a composição do seu leite.

O leite produzido pela glândula mamária apresenta variações de acordo com o tempo pós-parto. Nos primeiros 7 dias, dá-se o nome de colostro apresentando altas concentrações de proteínas, como a lactoferrina, e altos índices de anticorpos (CZOSNYKOWSKA-ŁUKACKA et al, 2019). Esse fato chama a atenção visto a característica especial de que os recém-nascidos, especialmente os prematuros, nascem relativamente imunoimaturados. Dessa forma, o colostro tem papel especial na proteção imunológica logo após o nascimento (LEWIS et al, 2017). Entre 7 e 14 dias, denomina-se leite de transição devido a características intermediárias. Após 14 dias, chama-se leite maduro e seguirá com propriedades mais ou menos estáveis até o final da lactação (BALLARD; MORROW, 2013). Exceção se mostra em situações de adoecimento do bebê ou da mãe. Por exemplo, em situações de mastite, há evidência do aumento da concentração de sódio e redução da lactose no leite materno da mama acometida (FETHERSTON, 2006).

Além das diferenças de acordo com a época da lactação, pode-se analisar o leite materno em 3 fases, de acordo com a separação por centrifugação, conforme resume Witkowska-Zimny e Kaminska-El-Hassan (2017): fase de creme (gordura), fase aquosa com substâncias hidrossolúveis tais como proteínas e o sedimento onde são identificadas as células do leite.

Essa importância do leite humano justifica o investimento na doação de leite humano para recém-nascidos doentes após processamento em banco de leite

humano (PERRIN et al, 2019). Há dados que mostram seu papel no neurodesenvolvimento, amadurecimento do sistema imune e fortalecimento do vínculo mãe-bebê (HOSSEINI et al, 2014). No leite humano, encontram-se as proteases que facilitarão a digestão do leite, mas apenas uma parte irrelevante entra em atividade dentro da glândula, sendo ativadas apenas após a chegada no intestino da criança (DALLAS; MURRAY; GAN, 2015). Além disso, há evidência de que oligossacarídeos presentes no leite humano melhoram o prognóstico de pacientes com enterocolite necrotizante, comorbidade grave em unidades de terapia intensiva neonatal (JANTSCHER-KRENN et al, 2012). Muitos desses mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos, mas patenteiam a complexidade do leite humano.

Nesse cenário, apresentam-se as populações celulares no leite materno da espécie humana, especialmente os leucócitos, sugerindo papel complementar na defesa imune do indivíduo. Essas células foram denominadas inicialmente como Corpúsculos de Donnè (CRACO et al, 1979) e evidências da migração de leucócitos do sangue materno para o leite já existem há mais de 30 anos (KHAN AJ et al, 1980). Essa migração é seletiva, como demonstrado em relação aos linfócitos T citotóxicos maternos de camundongos que foram identificados preferencialmente na placa de Peyer do intestino dos filhotes amamentados (CABINIAN et al, 2016).

O conhecimento atual, baseado nos achados de microscopia e imunohistoquímica, identifica as células no leite materno como: leucócitos, células tronco, células epiteliais e bactérias. Essas células estão viáveis no leite ordenhado em cerca de 97% na amostra coletada (TWIGGER et al, 2015)

Há diferenças na população celular em relação ao tempo de lactação, como número maior de leucócitos na fase de colostro (GOLDMAN, 1993), com uma diminuição dos leucócitos ao longo do tempo, tanto em gestações a termo quanto em gestações de nascimentos prematuros (TREND et al, 2015).

Além de variar com o tempo de lactação, o perfil de leucócitos pode variar também de acordo com a saúde do bebê, como o aumento de linfócitos no leite materno de mães cujos bebês amamentados têm alergia a proteína do leite de vaca (JARVINEN; SUOMALAINEN, 2002). As consequências para a prole ainda não estão estabelecidas, mas há a possibilidade de uma programação imunológica de acordo com o status de alergia materna e o perfil de células CD45+ (leucócitos) (DIXON; FORSYTH, 2016).

A saúde da mãe também pode alterar o perfil dos leucócitos. Baseados em estudos na área de veterinária, a presença de aumento de leucócitos sugere mastite

em evolução, sugerindo qualidade inadequada do leite a ser utilizado na indústria alimentícia (WELLNITZ et al, 2009). Embora o aumento do número de leucócitos no leite humano em vigência de mastite também tenha sido observado, o leite humano não é considerado nessa situação como impróprio para o recém-nascido (BODE et al, 2014). Em humanos, a mastite materna não contraindica a continuidade da amamentação ao seio, exceto em situações de abscesso mamário, com saída de secreção no leite, através do mamilo (BERENS, 2015).

Em revisão na literatura, Hassiotou et al, 2013, demonstram que o conteúdo celular no leite humano pode variar de 10000 a 13000000 de céls/mL. Isso reflete um grande espectro de variação entre os indivíduos e dificuldade em definir valores de normalidade esperados.

Como há grande variação de estimativa na população de leucócitos no leite na literatura atual, esse estudo teve como objetivo determinar a contagem global de leucócitos e a variação na subpopulação de leucócitos no colostro mulheres de Vila Velha, relacionando com o estado de saúde ou doença da doadora e do recém-nascido, dentro da população estudada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Tipo de estudo

Estudo transversal com amostra representativa da população de puérperas cujo parto ocorreu no Hospital Estadual Infantil e Maternidade Alzir Bernardino Alves (HEIMABA).

2.2- O estudo

O estudo foi realizado no Hospital Estadual Infantil e Maternidade Alzir Bernardino Alves (HEIMABA), localizado no município de Vila Velha/ES, que atende a cerca de 250 partos por mês, somente a usuários do SUS. A proposta foi aprovada pelo Conselho de Ética e Pesquisa em seres Humanos sob o número 2.094.342 e pelo Núcleo de Pesquisa da SESA (NUED-RH SESA).

2.2- A amostra

A amostra foi composta por 64 puérperas. Serão incluídas as pacientes acima de 18 anos, que concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A).

As pacientes responderam ao questionário especificado no Anexo B, que foi realizado sob a forma de entrevista, sem identificação de nome, cuidando do conforto, sigilo e confidencialidade da paciente, em local reservado.

Foram critérios de exclusão para o estudo: doença grave durante o período de observação, doenças psiquiátricas e óbito do neonato. Não houve desistência de paciente durante o estudo.

2.4 Forma de coleta do material biológico

Foram realizadas coletas de colostro nas primeiras 120h de pós-parto de 64 puérperas, após concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Foi procedido primeiramente paramentação (máscara, gorro e luvas descartáveis) da mãe e de pessoa treinada no procedimento, higiene das mãos com água e sabão, higienização das mamas com água corrente (REDE NACIONAL DE BANCO DE LEITE HUMANO, 2011). A seguir, foi realizada uma massagem manual em 3 polpas digitais com movimentos circulares iniciando-se em torno do mamilo até a base da mama. Depois, procedeu-se ordenha manual em frasco estéril, desprezando-se os primeiros jatos. Com técnica estéril, foi produzida alíquota de 0,1 a 10 ml de leite materno, conforme técnica descrita (MS, 2015). A própria paciente pôde aprender a técnica para realizá-la, fora do contexto do projeto, com o objetivo de retirada de leite para seu filho, considerado um benefício que protege o aleitamento materno em caso de separação momentânea da mãe e do bebê. Nos casos de desconforto da mãe, a coleta foi momentaneamente interrompida, não havendo perda de material.

2.5. Metodologia

O leite coletado foi homogeneizado e pipetado 0,01mL para preparo de esfregaço em lâmina de vidro. Após a lâmina secar foi corada em Hematoxilina-eosina e foram avaliados os tipos celulares em microscópio com aumento de 40x para contagem de células e de 100x para diferenciação celular (JIN et al, 2011). As características morfológicas dos leucócitos no colostro humano são semelhantes às do sangue, como mostra a figura 1.

FIGURA 1:



SEGMENTADO NO LEITE

No dia da coleta de amostra de leite, foi realizada coleta de hemograma materno. Essa amostra de sangue foi obtida por profissional treinado, calçando luvas de procedimento, que, após explicá-lo ao paciente, limpou a área da pele com álcool a 70^o e perfurou com agulha esteril. A dor do paciente foi minimizada com leve pressão local.

2.6- Variáveis analisadas

O entrevistador treinado aplicou a cada participante do estudo um questionário com informações sobre variáveis socioeconômicas e demográficas, como idade, telefone e local de moradia, além de dados clínicos. As participantes foram estratificadas ainda por idade, paridade, tipo de parto, idade gestacional medida preferencialmente por Ultrassonografia obstétrica, status de saúde durante e logo após a gravidez, sinais e sintomas de alterações na mama, tabagismo e etilismo obtidos por meio de registro em formulário próprio (ANEXO B).

2.7- Análise estatística dos dados

A análise dos dados coletados e armazenados em Excel foi realizada através de estatística descritiva, com medidas de tendência central (média, mediana e intervalo de confiança de 95%). Na comparação das médias entre dois grupos, foi usado teste t. Consideramos diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

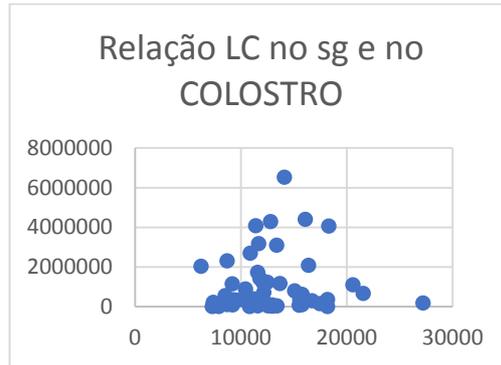
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sessenta e quatro mulheres de 18 a 39 anos foram voluntárias para doar amostras de leite humano e sangue. Houve 2 gêmeos, sendo 65 bebês foram contados. 28 (43,7%) bebês nasceram por cesariana. 49 (76,6%) mulheres negaram quaisquer complicações ou doenças durante a gravidez. O peso ao nascer apresentou uma distribuição normal, com mínimo de 1726g, máximo de 4305g, média de 3191,6g (DP 535g). 54 (84,4%) dos partos apresentaram líquido amniótico claro. As amostras de leite foram coletadas de 6 a 120 horas após o parto, com mediana de 24 horas (1º quartil 24h, mediana de 30h e 3º quartil 48h). Dos 64 pacientes, 5 (7,8%) eram fumantes, 31 (48,4%) referiram ingerir álcool durante a gravidez, 1 (1,6%) relatou o uso regular de cannabis, 30 (47%) não estavam doentes e não apresentaram complicações durante o parto, mas 24 (37,5%) apresentaram alterações patológicas da mama no momento da coleta do leite. Das primeiras amostras foram feitas lâminas com 0,1ml de colostro. Quando havia aumento da celularidade, a contagem se tornava muito difícil, chegando a impossibilitar o uso do material. Por isso, foi reduzida para 0,01mL a quantidade de colostro para realização do esfregaço. Para se obter a contagem global na primeira fase, o resultado inicial foi multiplicado por 10x. Na segunda fase foi multiplicado por 100x, sem prejuízo do trabalho.

Comparação de leucograma com leucócitos no leite:

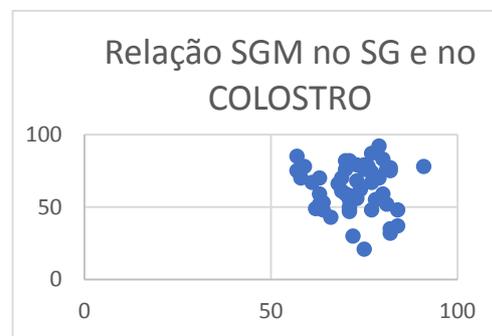
Amostras de leite mostraram uma faixa de 140 leucócitos/mL a 6526800 leucócitos/mL, com mediana 341850 leucócitos/mL. As amostras com menos de 10^4 céls/mL na segunda fase descrita a cima não puderam ser avaliadas em relação aos subtipos de leucócitos (5 amostras). Foi uma limitação técnica porque nesses casos a contagem na lâmina era menor do que 100 células. Nessa situação, não foi possível determinar a porcentagem de subgrupos por microscopia óptica. Oito pacientes (12%) não tinham resultados de contagem de células sanguíneas disponíveis. Assim, 56 amostras foram analisadas para comparação entre leucócitos no sangue materno e no colostro, sendo que para comparação de subgrupos foram 51 amostras. Foram comparadas usando t teste e os resultados não mostraram diferença estatística entre leucócitos no sangue e no leite (GRÁFICO 1), mas há relação entre os leucócitos segmentados, eles variam no leite de acordo com a variação na proporção no sangue materno, com p valor $<0,01$ (GRÁFICO 2). Esta evidência foi somente para leucócitos segmentados, não se mostrando para outros subtipos.

GRÁFICO 1:



LEGENDA: LC = LEUCÓCITOS; sg = sangue materno

GRÁFICO 2:



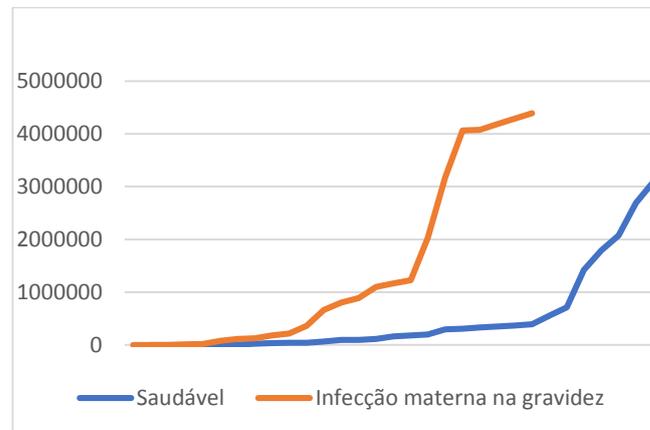
LEGENDA: SGM = SEGMENTADOS; SG = sangue materno

Complicações da gravidez e celularidade da amostra de leite:

Quando analisamos a concentração de leucócitos no leite materno de pacientes com doença e sem doença durante a gestação, não houve relação estatisticamente relevante. Mas as evidências mudam quando os leucócitos no leite de pacientes que foram diagnosticados com infecção durante a gravidez são comparados com aqueles sem complicações. Eles mostraram um aumento na média quando qualquer tipo de infecção está presente com p valor 0,02, como visto no GRÁFICO 3.

GRÁFICO 3:

Distribuição de leucócitos no colostro nas amostras cujas pacientes apresentaram ou não infecção na gravidez



Condições da mama puerperal e contagem de leucócitos

Sobre as condições da mama, identificamos cinco: sem alterações, dor, fissura mamilar, ingurgitamento mamário, prurido. Para cálculo, considerou-se o Grupo A (sem alterações) e o Grupo B (quaisquer alterações), com distribuição no GRÁFICO 4. A contagem global de leucócitos não modificou entre o Grupo A e o B. Isso também foi verdade para subtipos de leucócitos contados em amostras de leite. Quando comparadas as médias dos grupos A e B para leucócitos, segmentados, linfócitos e monócitos encontramos p valor $>0,05$, como mostra na TABELA 1.

GRÁFICO 4:



TABELA 1:

| TIPO CELULAR PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS A E B | <i>p valor</i> |
|--|----------------|
| LEUCÓCITOS | 0,76 |
| SEGMENTADOS | 0,14 |
| LINFÓCITOS | 0,06 |
| MONÓCITOS | 0,38 |

Dessa forma, concluímos que as subpopulações de leucócitos não se alteraram nas amostras analisadas de acordo com a presença de modificações clínicas na mama puerperal (a medida de *pvalor* encontrado foi maior do que 0,05).

Complicações de parto e celularidade da amostra de leite, tipo de parto e celularidade da amostra de leite e uso de drogas e celularidade da amostra de leite

Não há evidências de modificações nos leucócitos globais na comparação com complicações no parto, tipo de parto e uso de drogas por parte da mãe.

Discussão

Nesse trabalho, foi mostrado contagem global de leucócitos semelhante à literatura mas com maior variação de 10^3 a 10^6 células/mL (JIN YY, 2011) (BALLARD O, MORROW AL, 2013) (DIXON DL, FORSYTH KD, 2017). Apesar do tamanho pequeno da amostra, foi observado distribuição normal de parâmetros de peso ao nascer, idade das pacientes e dados de hemograma maternos.

Os dados mostraram que a variação de segmentados no leite foi diretamente proporcional à de segmentados no sangue materno, o que ainda não havia sido demonstrado antes e sugere ser mais uma informação que reforça a transferência de informação imunológica da mãe para o bebê (CABINIAN A et al, 2016).

Em concordância com nossos resultados, outros estudos mostraram predominância de neutrófilos no colostro humano (MASCHMANN J et al, 2015). Mais pesquisas são necessárias, mas os dados atuais podem ser entendidos como um

mecanismo de proteção para garantir as necessidades do bebê. Sabe-se que os leucócitos no leite expressam mais proteínas antibacterianas e que essa expressão aumenta em situações de infecção materna (KÜHNLE A et al, 2019), podendo sugerir que não apenas o aumento na concentração celular está envolvido no mecanismo de proteção.

Situações clínicas como alterações na condição das mamas, intercorrências no parto ou tabagismo e etilismo não demonstraram estatisticamente alterar as contagens celulares realizadas, embora evidências mais antigas sugerissem o contrário, especialmente para condições da mama (FETHERSTON CM et al, 2006). Ressalta-se que mastite foi o evento relacionado e esse diagnóstico não foi encontrado na amostra do presente estudo, provavelmente por se tratar de amostras colhidas no início da lactação.

Dor e prurido são dados subjetivos e estavam presentes mesmo quando não foi identificado nenhum sinal de alteração ao exame. Por essa razão, foi avaliado em conjunto com alterações clínicas, mas não analisados isoladamente.

O aumento em média no número de leucócitos no colostro de mães diagnosticadas com infecção na gravidez, sem dependência do tipo de infecção, foi o resultado de destaque deste trabalho. A glândula sob situação de infecção sistêmica pode se adaptar e preparar o produto (leite) para proteger a prole. No futuro, mais estudos podem confirmar essa evidência, onde a infecção isoladamente pode interferir na contagem global de leucócitos no colostro humano, da mesma forma que modifica a expressão de perforinas e outras moléculas de membrana dessas células do sistema imunológico presentes no leite (TWIGGER AJ A et al, 2018).

4. CONCLUSÕES

A principal evidência do presente estudo foi a demonstração do aumento em média no número de leucócitos no colostro de mães diagnosticadas com infecção na gravidez, sem dependência do tipo de infecção. Dessa maneira, sugere-se que o corpo da gestante transmite para o bebê através da amamentação mais proteção aumentando a população de leucócitos no colostro.

Também se concluiu que as alterações estudadas da condição das mamas e na saúde materna no momento do parto não modificaram a contagem global e diferencial de leucócitos no colostro. Os mecanismos de como a glândula mamária preserva o produto para o bebê ainda estão sendo investigados, mas os dados do presente estudo sugerem que ocorrem, pelo menos para os leucócitos no leite.

Neste estudo também foi possível demonstrar um método alternativo para análise de células no leite. Embora trabalhoso, os resultados foram comparáveis a literatura internacional com custos menores.

O presente estudo abre espaço para perguntas futuras sobre, se a glândula mamária altera a celularidade do leite diante de situações de infecção durante a gravidez, seria possível que essas modificações ocorressem em situações de recém-nascido que nasce com infecção. Demonstrou-se que a coleta de hemograma materno não se faz necessária em estudos futuros visto a ausência de relação entre as contagens efetuadas.

5. REFERÊNCIAS

- ARNOLD LD. Global health policies that support the use of banked donor human milk: a human rights issue. *Int Breastfeed J.* 2006 Dec 12; 1:26.
- BALLARD O, MORROW AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* 2013 Feb;60(1):49-74.
- BERENS PD. Breast Pain: Engorgement, Nipple Pain, and Mastitis. *Clin Obstet Gynecol.* 2015 Dec;58(4):902-14.
- BODE L, MCGUIRE M, RODRIGUEZ JM, GEDDES DT, HASSIOTOU F, HARTMANN PE, MCGUIRE MK. It's alive: microbes and cells in human milk and their potential benefits to mother and infant. *Adv Nutr.* 2014 Sep;5(5):571-3.
- BOIX-AMORÓS A, COLLADO MC, MIRA A. Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. *Front Microbiol.* 2016 Apr 20; 7:492.
- CABINIAN A, SINSIMER D, TANG M, ZUMBA O, MEHTA H, TOMA A, SANT'ANGELO D, LAOUAR Y, LAOUAR A. Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. *PLoS One.* 2016 Jun 10;11(6):e0156762.
- CRAGO SS, PRINCE SJ, PRETLOW TG, MCGHEE JR, MESTECKY J. Human colostral cells. I. Separation and characterization. *Clin Exp Immunol.* 1979 Dec;38(3):585-97
- CZOSNYKOWSKA-ŁUKACKA M, ORCZYK-PAWIŁOWICZ M, BROERS B, KRÓLAK-OLEJNIK B. Lactoferrin in Human Milk of Prolonged Lactation. *Nutrients.* 2019 Oct 2;11(10).
- DALLAS DC, MURRAY NM, GAN J. Proteolytic Systems in Milk: Perspectives on the Evolutionary Function within the Mammary Gland and the Infant. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2015 Dec;20(3-4):133-47
- DIXON DL, FORSYTH KD. Leukocytes in expressed breast milk of asthmatic mothers. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2017 Jul - Aug;45(4):325-332.
- FETHERSTON CM, LAI CT, HARTMANN PE. Relationships between symptoms and changes in breast physiology during lactation mastitis. *Breastfeed Med.* 2006 Autumn;1(3):136-45.
- GOLDMAN AS. The immune system of human milk: antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulating properties. *Pediatr Infect Dis J.* 1993 Aug;12(8):664-71. Review. PubMed PMID: 8414780.
- HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. T.; HARTMANN, P. E. Cells in Human Milk. *Journal of Human Lactation*, 2013 May; v. 29, n. 2, p.171-182.

HASSIOTOU F, HEPWORTH AR, METZGER P, TAT LAI C, TRENGOVE N, HARTMANN PE, FILGUEIRA L. Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clin Transl Immunology*. 2013 Apr 12;2(4):e3.

HOSSEINI SM, TALAEI-KHOZANI T, SANI M, OWRANGI B. Differentiation of Human Breast-Milk Stem Cells to Neural Stem Cells and Neurons. *Neurol Res Int*, 2014 Nov, p.1-8,

JARVINEN K.M., SUOMALAINEN H. Leucocytes in human milk and lymphocyte subsets in cow's milk-allergic infants. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13: 243–254

JANTSCHER-KRENN E, ZHEREBTSOV M, NISSAN C, GOTH K, GUNER YS, NAIDU N, CHOUDHURY B, GRISHIN AV, FORD HR, BODE L. The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Gut*. 2012 Oct;61(10):1417-25.

JIN Y.Y., WEI Z., CAO R.M., XI W., WU S.M., CHEN T.X. Characterization of immunocompetent cells in human milk of Han Chinese. *J Hum Lact*. 2011 May;27(2):155-62.

KARLSSON O, RODOSTHENOUS R.S., JARA C, BRENNAN K.J., WRIGHT R.O., BACCARELLI A.A., WRIGHT R.J. Detection of long non-coding RNAs in human breastmilk extracellular vesicles: Implications for early child development. *Epigenetics*. 2016 Aug 5:0.

KHAN AJ, ROSENFELD W, VADAPALLI M, BIAGTON J, KHAN P, HUQ A, EVANS HE. Chemotaxis and random migration of human milk cells. *J Pediatr*. 1980 May;96(5):879-82. PubMed PMID: 7365595.

KÜHNLE A, VEELKEN R, GALUSKA CE, SAFTENBERGER M, VERLEIH M, SCHUPPE HC, RUDLOFF S, KUNZ C, GALUSKA SP. Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. *Carbohydr Polym*. 2019 Mar 15;208:32-41. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.12.033. Epub 2018 Dec 12. PubMed PMID: 30658806.

LEWIS ED, RICHARD C, LARSEN BM, FIELD CJ. The Importance of Human Milk for Immunity in Preterm Infants. *Clin Perinatol*. 2017 Mar;44(1):23-47.

LI S, ZHANG L, ZHOU Q, JIANG S, YANG Y, CAO Y. CHARACTERIZATION OF STEM CELLS AND IMMUNE CELLS IN PRETERM AND TERM MOTHER'S MILK. *J Hum Lact*. 2019 Aug;35(3):528-534. doi: 10.1177/0890334419838986. Epub 2019 Apr 26. PubMed PMID: 31026180.

LIS-KUBERKA J, ORCZYK-PAWIŁOWICZ M. Sialylated Oligosaccharides and Glycoconjugates of Human Milk. The Impact on Infant and Newborn Protection, Development and Well-Being. *Nutrients*. 2019 Feb 1;11(2). pii: E306. doi:10.3390/nu11020306. Review. PubMed PMID: 30717166; PubMed Central PMCID: PMC6413137.

MASCHMANN J, GOELZ R, WITZEL S, STRITTMATTER U, STEINMASSL M, JAHN G, HAMPRECHT K. Characterization of human breast milk leukocytes and their potential role in cytomegalovirus transmission to newborns. *Neonatology*. 2015;107(3):213-9. doi: 10.1159/000371753. Epub 2015 Feb 13. Erratum in: *Neonatology*. 2016;109(1):13. PubMed PMID: 25675905.

MINISTERIO DA SAÚDE. Cadernos de atenção básica nº 23: saúde da criança. Aleitamento Materno e Alimentação Complementar. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015, 186 p

PERONI DG, CHIRUMBOLO S, VENERI D, PIACENTINI GL, TENERO L, VELLA A, ORTOLANI R, RAFFAELLI R, BONER AL Colostrum-derived B and T cells as an extra-lymphoid compartment of effector cell populations in humans. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013; 26(2): 137–142

PERRIN MT, FESTIVAL J, STARKS S, MONDEAUX L, BROWNELL EA, VICKERS A. Accuracy and Reliability of Infrared Analyzers for Measuring Human Milk Macronutrients in a Milk Bank Setting. *Curr Dev Nutr*. 2019 Oct 21;3(11):nzz116.

REDE NACIONAL DE BANCO DE LEITE HUMANO. Normas técnicas redblh-br para bancos de leite humano nº 16.11: Ordenha: Procedimentos Higiênico-Sanitários. 1 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2011.

RIOS AC, FU NY, JAMIESON PR, PAL B, WHITEHEAD L, NICHOLAS KR, LINDEMAN GJ, VISVADER JE. Essential role for a novel population of binucleated mammary epithelial cells in lactation. *Nat Commun*. 2016 Apr 22; 7:11400.

SANKAR MJ, SINHA B, CHOWDHURY R, BHANDARI N, TANEJA S, MARTINES J, BAHL R. Optimal breastfeeding practices and infant and child mortality: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*. 2015 Dec;104(467):3-13. doi: 10.1111/apa.13147. Review. PubMed PMID: 26249674.

SMITH, J. and FORRESTER, R. (2017). Maternal Time Use and Nurturing: Analysis of the Association Between Breastfeeding Practice and Time Spent Interacting with Baby. *Breastfeeding Medicine*, 12(5), pp.269-278

TREND S, JONG E, LLOYD ML, KOK CH, RICHMOND P, DOHERTY DA, SIMMER A, KAKULAS F, STRUNK T, CURRIE A. Leukocyte Populations in Human Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. *Plos One*, 2015 Aug v. 10, n. 8, p.1-17.

TWIGGER AJ, HEPWORTH AR, LAI CT, CHETWYND E, STUEBE AM, BLANCAFORT P, HARTMANN PE, GEDDES DT, KAKULAS F. Gene expression in breastmilk cells is associated with maternal and infant characteristics. *Sci Rep*. 2015 Aug 10;5: 12933.

VERDUCI E, BANDERALI G, BARBERI S, RADAELLI G, LOPS A, BETTI F, RIVA E, GIOVANNINI M. Epigenetic effects of human breast milk. *Nutrients*. 2014 Apr 24;6(4):1711-24.

VICTORA C. Breastfeeding as a biological dialogue. *Arch Argent Pediatr* 2017;115(5):413-414.

VICTORA CG, BAHL R, BARROS AJ, FRANÇA GV, HORTON S, KRASEVEC J, MURCH S, SANKAR MJ, WALKER N, ROLLINS NC; Lancet Breastfeeding Series Group. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet*. 2016 Jan 30;387(10017):475-90

WELLNITZ O, DOHERR MG, WOLOSZYN M, BRUCKMAIER RM. Prediction of total quarter milk somatic cell counts based on foremilk sampling. *J Dairy Res*. 2009 Aug;76(3):326-30.

WITKOWSKA-ZIMNY M, KAMINSKA-EL-HASSAN E. Cells of human breast milk. *Cell Mol Biol Lett*. 2017 Jul 13;22: 11.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guideline: protecting, promoting and supporting breastfeeding in facilities providing maternity and newborn services. Geneva: World Health Organization; 2017.

TWIGGER AJ, KÜFFER GK, GEDDES DT, FILGUERIA L. Expression of Granulysin, Perforin and Granzymes in Human Milk over Lactation and in the Case of Maternal Infection. *Nutrients*. 2018 Sep 4;10(9). pii: E1230. doi: 10.3390/nu10091230. PubMed PMID: 30181507; PubMed Central PMCID: PMC6163887.

6. ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS EM COLOSTRO HUMANO DE PUÉRPERAS DE VILA VELHA E SEU SIGNIFICADO CLÍNICO

Responsável pela pesquisa: Prof. Dr. Dominik Lenz

“Universidade Vila Velha”

Este documento que você está lendo é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ele contém explicações sobre o estudo que você está sendo convidada a participar. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida participar, você será solicitado a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo). Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Essa pesquisa procura conhecer as concentrações de leucócitos no leite humano na fase de colostro e correlacionar com os níveis no sangue periférico. Dessa forma, busca-se confirmar a passagem seletiva dessas células no leite, sugerindo papel na função imunológica do leite humano, além de poder sugerir relação com o estado de saúde ou de doença da puérpera. Caso decida aceitar o convite, você será submetida aos seguintes procedimentos: responder questionários pré-elaborados; permitir a coleta de sangue, caso não tenha hemograma na internação na maternidade, no mesmo dia em que for realizada a técnica de ordenha para fornecer 1 a 5 ml de colostro, coletado manualmente no Banco de Leite Humano do Hospital e Maternidade Alzir Bernardino Alves, na ocasião da internação na Maternidade do referido hospital.

Os riscos envolvidos com sua participação são: hematoma no local de punção, desconforto local por algumas horas, leve desconforto durante a coleta do leite, constrangimento ao responder aos questionários, que serão minimizados através das seguintes providências: oferecimento de compressas geladas para serem realizadas no local do possível hematoma, coleta de leite ou colostro feita com técnica adequada por profissional treinado, a entrevista sigilosa e individual sem identificação posterior de quem responde o questionário. Caso esse procedimento possa gerar algum tipo de constrangimento você não precisa realizá-lo, verbalizando o desejo de não mais participar do projeto.

Você terá os seguintes benefícios ao participar da pesquisa: ter apoio para amamentar e orientação para proteger o aleitamento materno exclusivo nos primeiros seis meses de vida e sua participação poderá ajudar no maior conhecimento sobre a presença de leucócitos no leite humano, sugerindo maior proteção contra doenças.

Todas as informações obtidas serão sigilosas. O material com as suas informações (dosagens séricas, entrevistas, entre outras) ficará guardado em local seguro sob a responsabilidade de **Angélica Mota Alves de Carvalho** com a garantia de manutenção do sigilo e confidencialidade e que será destruído após a pesquisa. A divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo. Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Você ficará com uma via deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para **Angélica Mota Alves de Carvalho**, no seguinte email: angelica.neo@gmail.com.

Dúvidas sobre a pesquisa envolvendo princípios éticos poderão ser questionadas ao **Comitê de Ética em Pesquisa da UVV** localizado na Rua Comissário José Dantas de Melo, nº 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP: 29.102-770, Tel: (27) 3421-2084, E-mail: cep.uvv@gmail.com Horário de funcionamento: 2ª a 6ª feira –13:30 às 18:30h. Secretária: Andréa Sarmiento Araújo.

Reclamações e/ou insatisfações relacionadas à participação do paciente na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à Secretaria do CEP/UVV, desde que os reclamantes se identifiquem, sendo que o seu nome será mantido em anonimato.

Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa **DETERMINAÇÃO DA LEUCOMETRIA EM COLOSTRO HUMANO**, dos procedimentos nela envolvidos, assim como dos possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso me traga prejuízo ou penalidade.

Participante (Paciente ou Responsável): (assinatura, nome e CPF)

Pesquisador responsável: (assinatura, nome e CPF)

Pesquisador Participante (assinatura, nome e CPF)

ANEXO B: ENTREVISTA:

Número do Estudo: _____

Número do Prontuário: _____

Data do parto: ___/___/___

Idade Gestacional: _____ Sexo: _____

Peso de Nascimento: _____ Apgar: _____

I – Idade da mãe: _____

II - Fumo: () Sim () Não () Ex-fumante

III - Consome bebida alcoólica atualmente: () Sim () Não () já bebi, mas parei

IV - () drogas ilícitas:

V - Antecedentes Gineco-Obstétricos:

Gesta: _____ Para: _____ Aborto: _____

Infecção urinária na gravidez () Diabetes gestacional () Hipertensão prévia ()
 Alergia () Doença hipertensiva específica da gravidez () Outros ()
 especificar: _____

VI – Uso de medicações: () sim () não, se sim,
 especificar: _____

VII – Parto: Normal () Cesárea () Tempo de bolsa rota: _____ Líquido amniótico:
 Intercorrências () sim () não se sim, especificar:

VIII – Peso atual do RN: _____ Idade atual do RN (em
 horas) _____

IX – História atual:

Febre na última semana () sim () não

Fissura mamilar () sim () não

Engurgitamento () sim () não

Dor durante a mamada () sim () não

Dor fora da mamada () sim () não

Prurido mamilar () sim () não

ENTREVISTADOR: _____

DATA DA ENTREVISTA: / /