

COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO LEITE HUMANO EM FUNÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL MATERNO

BIOACTIVE COMPOUNDS FROM HUMAN MILK AS A FUNCTION OF MATERNAL NUTRITIONAL STATUS

Monica Lopes de Assunção

Universidade Federal de Alagoas, Maceió - AL - Brasil

Nidyanne Patricia de Mesquita Chagas Lopes

Universidade Federal de Alagoas, Maceió - AL - Brasil

Caroliny Fernandes de Melo Santos

Universidade Federal de Alagoas, Maceió - AL - Brasil

Mellyssa Tenório Neves Ferreira

Universidade Federal de Alagoas, Maceió - AL - Brasil

Liliane Santos Silva

Universidade Federal de Alagoas, Maceió - AL - Brasil

Tiago Emanuel Vieira da Silva

Universidade Federal de Alagoas, Maceió - AL - Brasil

Resumo: O leite humano é um biofluido rico em nutrientes e compostos bioativos. Contudo, pouco se sabe sobre a concentração destes compostos em função do estado nutricional materno. Sendo assim, objetivando avaliar a concentração de compostos bioativos do colostro em função do índice de massa corporal materno, foi realizado um estudo transversal, onde os constituintes do leite humano foram analisados por meio de ressonância magnética nuclear. Diferenças significantes foram observadas no teor de fucose, e de ácido N-acetil neuramínico, indicando que metabólitos primários para a produção de oligossacarídeos não digeríveis estavam alterados em função do estado nutricional materno.

Palavras-chave: leite materno; índice de massa corporal materno; compostos bioativos.

Abstract: Human milk is a biofluid rich in nutrients and bioactive compounds. However, little is known about the concentration of such compounds in relation to maternal nutritional status. Therefore, aiming to evaluate the concentration of bioactive compounds in colostrum as a function of the maternal body mass index, a cross-sectional study was carried out, where the constituents of human milk were analyzed by means of nuclear magnetic resonance. Significant differences were observed in the fucose content, and N-acetyl neuraminic acid, indicating that primary metabolites for the production of non-digestible oligosaccharides were altered as a result of maternal nutritional status.

Keywords: human milk; maternal body mass index; bioactive compounds.

1 INTRODUÇÃO

O excesso de peso representa na atualidade um dos principais problemas de saúde pública mundial, sendo a sua incidência crescente em mulheres na faixa etária reprodutiva e nas crianças. A ocorrência deste distúrbio independe do nível socioeconômico, embora seja maior entre a população materno infantil residente nos países em desenvolvimento (CASAS *et al.*, 2011; SATO; FUJIMORI, 2012; TRIUNFO; LANZONE, 2014).

Embora o excesso de peso constitua um importante fator de risco para infertilidade, grande parte das mulheres nesta condição nutricional consegue engravidar (KLENOV; JUNGHEIM, 2014; RACUSIN *et al.*, 2012). Nesse contexto, intervenções nutricionais adequadas são de grande importância durante esse período. O leite materno surge como protetor, pois ele é considerado o alimento perfeito para o recém-nascido. Possui uma composição dinâmica, sendo fonte de inúmeros compostos bioativos, incluindo oligossacarídeos não digeríveis, os quais apresentam função prebiótica e imunomoduladora (ERICK, 2018; BALLARD; MORROW, 2013). Esses compostos são metabolizados por bactérias e atuam promovendo uma microbiota intestinal saudável e equilibrada, pois favorecem o crescimento e a atividade de bactérias prebióticas e inibe os microrganismos com potencial efeito patogênico, além de fornecer substratos que auxiliam na modulação da resposta imunológica através da regulação da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (DAVIS, 2016; THOMSON; MEDINA; GARRIDO, 2018; SHOKRYAZDAN *et al.*, 2017).

Embora seja unânime a recomendação da prática do aleitamento materno exclusivo nos seis primeiros meses de vida, torna-se necessário conscientizar essas lactantes de que um adequado estado nutricional na concepção e gestação é importante para uma produção láctea de “qualidade” (XI *et al.*, 2016). Desse modo, é oportuno avaliar os fatores que contribuem para a variação na concentração de oligossacarídeos não digeríveis do leite humano (OLH), tais como o índice de massa corporal (IMC) materno, tendo em vista que estes apresentam efeitos imediatos e a longo prazo na saúde infantil (AZAD *et al.*, 2018).

2 DESENVOLVIMENTO

Os benefícios do leite materno vão além de suas propriedades nutricionais, sendo esta prática sustentável, psicológicas e genéticas fornecem à criança uma gama de benefícios, sendo considerado o reforço imunológico natural mais potente para a criança (BHATIA; SHAMIR; VANDENPLAS, 2016; PALMEIRA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2016). Contudo, apesar de seus

benefícios, as taxas de aleitamento materno no Brasil e no mundo estão abaixo do ideal. De acordo com os dados do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI), a prevalência de aleitamento materno exclusivo no Brasil é de 45,7%, sendo esta prática mais frequente na região Sul (53,1%) e menos frequente na região nordeste do país (38%) (UNIVERSIDADE..., 2020). Além dos nutrientes amplamente conhecidos, tais como os macronutrientes, vitaminas e minerais, o leite materno é um alimento que contém imunoglobulinas, oligossacarídeos não digeríveis, hormônios e fatores de crescimento que desempenham um papel fundamental na vida pós-natal (BARDANZELU, 2020).

Os OLH são carboidratos complexos não conjugados e solúveis, sintetizados na glândula mamária, a depender do genótipo materno. Desse modo, a proteção conferida pelos OLH pode ser em maior ou menor grau, de acordo com a produção de tipos específicos em cada mãe (BODE, 2012). Eles podem ser classificados em 3 categorias: neutros fucosilados, que apresentam fucose em sua porção terminal, neutros não fucosilados, que contém N-acetilglucosamina na porção terminal e os ácidos, cuja porção terminal contém o ácido siálico (PLAZA-DIAS; FONTANA; GIL, 2018). Em termos de quantidade, os OLH representam o terceiro maior componente do leite materno, correspondendo a aproximadamente 20% do conteúdo total de carboidratos (ZIVKOVIC *et al.*, 2011; THURL *et al.*, 2017).

2.1 METODOLOGIA

Estudo transversal, com abordagem quantitativa, realizado com 80 binômios mãe/recém-nascido internados na Maternidade Nossa Senhora da Guia, localizado no I Distrito Sanitário de Maceió - AL. Foram consideradas aptas a participar da pesquisa as puérperas na faixa etária de 20 – 40 anos, que apresentaram gestação de feto único vivo, nascido com idade gestacional ≥ 37 semanas, sem enfermidades infectocontagiosas ou intercorrências clínicas gestacionais.

Estas foram recrutadas na referida unidade hospitalar por ocasião do trabalho de parto, e aceitaram participar da pesquisa, após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A abordagem inicial da paciente foi realizada por um dos colaboradores (alunos de graduação em Nutrição), com supervisão direta de uma Nutricionista, no período entre 24-48 horas após o parto.

Uma vez autorizada sua participação, a puérpera respondeu ao questionário e ao fim da entrevista foi coletado o colostro, no período da manhã, pela própria puérpera, por expressão manual de única mama, não sugada previamente, diretamente para um tubo de ensaio com tampa. As amostras de colostro foram imediatamente congeladas (-20°C) e posteriormente armazenados a -80°C . Antes da análise, elas foram descongeladas à temperatura ambiente e vortexadas vigorosamente para ressuspender os glóbulos de gordura do leite. Dois mililitros de uma mistura clorofórmio/metanol numa proporção de 2:1 foram adicionados a $400\ \mu\text{L}$ de leite materno. Essa mistura foi agitada em vórtex e $600\ \mu\text{L}$ de água foi adicionada. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a $16\ 000\times g$. Este método produz duas fases e metabólitos divididos nas diferentes fases de acordo com a sua polaridade. Ambas as fases foram separadas e evaporadas usando um rotaevaporador para a fase orgânica e um liofilizador para a fase aquosa. Depois de secas, as fases foram congeladas a -80°C . Em seguida, o extrato seco da fase aquosa foi reconstituído em $600\ \mu\text{L}$ de água deuterada e o extrato seco da fase orgânica foi reconstituído em $600\ \mu\text{L}$ de clorofórmio deuterado. As fases reconstituídas foram transferidas para tubos de RMN de 5 mm de diâmetro para análise por espectroscopia de RMN no Núcleo de Análise e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear da UFAL.

A estatística descritiva utilizada para caracterização das variáveis socioeconômicas e demográficas foi realizada no programa RStudio, por meio de medidas de tendência central e dispersão. A análise univariada foi realizada para observar o comportamento dos compostos bioativos encontrados, em função do índice de massa corporal materno.

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, tendo sido aprovado em 28 de fevereiro de 2020, parecer CAAE n. 3.890.492.

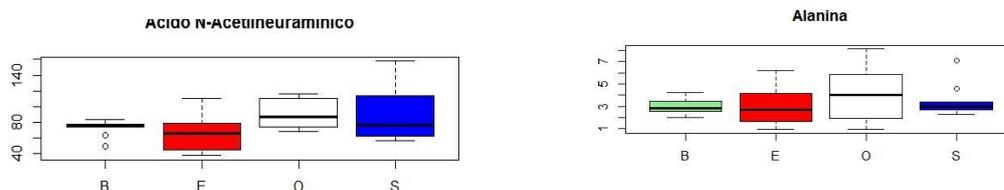
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

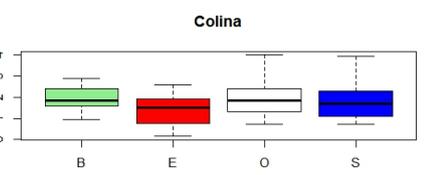
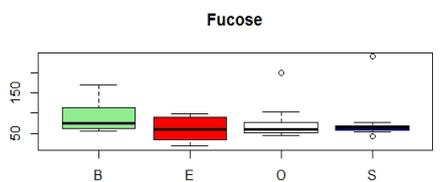
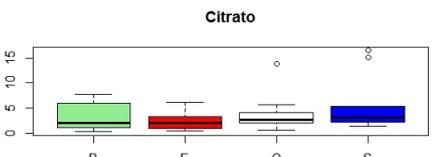
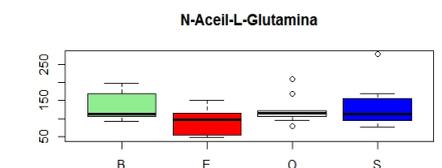
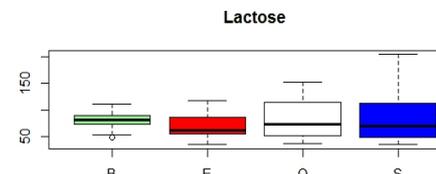
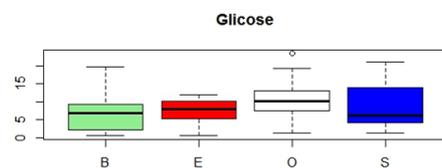
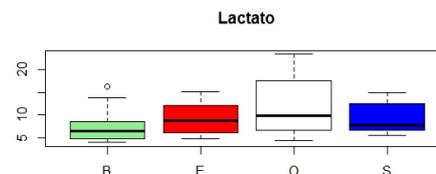
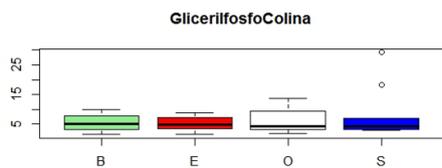
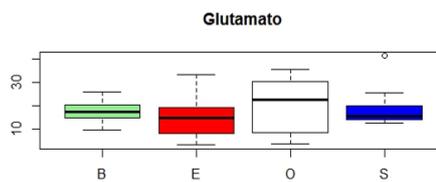
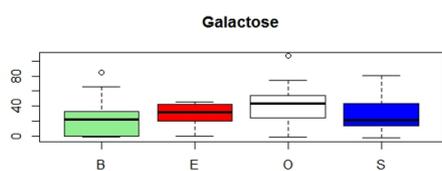
Dentre as puérperas avaliadas 78,7% residiam em Maceió e apresentavam idade média de $25,3 \pm 3,8$ anos, com 70,0% das participantes apresentando parto por via vaginal e possuindo mais de um filho. Destas, 81,0%, moram com o companheiro e apenas 6,0% das avaliadas possuíam o ensino superior completo.

Em relação aos compostos bioativos, analisou-se o comportamento de 12 metabólitos da fase aquosa. Estes compostos foram identificados por meio dos gráficos boxplots (Figura 1). O teste ($p <$

0,05) foi aplicado para verificar possíveis diferenças significantes entre o pareamento dos grupos (B = baixo peso/ E = eutrofia / S = sobrepeso / O = obesidade) em relação a cada metabólito.

Figura 1- Boxplots das concentrações relativas dos 12 metabólitos identificados da fase aquosa de leite materno de mães em função das diferentes categorias de IMC.





Observou-se altos níveis de Ácido N-Acetilneuramínico em mães obesas quando comparado a mães com baixo peso (OxB, $p = 0,019$) e mães eutróficas (OxE, $p = 0,015$). Os níveis de N-Acetil-L-Glutamina apenas apresentaram diferença significantes na comparação entre mães com baixo peso e mães com eutrofia (BxE, $p = 0,021$), sendo as mães com baixo peso com maior quantidade deste metabólito. Resultado semelhante foi observado para a fucose, que se mostrou elevada em mães com baixo peso em relação as mães com eutrofia (BxE, $p = 0,044$). Segundo estudo de Smilowitz *et al* (2013) observou que a presença de fucose no leite humano foi positivamente correlacionada com oligossacarídeos fucosilados com ligações α 1,2 e negativamente correlacionado com ligação α 1,3/4 sugerindo que a fucose livre no leite pode ser uma consequência

do metabolismo de oligossacarídeos fucosilados com ligação $\alpha 1,2$, o que poderia explicar essa maior produção nas mães com baixo peso, embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam esclarecidos.

No estudo realizado por Elwakiel *et al.* (2018) observou-se menores concentrações de oligossacarídeos no leite de mães com baixo IMC nas duas primeiras semanas após o parto. Por outro lado, Ignaistis *et al.* (2019) demonstrou que a obesidade materna esteve associada a diferenças no metaboloma do leite humano em 6 meses após o parto, mas não no 1º mês. De acordo com Ninonuevo *et al.* (2008), pouca variação é observada no conteúdo total de oligossacarídeos e em seus componentes individuais durante os primeiros cinco dias de lactação, de modo que suas funções prebióticas podem ser as funções primárias, devido sua elevada quantidade e a produção constante. O ácido siálico está presente no colostro em elevada quantidade e à medida que o tempo de lactação progride, sua quantidade vai diminuindo, de modo que no colostro a quantidade de ácido siálico é cerca de 5 vezes maior.

Foi observado que quando as concentrações de ácido siálico ligadas à oligossacarídeos e proteínas diminuíram, também haviam menores concentrações de ácido siálico livre (WANG *et al.*, 2001). Isso nos leva a supor que nas mães obesas do presente estudo, poderia haver mais formação de OLM sialilados, já que maior quantidade de ácido N-acetil neuramínico foi encontrada. Isto está de acordo com o estudo conduzido por Samuel *et al.* (2019) que observou que mães obesas apresentaram maior teor de OLM sialilados (3'SL e 6'GL). Mc Guire *et al.* (2017), também encontrou maior quantidade de 6'SL em mães com IMC mais elevado. Observamos que vários metabólitos do colostro se mantiveram preservados, mas que houve variações em monossacarídeos específicos (fucose e ácido N-acetil-neuramínico) em função do estado nutricional materno, mesmo que por mecanismos não totalmente esclarecidos.

3 CONCLUSÃO

No decorrer deste trabalho, observamos variação na composição de compostos bioativos do colostro em função do IMC materno, embora por mecanismos ainda não totalmente elucidados. Mais estudos nesta área são imprescindíveis, tendo em vista que essas alterações podem ter impacto sobre a saúde infantil.

REFERÊNCIAS

AYERZA CASAS, A. *et al.* Nutritional characteristics of newborns of overweight and obese mothers. **Anales de Pediatría**, v. 75, n. 3, p. 175-81, sep. 2011.

AZAD, M. B. *et al.* Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. **Journal of Nutrition**, v. 148, n. 11, p. 1733-1742, nov. 2018.

BARDANZELLU, F.; PERONI, D. G.; FANOS, V. Human Breast Milk: Bioactive Components, from Stem Cells to Health Outcomes. **Current Nutrition Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, mar. 2020.

BHATIA, J.; SHAMIR, R.; VANDENPLAS, Y.: Protein in Neonatal and Infant Nutrition: Recent Updates. **Nestlé Nutrition Institute Workshop**, v. 86, p. 67-76, 2016.

BODE, L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, v. 22, n. 9, p. 1147-62, sep. 2012.

DAVIS, J. C. C. *et al.* Identification of Oligosaccharides in Feces of Breast-fed Infants and Their Correlation with the Gut Microbial Community. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, n. 9, 2016.

ELWAKIEL, M. *et al.* Human Milk Oligosaccharides in Colostrum and Mature Milk of Chinese Mothers: Lewis Positive Secretor Subgroups. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 27, p. 7036-7043, jul. 2018.

ERICK, M. Breast milk is conditionally perfect. **Medical Hypotheses**, v. 111, p. 82-89, 2018.

ISGANAITIS, E. *et al.* Maternal obesity and the human milk metabolome: associations with infant body composition and postnatal weight gain. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 110, n. 1, p.111-120, 2019.

KLENOV, V. E.; JUNGHEIM, E. S. Obesity and reproductive function: a review of the evidence. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 26, n. 6, p. 455-60, dec. 2014.

MCGUIRE, M. K. *et al.* What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 5, p. 1086-1100, may 2017.

NELSON, S. M.; MATTHEWS, P.; POSTON, L. Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 3, p. 255-75, may./jun. 2010.

NINONUEVO, M. R. *et al.* Daily Variations in Oligosaccharides of Human Milk Determined by Microfluidic Chips and Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 618-626, 2008.

O'REILLY, J. R.; REYNOLDS, R. M. The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. **Clinical Endocrinology**, v. 78, n. 1, p. 9-16, jan. 2013.

PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. Immunology of breast milk. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 6, p. 584-593, sep. 2016.

PLAZADIAZ, J.; FONTANA, L.; GIL, A. Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. **Nutrients**, v. 10, n. 8, aug. 2018.

PRATICO, G. *et al.* Exploring human breast milk composition by NMR-based metabolomics. **Natural Product Research**, v. 28, n. 2, p. 95-101, 2014.

RACUSIN, D. *et al.* Obesity and the risk and detection of fetal malformations. **Seminars in Perinatology**, v. 36, n. 3, p. 213-21, jun. 2012.

SABEN, J. L. *et al.* Maternal adiposity alters the human milk metabolome: associations between nonglucose monosaccharides and infant adiposity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 112, n. 5, p. 1228-1239, nov. 2020.

SATO, A. P. S.; FUJIMORE, E. Estado nutricional de ganho de peso de gestantes. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 20, n. 3, p. 462-468, maio/jun. 2012.

SMILOWITZ, J. T. *et al.* The human milk metabolome reveals diverse oligosaccharide profiles. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 11, p. 1709-18, nov. 2013.

THOMSON, P.; MEDINA, D. A.; GARRIDO, D. Human Milk Oligosaccharides and Infant Gut Bifidobacteria: Molecular Strategies for their Utilization. **Food Microbiology**, v. 75, p. 37-46, oct. 2018.

THURL, S. *et al.* Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 9, p. 1261-71, nov. 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. **Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil – ENANI-2019**: Resultados preliminares – Indicadores de aleitamento materno no Brasil. Rio de Janeiro: UFRJ, 2020.

WANG, B. *et al.* Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 510-15, 2001.

XI, Y. *et al.* The levels of human milk microRNAs and their association with maternal weight characteristics. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 4, p. 445-9, apr. 2016.

ZIVKOVIC, A. M. *et al.* Human milk glyco-biome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, Suppl 1, p. 4653-8, mar. 2011.

SAMUEL, T. M. Impact of maternal characteristics on human milk oligosaccharide composition over the first 4 months of lactation in a cohort of healthy European mothers. **Nature**, v. 9, aug. 2019.