

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA

Luciana Venhofen Martinelli Tavares

**Determinação do perfil de aminoácidos em
recém nascidos pré-termo alimentados com
dietas modificadas de leite humano.**

Campo Grande - MS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA

Luciana Venhofen Martinelli Tavares

**Determinação de aminoácidos em recém
nascidos pré-termo alimentados com dietas
modificadas de leite humano.**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós Graduação de
Saúde e Desenvolvimento da Região
Centro - Oeste sob orientação do Prof.
Dr. Durval Batista Palhares para
obtenção do título de Doutor.

Campo Grande - MS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA

Luciana Venhofen Martinelli Tavares

**Determinação de aminoácidos em recém
nascidos pré-termo alimentados com dietas
modificadas de leite humano.**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação de Saúde e Desenvolvimento da Região Centro - Oeste sob orientação do Prof. Dr. Durval Batista Palhares para obtenção do título de Doutor.

Coordenador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares

Campo Grande - MS

2011

Tavares, Luciana Venhofen Martinelli

Determinação de aminoácidos em recém nascidos pré-termo alimentados com dietas modificadas de leite humano.

Páginas i - xi – 1 -61.

Tese de Doutorado - Programa de Pós Graduação de Saúde e Desenvolvimento da Região Centro – Oeste – 2011

Determination of amino acids in preterm infants fed with diets of modified human milk.

1. Aminoácidos
2. Recém Nascido Pré Termo
3. Leite Humano

DEDICATÓRIA

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!

Ao meu pai e a minha mãe,

WILSON e ROSA MARIA

Ensinaram-me a ser antes de tudo, uma mulher de valor.

Ao meu amor,

CARLOS ALBERTO ELOY TAVARES

Você é tudo que eu mais gosto, meu café completo, a bebida preferida e o meu
prato predileto!

A nossa filha,

EDUARDA

Que me ensina a ser um ser humano melhor, a sentir o amor na mais pura
forma, a cada dia!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“Acredito que o futuro brilhante é baseado em um passado intensamente vivido. Só temos sucesso na vida, quando perdoamos os erros e as decepções do passado. Por isso, é tempo de lutar pela felicidade. Ela é um estado de alma que precisamos aprender a cultivar dentro do nosso coração em todos os momentos de nossa vida. Não está fora de nós, e nem na presença das pessoas, por mais que as amemos. Está dentro de nós, na plenitude da vida, quando colocamos nosso amor para fora e enxergamos as coisas boas que possuímos. É bênção a ser conquistada. Ela flui de dentro para fora e independe até das outras pessoas. Se você quer ser feliz, esqueça os erros do passado, esqueça sua culpa. Cultive as bênçãos do presente, e perceberá que a felicidade sempre esteve ao seu lado sem que você a deixasse entrar.”

Matheus Furtado

Ao Professor **Dr. Durval Batista Palhares**, professor titular do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, orientador deste trabalho de pós - graduação, que me ensinou muito além do que eu imaginava. Algo como, viver bem a vida e amar as coisas que fazemos, simples assim!!! Mas maravilhosamente sábio e grandioso.

Muito obrigada.

As queridas amigas e companheiras de trabalho, **Débora Thomas e Paula Serafim**, que sem elas nada seria, e por elas tudo agradeço. Elas foram meu caminho, e sempre terão minha admiração. São mulheres que merecem o meu total respeito. Obrigada.

As **mães e recém nascidos** que fizeram parte da pesquisa e que sem eles, nada disto valeria a pena!

AGRADECIMENTOS

A, **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**, pelo desenvolvimento do Programa de Pós Graduação Saúde e Desenvolvimento da Região Centro – Oeste e pelo acolhimento para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Professor **Dr. Ricardo Dutra Aydos** coordenador do Programa de Pós Graduação Saúde e Desenvolvimento da Região Centro – Oeste

Aos **funcionários da Unidade de Terapia Intensiva** do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e aos **funcionários do laboratório** do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Ao Professor **Dr. Luis Henrique Viana** do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela paciência, permissão, auxílio e ensinamentos para as leituras dos aminoácidos.

Os **amigos** que de forma direta e indireta ajudaram a realizar esta pesquisa

A **Fundect** pelo apóio financeiro e pela confiança.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Desnatadeira Alfa Laval®	20
FIGURA 2 - Rotaevaporador MARCONI®	21
FIGURA 3 – Centrifuga Refrigerada SIGMA 3K30®	21
FIGURA 4 – Precipitado de lactose depois da retirada do sobrenadante.....	22
FIGURA 5- Liofilizador EDWARDS®	23
FIGURA 6 – Gráfico com resultados referente ao ganho de peso.....	30
FIGURA 7 – Gráfico com resultados referentes ao comprimento e perímetro cefálico.....	30
FIGURA 8 – Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos essenciais plasmáticos do grupo I (LHB-FM85®).....	31
FIGURA 9 – Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos não essenciais plasmáticos do grupo I (LHB-FM85®).....	32
FIGURA 10 – Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos essenciais plasmáticos do grupo II (LHB-E).....	33
FIGURA 11 - Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos plasmáticos não essenciais do grupo II (LHB-E).....	34
FIGURA 12 - Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos essenciais plasmáticos do grupo III (LHB-L).....	34
FIGURA 13 – Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos não essenciais plasmáticos do grupo III (LHB-L).....	35
FIGURA 14 - Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos plasmáticos dos grupos do estudo.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Gradiente de mistura das fases A e B em função do tempo.....	26
TABELA 2 - Concentração dos aminoácidos dos recém nascidos pré-termos nos diferentes grupos do estudo.....	36
TABELA 3 – Valores iniciais e finais da uréia, creatinina e albumina dos recém nascidos pré termo nos diferentes grupos de estudo.....	37

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

UFMS = Universidade Federal de Mato Grosso do Sul	RNMBP = recém nascido muito baixo peso
NHU = Núcleo Hospital Universitário	RNEBP = recém nascido extremo baixo peso
HRMS= Hospital Regional de Mato Grosso do Sul	LH = leite humano
CTI = Centro de terapia intensiva	LV = leite bovino
UTI = Unidade de terapia intensiva	LM = leite maduro
AAP = Academia americana de pediatria	AM = aleitamento materno
TCLE = Termo de consentimento livre e esclarecido	LHB = leite humano de banco
kg = quilograma	FM85 [®] = aditivo marca Nestlé
g = grama	LHB-E = leite humano do banco evaporado
mg = miligrama	LHB-L= leite humano do banco liofilizado
ml = mililitro	ECN = enterocolite necrotizante
ul = microlitro	EDTA=ácido etilenodiaminotetraacético
g/dl =grama por decilitro	IG = idade gestacional
g/kg/dia = gramas/quilograma/dia	AIG = adequado para idade gestacional
kcal = quilocalorias	aa = aminoácido
mm = milímetro	X = média
µm = micrometro	EPM = erro padrão da média
µg = micrograma	p = probabilidade
cm = centímetro	rpm = respiração por minuto
mm/l = milimolar/litro	FiO2 = fração de oxigênio inspirado
mmHg = milímetros de mercúrio	°C = grau celsius
RN = recém nascido	CFC = clorofluorcarboneto
RNPT = recém nascido pré termo	pH = potencial hidrogeniônico
RNBP = recém nascido baixo peso	

RESUMO

O aleitamento materno é a maneira mais segura de nutrir uma criança. Porém, quando usado para prematuros têm-se evidenciado deficiências nutricionais. Uma alternativa é o uso do leite humano aditivado. O objetivo deste estudo a determinação de aminoácidos em recém nascidos pré-termo alimentados com três dietas modificadas de leite humano. Foi estudado 30 recém nascidos pré-termo, idade gestacional inferior a 34 semanas com peso de nascimento igual ou inferior a 1500 gramas. Os recém nascidos foram acompanhados através de avaliações antropométricas mensurando peso, comprimento e perímetro cefálico, bioquímicas e para análise do perfil de aminoácidos foi colhida uma amostra de sangue antes de receberem a dieta e outra amostra no final do estudo antes da última dieta. Foram distribuídos de forma aleatória em 3 grupos conforme a dieta que receberam: leite humano de banco com 5% do aditivo FM85[®]; leite humano de banco aditivado com leite humano evaporado e leite humano do banco aditivado com leite humano liofilizado. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o “software” Instat para Windows[®], na versão 2.0. Foram utilizadas as diferenças na qual o valor de “*p*” foi menor que 0,05. A comparação entre os grupos foi realizada por meio dos testes: t’student pareado e ANOVA de 1 via de medidas repetitivas com pós teste de Tukey. Peso e comprimento não tiveram diferença significativa, porém o perímetro cefálico foi significativamente maior no grupo III. Os valores de fenilalanina, tirosina, metionina e histidina foram significativamente maiores no grupo I, enquanto que o valor da treonina foi significativamente maior nos grupos II e III sendo não significativo entre eles. Os valores de lisina, valina, glicina e leucina não houve diferenças entre os grupos. E o valor da glutamina foi maior nos grupos II e III. Os marcadores renais se mantiveram nos valores adequados. Observou-se neste estudo um perfil de aminoácidos mais adequado nos grupos II e III em relação ao grupo I. Presumem que o leite humano com aditivo original do próprio leite humano é o melhor alimento para bebês prematuros, seja evaporado ou liofilizado. Recém nascidos pré-termo também podem ser alimentados com hidrolisado protéico heterólogo, respeitando as necessidades especiais do prematuro.

DESCRITORES: Aminoácidos; Recém nascido pré-termo; Leite humano de banco.

ABSTRACT

Breastfeeding is the safest way to nurture a child. However, when used for premature infants have nutritional deficiencies become apparent. An alternative is the use of human milk additive. The aim of this study the determination of amino acids in preterm infants fed three diets modified in human milk. We studied 30 preterm infants, gestational age less than 34 weeks with birth weights less than or equal to 1500 grams. The newborns were followed by measuring anthropometric evaluations weight, length and head circumference, and biochemical analysis of the amino acid profiles were collected a blood sample before receiving the diet and the other end of the study sample before the final diet. Were distributed at random into three groups according to diet were: human milk bank at 5% of the additive FM85 ®; bank human milk fortified with human milk and evaporated human milk fortified with human milk bank lyophilized. The results were statistically analyzed using the "software" InStat for Windows ®, version 2.0. We used the differences in which the value of "p" was less than 0.05. The comparison between groups was performed by means of tests: t'student paired and 1-way ANOVA for repeated measures with Tukey post test. Weight and length did not differ significantly, but the head circumference was significantly higher in group III. The values of phenylalanine, tyrosine, methionine and histidine were significantly higher in group I, while the value of threonine was significantly higher in groups II and III was not significant among them. The values of lysine, valine, leucine and glycine there were no differences between groups. And the value of glutamine was higher in groups II and III. The markers in the kidney remained appropriate values. Observed in this study a more appropriate amino acid profile in groups II and III compared to group I. They assume that human milk with additive own unique human milk is the best food for premature babies, either evaporated or freeze-dried. Preterm newborns can also be fed hydrolyzed protein heterologous respecting the special needs of premature infants

KEY WORDS: Amino acids; Pre term newborn; Human milk bank.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	13
3. Metodologia.....	14
3.1 Estudo da população (amostra).....	14
3.2 Método.....	17
4. Resultados.....	29
5. Discussão.....	38
6. Conclusão.....	49
7. Referências bibliográficas.....	50
8. Anexo I – Comitê de ética em pesquisa.....	60
9. Apêndice I – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	61

1. INTRODUÇÃO

Amamentação é uma prática fisiológica com reconhecidos benefícios nutricionais, imunológicos, cognitivos, econômicos, sociais além de estreitar o vínculo mãe-filho¹. O aleitamento materno (AM) exclusivo nos seis primeiros meses de vida é a forma mais natural e segura para alimentar um lactente, garantindo suas necessidades nutricionais e fornecendo uma combinação de proteínas, lipídeos, hidratos de carbono, minerais, vitaminas e enzimas, pois possui a proporção exata de nutrientes para o adequado crescimento e bom desenvolvimento do cérebro humano. A alimentação com leite humano (LH) é vantajosa principalmente para o recém nascido pré-termo (RNPT), pois diminui índices de internação hospitalar²⁻⁷.

O LH protege da alergia os prematuros com historia familiar de atopia. Os ácidos graxos ômega 3 são essenciais para que haja o desenvolvimento normal da retina, em especial do recém nascido pré-termo de muito baixo peso (RNMBP), assim, este lipídio juntamente com outros antioxidantes, como a vitamina E, β -caroteno e taurina podem ser a causa da proteção antioxidante conferida pelo LH contra a retinopatia da prematuridade¹.

Para o RNPT, a recomendação do uso AM tem sido defendida com base nas propriedades imunológicas do LH, no seu papel na maturação gastrointestinal e no melhor desempenho neurocomportamental observado em crianças amamentadas⁴.

Portanto é provável que as doenças da prematuridade decorram de um desbalanço entre as defesas antioxidantes e a exposição a radicais livres, cujo excesso destes aumentaria o risco de enterocolite necrosante, displasia broncopulmonar, hemorragia intraventricular e retinopatia da prematuridade⁸.

Como o RNPT parece não apresentar proteção bem desenvolvida contra o estresse oxidativo, o uso de LH seria vantajoso, já que este oferece melhor proteção antioxidante que outros leites com hidrolisados protéicos heterólogo⁹. A incidência de infecção é significativamente menor nos RNMBP alimentados com LH quando comparados àqueles que recebem exclusivamente leite artificial – hidrolisado protéico heterólogo^{10,11}. Apesar de desejável, observa-se pouco sucesso na amamentação entre mães de prematuros¹², por ainda

existirem barreiras hospitalares à amamentação¹³, principalmente para recém nascidos de alto risco¹⁴ e com frequência, o desmame do peito ocorre antes mesmo da alta do RNPT da unidade neonatal¹⁵.

Amamentar prematuros é, sem dúvida, um desafio. Os RNPT apresentam imaturidade fisiológica, neurológica e muscular, permanecendo em alerta por períodos muito curtos¹⁶. Mas, apesar do inadequado controle da sucção/deglutição/respiração¹⁷, um RNPT é capaz de alimentar-se com LH, com auxílio e apoio apropriados¹⁸. Os neonatologistas precisam não só estar convencidos das múltiplas vantagens do LH e da possibilidade de se alimentar RNPT com LH, como também integrar o apoio da lactação ao planejamento da ação terapêutica nesses pacientes¹⁹.

O alimento de escolha para o RNPT deve ser o leite de sua própria mãe. O leite produzido pela mãe de RNPT nas primeiras quatro semanas pós-parto contém maior concentração de nitrogênio, proteínas com função imunológica, lipídios totais, ácidos graxos de cadeia média, vitaminas A, D, E, cálcio, sódio e potencial energético, diferente do leite de mãe de RNT²⁰⁻²².

Se o leite da mãe não está disponível, o LH processado em bancos de leite é outra boa opção^{23,24}. Embora esse leite de *pool* de banco de leite seja uma alternativa segura e viável para o RNPT²⁵, pode não ser nutricionalmente adequado ao prematuro²⁶. Aditivos industrializados, derivados de hidrolisado protéico heterólogo, estão disponíveis e são recomendados para satisfazer a necessidade nutricional das crianças. Existe uma variedade de aditivos de LH, a maioria preparada à base de proteínas, carboidratos, cálcio, fósforo, magnésio e sódio, que também podem conter zinco, cobre e vitaminas²⁷. A adição desses nutrientes ao LH garante a obtenção de taxas de crescimento apropriadas aos RNMBP, sem afetar o esvaziamento gástrico e a tolerância alimentar. Vale ressaltar que a manipulação do LH não é isenta de riscos. A adição de substâncias exógenas altera a osmolaridade e afeta propriedades intrínsecas de defesa do LH²⁸⁻³¹.

O índice de proteína total do LH é o mais baixo entre todos os mamíferos devido ao crescimento relativamente lento da criança³²⁻³⁴ e entre as proteínas do LH estão incluídas caseína, carnitina e lactoalbuminas³⁵⁻³⁹.

Os avanços da neonatologia proporcionaram o aumento da sobrevivência de prematuros⁴⁰. Para essa realidade, contribuíram os estudos

sobre ventilação, controle de infecção, suporte hemodinâmico e nutricional. O comitê de nutrição da Academia Americana de Pediatria (AAP) recomenda como dieta ideal para o RNPT aquela que garanta crescimento semelhante ao do feto em ambiente intra-uterino, e que não imponha sobrecarga ao sistema metabólico e excretor ⁴¹ além de oferecer um bom desempenho neurológico, que contorne os possíveis comprometimentos adquiridos no periparto ⁴².

O RNPT, especialmente os que necessitam de tratamento intensivo, apresentam risco de desenvolver problemas nutricionais e de crescimento, relacionados com a imaturidade das funções orgânicas e bioquímicas⁴³.

Um dos fenômenos imaturos é a motilidade intestinal que não é bem coordenada, o que dificulta a utilização de grandes volumes e pode limitar a frequência das dietas. Pode ser melhorado com alimentação enteral precoce⁴⁴ fenômeno este que, retarda o trânsito intestinal e o esvaziamento gástrico gerando resíduo e distensão abdominal⁴⁵.

Os RNPT têm pouco estoque de nutrientes e não toleram privação, se estão sobre estresse. Deve-se iniciar o suporte nutricional nas primeiras horas de vida, não esquecendo que a nutrição enteral deve ser iniciada assim que possível⁴⁶. Para suprir essas necessidades calóricas o RNPT deve receber nutrientes de acordo com sua capacidade de digestão, absorção e metabolização.

Quanto aos aminoácidos (aa) e proteínas estudos têm demonstrado que para manter o balanço nitrogenado zero ou positivo há necessidade de infusão de proteínas desde o primeiro dia de vida na quantidade de 1 a 2 g/kg/dia⁴⁶. Outros autores têm demonstrado que não só a quantidade é importante, mas, a qualidade dos aa⁴⁷. As necessidades de macro e micronutrientes para RNPT diferem conforme os autores. As proteínas são fundamentadas na taxa de incorporação fetal com variação de 3 a 3.8g/Kg/dia, para a AAP 2,25-5,0g/Kg/dia. Os carboidratos 8 a 12 g/kg/dia e a gordura com 3 a 4g/kg/dia ⁴⁸. Dois terços do conteúdo mineral do RNPT são depositados nos últimos dois meses de gestação, portanto para manter o crescimento pós-natal e o balanço eletrolítico de crianças de muito baixo peso, há necessidade de quantidades elevadas por quilo de peso de cálcio e fósforo ⁴⁹.

O RNPT tem suas necessidades hídricas diárias relacionadas com a estabilidade clínica, onde esta pode ser aumentada gradativamente ou

diminuída, recomendando-se um volume total de 150 a 200ml/Kg/dia⁴⁸. Este volume pode ser alcançado em RNPT saudável, já os de RNMBP, este volume dificilmente será alcançado, ocasionado déficit nutricional.

Para suprir a necessidade nutricional do RNPT à indicação de utilizar como alimento o LH ou leite da própria mãe do RNPT. Ainda existem controvérsias a respeito da composição ideal, especialmente no que se refere aos níveis de proteína e minerais. Esses aspectos explicam a complexidade em se alimentar RNPT, incentivando a buscar melhores métodos para assegurar os seus requerimentos nutricionais⁵⁰.

Em estudo comparativo entre a composição do leite de nutrizes de RNPT e RNT³⁶, demonstrou-se que as concentrações de proteína, gordura e sódio estão mais elevados. Outro estudo analisou a composição de macro e micro nutrientes em 46 amostras de LH de banco (LHB) em diferentes fases (maduro e colostro de mães de RNPT) constatando que valores de proteínas e minerais com exceção do zinco, eram inferiores às necessidades dos RNMBP². A superioridade do LH está fundamentada em propriedades imunológicas, anti-infecciosas e nutricionais³⁹, sendo que a proteína humana é de melhor qualidade e digestibilidade para o ser humano^{51,52}.

Apesar de todas as vantagens do LH de banco de leite, quando este for usado exclusivamente na alimentação de RNPT, têm sido evidenciadas baixas taxas de crescimento e deficiências nutricionais⁵³. Uma das razões é a ampla variação do conteúdo de calorias e proteínas, conseqüente das diferenças de métodos de coleta e estocagem do leite, pelos diferentes períodos de lactação que caracterizam as doadoras e no conteúdo de cálcio e fósforo. Embora não mude ao longo da lactação, permanece baixo para as necessidades metabólicas de RNMBP⁵⁴.

A descoberta de que o leite produzido pela mãe do RNPT contém teores mais altos de proteínas, teor calórico e concentração de eletrólitos do que o leite de mães de RNT trouxe novo estímulo para o uso do LH na alimentação de RNPT⁵⁵. Investigadores não confirmaram estes achados, pois observaram que o maior aporte de nutrientes no leite de mães de RNPT apenas se mantinham no estágio inicial da lactação, diminuindo progressivamente⁵⁶. A utilização de hidrolisados protéicos heterólogos com maior concentração e densidade protéico-calórica demonstraram ao longo da história que o

crescimento ocorre mais rapidamente. No entanto, também evidencia efeitos adversos, já que o maior teor protéico pode levar a um maior valor de nitrogênio uréico no sangue e alterar o perfil de aa plasmáticos⁵⁶.

Foram estudados dois grupos de RNPT, um grupo alimentado com leite de banco de leite (LHB) e outro com hidrolisado protéico heterólogo, grande parte das crianças alimentadas com hidrolisado protéico heterólogo apresentou valores de determinados aa acima do padrão de referência que por outro lado, houve crianças alimentadas com LHB que apresentaram valores abaixo desse limite⁴⁷.

Outro trabalho analisou três tipos de leite: LHB, LH evaporado e LH fortificado. Observaram que as dietas utilizadas determinavam deficiências de aa em relação aos padrões de referência e embora o ganho de peso tenha sido maior nos grupos alimentados de LH com aditivo, que contém maior quantidade de proteínas, a quantidade de aa encontrou-se abaixo do valor preconizado para os RNPT de acordo com a taxa de crescimento intra-uterino⁵⁷.

As fórmulas com hidrolisado protéico heterólogo para RNPT seguem as recomendações protocolares como, por exemplo, da AAP, o RNPT alimentado com proteína heteróloga ganha mais peso, crescimento linear e diminuí a incidência de doença metabólica óssea, porém tem maior risco de desenvolver enterocolite necrozante, além das desvantagens no desenvolvimento psicomotor e desempenho intelectual⁴³.

Uma alternativa na alimentação do RNPT é o uso do LH com acréscimo de um aditivo, pois aumenta significativamente a taxa de crescimento expressa como ganho de peso, comprimento linear e perímetro cefálico⁵⁸. Se esse LH for o da própria mãe do RNPT haveria benefícios no desenvolvimento além de potencializar a duração da lactação^{59,60}.

As mães de RNPT precisam ser encorajadas e orientadas precocemente a iniciarem a ordenha manual, estimulando a lactação. Quanto maior for o intervalo do início da estimulação pela ordenha, a inibição da ejeção do leite em decorrência dos fatores psicológicos envolvidos com seu RNPT pode acabar por determinarem insuficiência láctea⁶¹. Deste modo, assim como ocorre com o colostro, a disponibilidade do leite de nutrizes de RNPT é limitada nos bancos de leite, tornando inviável a utilização em larga escala. No caso do

LH processado em banco de leite, a composição de macro e micronutrientes podem ser inadequadas para RNMBP, porque as necessidades desses nutrientes são maiores nesse grupo em função de perdas associadas à coleta, armazenagem e procedimentos da alimentação ².

Autores sugerem a suplementação do LH de preferência com nutrientes do próprio LH sem a adição de substâncias exógenas⁶¹. Assim há preocupação em evitar o catabolismo e oferecer aa de maneira adequada o que leva a busca de métodos alimentares complementares.

O ganho de peso está associado ao conteúdo de proteína e caloria, porém a oferta protéica está ligada à quantidade e qualidade, em que níveis protéicos excessivos estariam ligados ao aumento do nível plasmático de aa potencialmente tóxicos⁶¹.

Ao desenvolver ⁵⁷ um concentrado de LH para RNPT pesquisadores evaporaram o LH para um quarto do volume inicial, verificou que os nutrientes tiveram aumento médio de 3 a 4 vezes em suas concentrações com exceção da gordura e fósforo que apresentaram declínio, relacionado à manipulação do leite.

Estudo⁵⁷ determinou o perfil dos aa plasmáticos de RNPT, alimentados com diferentes dietas, sendo: LH fortificado com hidrolisado protéico heterólogo, LH de banco evaporado e LHB, com esse estudo reforçou a necessidade da adequação da dieta específica para o prematuro, já que o LHB tem predominância de leite maduro com baixa concentração de proteína, e que, adicionar fortificante não foi suficiente para atingir às necessidades dos RNPT. A autora relata a necessidade de utilizar como método de controle de qualidade, o *pool* de leite de doadoras, que reduz a variabilidade dos macronutrientes do LHB.

Promover boa nutrição é fator importante na melhora dos índices de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento dos RNPT. Nas unidades de terapia intensiva (UTI) neonatal, nos deparamos com um grande desafio: nutrir esses recém-nascidos.

A maioria dos grandes avanços e melhorias notáveis tem vindo de técnicas especializadas e melhor experiência dos neonatologistas, enfermeiros e outros trabalhadores da saúde que tem desempenhado um papel importante. Somado a isso, a capacidade de melhorar a saúde dessas crianças

frágeis também inclui uma variedade crescente de estratégias nutricionais, incluindo novas fórmulas e aditivos de leite^{62,63}.

Até o início do século 19, uma ama de leite era a única alternativa segura para a amamentação, sendo uma das razões que cada espécie tem uma composição única do seu leite. Quando as técnicas de análises químicas de leite e avaliação das necessidades energéticas das crianças tornaram-se disponíveis durante o século 20, substitutos do LH razoavelmente seguros começaram a ser desenvolvidos. Sucessivamente, foram desenvolvidos hidrolisados protéicos heterólogos para lactentes, tendo como referência a composição do LH. Mesmo com uma composição semelhante ao LH, existem diferenças no desenvolvimento e desempenho cognitivo entre crianças alimentadas com fórmulas e crianças amamentadas. Novas técnicas podem contribuir para minimizar essas diferenças permitindo a produção em larga escala de proteínas recombinantes de LH. Embora o valor nutricional do LH tenha sido amplamente estudado, há poucos relatos descrevendo a sua composição de aa, embora as fórmulas sejam projetadas para aproximar a composição nutricional do LH, o conteúdo e a concentração de aa ainda são desconhecidos^{64, 65}.

A importância de estudar nutrição em prematuros leva a reflexão, não só das características da prematuridade, de uma limitada capacidade de absorção e digestão, mas principalmente a importância da fragilidade de metabolização de aa devido à imaturidade das enzimas envolvidas, podendo acarretar acúmulo ou carência em função da dieta recebida, podendo causar, dependendo da qualidade da proteína, diferenças nos níveis de aa⁶⁶⁻⁷⁰.

Alguns estudos contribuíram para a afirmação de que determinados nutrientes oferecidos em determinados momentos da vida de um indivíduo está relacionado com a programação das células para um determinado fenótipo futuro, fazendo com que a atenção voltasse mais para a qualidade dos nutrientes ofertados e priorizasse o LH, também na alimentação de RNPT, tornando-o padrão ouro na qualidade dos nutrientes para esta população⁷¹⁻⁷⁷.

Alguns aa devem estar presentes na dieta para satisfazer as necessidades do organismo, como conseqüência, a qualidade nutricional das proteínas pode ser determinada pelo tipo e pela quantidade de seus aa constituintes⁷⁸.

Como o principal constituinte nutricional para o RNPT em crescimento é a proteína, uma vez que ela participa da composição de todas as estruturas celulares, esta pode constituir um indicador razoavelmente confiável para a avaliação da adequação nutricional nesses RNPT. Desta maneira a imaturidade bioquímica resulta em um desenvolvimento incompleto de etapa do metabolismo de aa o que estreita a margem entre uma oferta protéica adequada e possíveis efeitos decorrentes^{79,80}.

A maior incorporação de proteína durante a vida ocorre antes de 32 semanas de gestação^{81,82}. Entre 24 a 30 semanas as exigências de aa são de 3,6-4,8g/kg/dia e entre 30 a 36 semanas diminui a taxa de crescimento fracionário, assim como a exigência de aa para o crescimento com 3,0g/kg/dia⁸⁴⁻⁸⁶.

Os RNPT com menos de 1.000g que recebem somente glicose perdem 1,2g/kg/dia de proteínas endógenas. O oferecimento de aa, mesmo com a baixa ingestão de energia, economiza a proteína endógena por aumentar a síntese protéica, diminuindo assim a diferença entre proteólise e síntese de proteínas. Estudos demonstram que infusão de aa pode ser iniciada já no primeiro dia de vida. Uma ingestão maior de calorias diminui a proteólise, e uma maior ingestão das duas, proteína e calorias, leva ao anabolismo. Portanto, para evitar toxicidade de aa é fornecer quantidade necessária para síntese de proteínas e, para se ter crescimento, é dar a quantidade certa na hora certa^{87, 88}.

Estudo afirma que a oferta precoce de aa melhora a ingestão calórica de RNPT, particularmente o LH pode ser iniciado dentro dos primeiros dias de vida, diminuindo danos hepáticos e icterícia associada⁸⁹.

Enquanto no LH a composição dos aa é adequada, nos hidrolisados protéicos heterólogos a qualidade deles pode estar comprometida. É sabido que os RNPT alimentados com LH apresentam menos desbalanço protéico comparados àqueles alimentados com leite de outras fontes animais, e isso se devem ao fato da proteína do LH apresentar uma composição de aa ímpar que só existe no LH. O perfil dos aa depende da qualidade da proteína ofertada que esta relacionada ao desenvolvimento neurológico em curto e longo prazo^{90, 91}.

Com grande interesse autores concluíram que alta dose de adição de aa na dieta não melhorou o crescimento neonatal, e pode até ser desfavorável em

termos de tolerância metabólica (aumento de aa no sangue e níveis de nitrogênio da uréia) ⁹².

Tem sido argumentado que o excesso de proteína é desnecessário sobre os órgãos imaturos, e que a adição de aa livres parece não fisiológica e as conseqüências metabólicas de fazê-lo são largamente desconhecidas⁹³.

A concentração elevada de certos aa no sangue de RNPT apresenta preocupação, assim como concentrações muito baixas como por exemplo a fenilalanina. É observado que essas diferenças podem afetar respostas hormonais e possivelmente alteram o transporte de alguns aa através da barreira hemato-encefálica⁹⁴.

Poucos estudos têm avaliado padrões de aa em RNT como em RNPT, alimentados com hidrolisados protéicos heterólogos por longo período de tempo, certas conseqüências em longo prazo são difíceis de avaliar, porém estudos afirmam que o impacto de maior consumo de proteína na dieta pode resultar em anomalias do desenvolvimento neurológico e um deficiente desenvolvimento intelectual ⁹⁵⁻⁹⁷.

Recentemente têm se mostrado que o crescimento do cérebro do RNPT é menor do que o de RNT, esse crescimento reduzido do cérebro esta associado com atrasos cognitivos, e a nutrição do RNPT com dietas enriquecidas aditivadas com o próprio LH leva a um cérebro melhor desenvolvido e com melhora significativa da função cognitiva ⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Vários métodos podem ser utilizados para avaliar a adequação da dieta no RNPT. As medidas antropométricas utilizadas para monitorar a nutrição fornecem uma visão qualitativa e quantitativa de crescimento. Consistem na determinação do peso e das medidas do comprimento, perímetro cefálico e pregas cutâneas, que representam uma resposta corpórea global aos nutrientes e constituem a avaliação mais prontamente disponível, requerendo o mínimo de instrumentalização⁹².

A avaliação do peso é considerada o padrão ouro para a avaliação do crescimento pós-natal. Entretanto, medida isolada do peso não pode ser considerada um indicador acurado da massa corpórea magra por não distinguir entre ganho de massa e de líquido e, portanto, deve ser avaliado em conjunto com outras medidas como comprimento e perímetro cefálico. A taxa esperada de ganho de peso fetal durante o último trimestre da gestação é de 10 a

15g/kg/dia¹⁰¹, as avaliações antropométricas têm utilidade no acompanhamento da evolução do crescimento do RNPT.

O comprimento é menos susceptível a efeitos das mudanças na composição corpórea e permite uma melhor estimativa do ganho em massa corpórea não gordurosa não sofre interferência do grau de hidratação e a taxa esperada de crescimento fetal, em comprimento, durante o último trimestre de gestação é de 0,75 cm/semana¹⁰¹. Porém, se o comprimento não for medido por períodos longos de observação, não permitirá reprodutibilidade.

O perímetro cefálico constitui uma medida indireta do crescimento cerebral, sendo importante tanto ao nascer quanto em estudos longitudinais. A taxa esperada de crescimento do perímetro cefálico durante o último trimestre da gestação é de 0,75 cm/semana¹⁰¹.

Em se tratando de aa, o estudo da qualidade protéica, a avaliação da proteína e composições de aa nas diversas preparações de dietas é geralmente conduzida a compará-las com LH. Com essa comparação, considerou-se que, os hidrolisados protéicos heterólogos, apresentam mais proteína por unidade de volume que o LH, e observou que existem diferenças na composição de soro-caseína e aa nas duas espécies⁷⁹.

1.1 Aminoácidos

A fenilalanina, aa essencial, necessário ao crescimento e desenvolvimento normal. É um transportador celular cerebral e se deve ter um balanço cuidadoso ao fornecer fenilalanina evitando que eleve o nível de fenilalanina, pois em excesso sofre transaminação em ácido fenilpirúvico, com prejuízo do transporte dos aa do plasma para o cérebro, provocando acúmulo de fenilalanina no SNC. A formação de metabólitos tóxicos no cérebro perturba os processos essenciais no cérebro, como a mielinização e a síntese de proteína, com déficits na interação cerebral e cognitiva (atenção, memória, linguagem, aprendizagem e funções executivas)⁵⁷.

A fenilalanina, depois de sua hidroxilação para formar tirosina, é precursora dos hormônios epinefrina e norepinefrina, do neurotransmissor dopamina e da melanina. A fenilalanina e a tirosina são cetogênicas e glicogênicas. Estudos realizados com fenilalanina têm demonstrado que ela

não é uma fonte adequada de tirosina, por isso estima-se a exigência diária de vários aa essenciais e não essenciais durante o período de crescimento neonatal acelerado⁷⁹.

Aumentando a ingestão de fenilalanina, ocorre a inibição da enzima tirosinase, aumentando a disponibilidade de tirosina, ocasionando um efeito deletério no desenvolvimento cerebral podendo ocasionar déficit de memória e dificuldade de atenção, concentração e distúrbio do sono. Supõe-se que a tirosina elevada nas primeiras semanas de vida tenha um efeito deletério para o SNC em desenvolvimento⁵⁷. Assim como a metionina, um aa essencial é fonte de cisteína para a síntese de glutathione. Sugere que o RNPT é incapaz de converter metionina em cisteína em quantidade significativa⁵⁷.

Já a treonina é um aa indispensável utilizado em uma grande quantidade pelas vísceras. Uma proporção equivalente a 90% de treonina na dieta é retida pelo intestino. A alta necessidade de treonina presumivelmente reflete a taxa elevada de síntese de mucinas, portanto, a treonina pode ser um dos aa essenciais para manter a camada de muco protetor com função de barreira intestinal. Uma barreira intestinal intacta é de grande importância tanto para garantir a oferta adequada de nutrientes na dieta para todo o corpo e prevenir doenças relacionadas ao intestino. Por isso a integridade da barreira mucosa desempenha um papel crucial em nutrição. Porém o excesso de uma dieta de treonina em RNPT pode ser neurotóxica ou apresentar conseqüências comportamentais negativas⁵⁷.

A glutamina pode ser um aa condicionalmente essencial em RNPT, é abundante nos compartimentos intra e extracelular, possui muitas funções no organismo, sintetizado por todos os tecidos do corpo, sendo um combustível primário oxidativo para enterócitos e linfócitos, portanto um importante transportador de carbono e nitrogênio, fonte de combustível importante para as células do sistema imunológico e gastrointestinal. Age na síntese de ácidos nucléicos (glutathione, citrulina, arginina, ácido gama-aminobutírico e glicose), importante para o crescimento. Os efeitos da glutamina sobre o SNC, durante o suporte metabólico, lesão tecidual e doença crítica são bastante relevante⁵⁷.

A histidina é um aa essencial que é obtido a partir da dieta, portanto o RNPT não produz histidina, sendo regulados pela ingestão e excreção. Está envolvida nos processos bioquímicos de respostas imunológicas assim como

desempenha função reguladora fisiológica intestinal além de atuar como neurotransmissor, presente nos mastócitos e basófilos⁵⁷.

A glicina é um aa simples, não essencial, sintetizado principalmente a partir da serina e treonina. Na membrana plasmática, ativa um canal de cloro que estabiliza ou hiperpolariza o potencial de membrana. Como consequência, bloqueia a entrada intracelular de cálcio, que vai estimular a cascata de formação de citosinas⁷². Seu acúmulo nos fluidos corporais se caracteriza por sintomas neurológicos, efeito antiinflamatório, imunomodulador e citoprotetor, prevenção de lesões por isquemia em uma variedade de órgãos e tecidos como fígado, rim, coração, intestino e músculo esquelético.

A lisina é um dos oito aa essenciais, ou seja, não é sintetizado pelo organismo. O metabolismo de lisina é elevado e ocorre primeiramente pelo intestino em prematuros, a lisina tem um efeito direto na disponibilidade sistêmica, é usada principalmente para a síntese de proteína e atua como um precursor para a síntese de carnitina. Carnitina é uma molécula endógena envolvida no metabolismo dos ácidos graxos, biosintetizada dentro do corpo humano utilizando aminoácidos: L-lisina e L-metionina⁷⁹.

A leucina tem um papel importante na formação da retina e do SNC, além disso, como é um aa de cadeia ramificada, apresenta um efeito estimulador sobre a síntese da proteína, observado no músculo esquelético em crescimento, é um mediador de inflamação aguda e pode desempenhar um papel local de maturação no intestino humano em desenvolvimento⁵⁷.

Considerando o exposto, este estudo foi feito uma análise comparativa da composição nutricional de aa do LH de banco acrescido de FM85[®] com o LH modificado (evaporado e liofilizado).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil de aminoácidos plasmáticos de recém nascidos pré-termo muito baixo peso alimentados com três diferentes dietas de leite humano de banco de leite modificado.

- Recém nascidos pré-termo alimentados com leite humano de banco de leite, aditivado com FM85[®] (NESTLÉ[®]).
- Recém nascidos pré-termo alimentados com leite humano de banco de leite, aditivado com leite humano modificado evaporado.
- Recém nascidos pré-termo alimentados com leite humano de banco de leite, aditivado com leite humano modificado liofilizado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Estudar o crescimento dos recém nascidos pré-termo alimentados com as dietas propostas, comparando medidas de peso, comprimento e perímetro cefálico.

2.2.2 Avaliar e comparar o perfil de aminoácidos nos recém nascidos pré-termo alimentados com as diferentes dietas:

2.2.3 Avaliar os marcadores de função renal: uréia, creatinina e albumina nos recém nascidos pré-termo alimentados com as diferentes dietas.

3. METODOLOGIA

3.1 Estudo da população - Amostra

Por se tratar de experimento clínico e de utilização de material biológico o projeto dessa pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da UFMS (anexo I).

Após parecer favorável, foram estudados 30 RNPT, de ambos os sexos, internados no setor de neonatologia do Núcleo do Hospital Universitário (NHU) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

Foram incluídos os RNPT que apresentaram idade gestacional inferior a 34 semanas, com peso de nascimento igual ou inferior a 1.500 kg, adequados ou não para idade gestacional, estáveis clinicamente e sem qualquer malformação congênita.

Não foram incluídos RNPT portadores de patologias congênitas, com distúrbios metabólicos, anemia, qualquer doença em atividade (distúrbios respiratórios, manifestações do SNC e gastrointestinal) ou que apresentaram patologias ocasionando piora do quadro infeccioso.

Durante a coleta de dados não foram incluídos os RNPT que receberam LH em livre demanda (sucção ao seio) e aqueles cujas mães tinham leite suficiente para alimentar seus filhos.

A idade gestacional foi avaliada pelo método de Ballard¹⁰⁵. O crescimento dos RNPT foi acompanhado através da avaliação do peso, comprimento e perímetro cefálico, semanalmente, aferido sempre pelo mesmo examinador.

A introdução da dieta, escolha do método e a determinação do volume total a ser ofertado para os RNPT, foram realizadas pelo médico plantonista do setor ou pelo médico visitador, seguindo a padronização do serviço de neonatologia do NHU da UFMS.

No período precedente ao estudo, os RNPT foram submetidos às normas de rotina do serviço de neonatologia do NHU em que a padronização do serviço define que a introdução da alimentação enteral para os RNPT depende fundamentalmente das suas condições clínicas. Para dar início à alimentação enteral, os RNPT deveriam preencher segundo os critérios: ativo e

reativo, hemodinamicamente estável e com a necessidade de oxigênio na fração inspirada (FiO_2) menor que 40% e frequência respiratória menor que 60 respirações por minuto, sem distensão abdominal, estase de conteúdo gástrico ou vômitos, sem nutrição parenteral. Todos os RNPT faziam uso de antibióticoterapia endovenosa profilática e não receberam albumina durante a coleta de dados.

O volume de leite por oferta, ou seja, o volume – mamada, recebido a cada 3 horas pelos RNPT que fizeram parte dos três grupos de estudo foi definido a partir do protocolo de serviço sem interferência do pesquisador e o leite para alimentação foi somente feito se liberado pelo controle de microbiologia e qualidade do banco de leite. Estes dados foram obtidos a partir das prescrições médicas diárias.

Os RNPT receberam a dieta específica do grupo a que iriam pertencer somente quando atingissem a dieta enteral total (100ml/kg), plena e com boa tolerância. Portanto os RNPT fizeram parte dos grupos, assim que iniciaram a alimentação completa por sonda gástrica.

Após os pais ou responsáveis serem informados quanto à natureza do trabalho e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice I), os prematuros foram locados de forma aleatória por sorteio prévio em três grupos determinados previamente de acordo com o tipo de dieta que receberiam.

Cada grupo foi formado por 10 RNPT, diferenciado conforme a alimentação ofertada. Foram eles:

- Grupo I: RNPT alimentado com leite humano de banco de leite, aditivado com 5% de FM85[®] (marca NESTLÉ[®]). Determinado pela sigla **LHB-FM85[®]**;
- Grupo II: RNPT alimentado com leite humano de banco de leite aditivado com leite humano modificado: evaporado a 20% com extração prévia da gordura e lactose acrescido em 80ml de leite humano pasteurizado. Determinado pela sigla **LHB-E**;
- Grupo III: RNPT alimentado com leite humano de banco de leite, aditivado com leite humano modificado: liofilizado na forma de pó de leite humano com extração prévia da gordura e lactose, acrescido a 100ml de leite humano pasteurizado. Determinado pela sigla **LHB-L**.

3.2 Método

3.2.1. O trabalho foi realizado em três etapas:

- ❖ **I. Primeira** etapa incluiu o preparo dos aditivos derivados do LHB de leite e análise dos constituintes destes leites modificados:
 - FM85[®]
 - LHB-E¹⁰⁶
 - LHB-L¹⁰⁷
- ❖ **II. Segunda** etapa incluiu a seleção dos RNPT, a coleta do sangue no início e final da alimentação programada de cada criança dos três grupos, avaliação antropométrica e bioquímica.
- ❖ **III. Terceira** etapa corresponde à análise do perfil de aminoácidos.

I. Primeira etapa

Preparo dos aditivos e análise dos constituintes

Para o preparo dos aditivos, o LH empregado foi de mães doadoras voluntárias, cujos filhos nasceram a termo, com período de lactação entre dois meses e um ano (leite maduro). As amostras de LH natural foram ordenhadas por meio de expressão manual em domicílio, no posto de coleta de LH no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul - HRMS ou no banco de LH do NHU.

Para que os leites modificados não tivessem que ser pasteurizados duas vezes, foi iniciado o processamento utilizando apenas o LH, que teve na análise de titulação de acidez (Acidez Dornic) valor menor ou igual a dois e a pasteurização ocorreu no final do processo seguido da análise microbiológica.

Durante o processamento das dietas modificadas de LH, houve a preocupação de manter as suas características físico-químicas e o menor grau de contaminação. Assim todos os cuidados foram tomados como abaixo descrito:

Para o descongelamento do leite foi usado um recipiente previamente higienizado a cada preparo (banho-maria). As peças da desnatadeira de aço inox que ficam em contato com o leite foram autoclavadas. O fracionamento

das alíquotas de 80ml de leite para serem evaporados foi feito em recipientes esterilizados, assim como também o balão de vidro do evaporador para o leite. O leite já evaporado foi acondicionado em tubos cônicos de plástico esterilizados em óxido de etileno para encaminhamento da retirada de lactose.

Todo o procedimento de manuseio do LH foi realizado em capela de fluxo laminar (LABCONCO®). Foi utilizado equipamento estéril seguindo às normas para tal procedimento, como a desinfecção das mãos, o uso de luvas, máscara, avental e gorro.

Com relação aos possíveis contaminantes nas dosagens de macro e micro elementos, as vidrarias e os recipientes plásticos que armazenaram as amostras foram lavados de acordo com recomendações do “*Standard methods for the examination of water and wastewater*”: lavar os recipientes, vidros e plásticos, inicialmente em água corrente; colocar os materiais mergulhados em EXTRAN neutro a 2%, durante 24 horas. (Preparo do EXTRAN a 2%, é diluindo 20ml do detergente em 1000ml de água deionizada - Miliquê); colocar os materiais em ácido nítrico 30%, por 24 horas. Esses materiais devem ser totalmente mergulhados na solução de ácido. Para isso foi utilizado recipiente contendo a solução ácida, e, dentro dele recipientes menores com alça e fundo furado, como peneira para facilitar a retirada dos materiais. Após a retirada, eles foram enxaguados um a um, com água deionizada, por dez vezes; a secagem foi feita em estufa a 40°C; a armazenagem em recipiente e o manuseio de todo o material foi feito usando luvas plásticas e estéreis.

A. Preparo do aditivo do Grupo I - LHB-FM85 (NESTLÉ®)

Aditivo lácteo em pó, comercializado pela companhia Nestlé®, destinado a enriquecer o LH, indicado para alimentar RNMBP. Apresentado na forma de envelope com 1g, para o seu preparo cada envelope é adicionado em 20ml de LHB ou preparado na proporção de 5g de FM85® (colher medida padrão) para cada 100ml de *pool* de LH, conforme determinação do fabricante.

Os RNPT foram alimentados com LHB, acrescido com aditivo FM85(NESTLÉ®). O LH foi processado em banco de leite cuja proteína corresponde a um composto de proteínas hidrolisadas hipoalergênicas de lactalbumina bovina, associada à maltose-dextrina e minerais.

O leite foi pré-aquecido antes de ser ofertado ao lactente com dieta enteral plena.

B. Preparo do aditivo do Grupo II - LHB-E

O preparo de LH modificado evaporado foi feito em três etapas: desnate, evaporação e retirada da lactose.

1. Desnate - Retirada da Gordura

Após descongelamento de 230ml de leite cru, ele foi desnatado. A retirada da gordura foi feita com uma desnatadeira do tipo 18GR-100 litros/hora da marca Alfa Laval[®] (Figura 1), que gira em alta velocidade e submete o leite à elevada força centrífuga. Devido a sua menor densidade, a gordura, durante a rotação, fica próxima ao eixo da desnatadeira, sendo drenada por um pequeno orifício, enquanto que os outros componentes, de maiores densidades, são lançados às paredes e posteriormente para o exterior por outra saída. É sabido que em média nesse processo ficam retidos 150ml de leite. Após desnate, o volume de leite é fracionado em 80ml e encaminhado para o evaporador, à próxima etapa.

2. Evaporação do leite humano

A metodologia de evaporação do LH segue de um estudo já proposto¹⁰⁸. Para evaporar o leite foi utilizado um evaporador rotativo a vácuo, Rotavapor-RE da “Buchi”, da marca MARCONI MA 120i[®] (Figura 2),

O evaporador é composto de um recipiente aquecido e controlado eletronicamente, contem um balão de vidro em que acondiciona o leite. Este recipiente em forma de um balão fica imerso em banho-maria e conectado a um sistema de serpentina que flui água em temperatura ambiente. A serpentina envolta em uma cápsula de vidro, integrado ao recipiente de amostra possibilita a condensação do vapor de água devido ao vácuo gerado por uma bomba de vácuo acionada pelo operador a temperatura de 60°C com pressão em 62 mmHg.

Os 80ml restantes de LH de banco de leite sem gordura são evaporados e o volume é reduzido para 20ml, com concentração da lactose.



FIGURA 1 - Desnatadeira Alfa Laval®

3. Retirada da lactose

Durante a evaporação, as amostras de leite são concentradas em pequenos volumes de teor mineral e protéico e para que ocorra saturação da lactose presente no leite. Conseqüentemente ocorre a crioprecipitação quando submetidas ao congelamento e centrifugação.

Para a precipitação e posterior retirada da lactose, o LH já evaporado foi acondicionado a -20°C em tubo plástico cônico com tampa esterilizada por um período de 24 horas, após esse período, o leite foi centrifugado a temperatura de 4°C a 4000 rpm, durante 20 minutos em centrífuga da marca SIGMA 3K30® (Figura 3), formando um precipitado de lactose. Para facilitar o descarte deste precipitado, o leite foi aquecido em banho-maria a 37°C , e com uma pipeta de vidro estéril (pipeta Pasteur) foi retirado o sobrenadante, desprezado por fim, a lactose (Figura 4).

Após o desnate, evaporação e retirada da lactose, dos 80ml iniciais do LH, restou aproximadamente $15\pm 2\text{ml}$. Este volume restante de leite foi

encaminhado ao banco de LH e adicionado aproximadamente 65 ± 2 ml de *pool* de LH totalizando novamente o volume inicial de 80ml de leite.



FIGURA 2 – Rotaevaporador MARCONI®



FIGURA 3 - Centrifuga refrigerada SIGMA 3K30®



FIGURA 4 – Precipitado de lactose depois da retirada do sobrenadante.

C. Preparo do aditivo do Grupo III – LHB-L

O preparo de LH de banco modificado liofilizado foi feito em quatro etapas: desnate, evaporação, retirada da lactose e liofilização.

Os equipamentos utilizados nas etapas de desnate, evaporação e retirada da lactose do preparo do LH de banco modificado evaporado são os mesmos utilizados para o preparo do LH de banco modificado liofilizado.

1. Desnate - Retirada da Gordura

O processo de retirada da gordura para o preparo do LH de banco liofilizado é igual ao processo de retirada da gordura para o preparo do LH de banco evaporado.

2. Evaporação e Retirada de Lactose

O processo de evaporação e retirada de lactose para o preparo do LH de banco liofilizado é igual ao processo de evaporação e retirada de lactose para o preparo do LH de banco evaporado. Difere somente quanto ao volume inicial de 70ml.

3. Liofilização

O conteúdo de leite transferido para o vidro na etapa anterior foi congelado a -20°C por um período de 24 horas e depois condicionado em um aparelho liofilizador de bancada da marca EDWARDS® (Figura 5) para serem submetidos a vácuo por um período de 48 horas, o pó de leite foi retirado do equipamento e enviado ao banco de LH para ser reconstituído com 100ml de *pool* de LH de banco, pasteurizado e submetido à análise microbiológica.



FIGURA 5 - Liofilizador (EDWARDS®).

II. Segunda etapa

Seleção do RNPT, amostras de sangue para dosagem de aminoácidos, avaliação antropométrica e dos marcadores renais.

A. Seleção dos prematuros

Após seleção prévia dos RNPT de acordo com critérios de inclusão, no momento em que o RNPT deu início a alimentação específica do grupo a que pertenceu foi preenchido uma ficha padrão constando os dados relevantes para a pesquisa em questão. Os RNPT foram acompanhados desde que iniciaram a alimentação dos leites modificados por 15 ± 2 dias.

B. Amostras de sangue para dosagem de aminoácidos

Para a análise dos aa plasmáticos foram colhidos uma amostra de sangue venoso pré-prandial (2h30min à 3h após a última mamada) por punção percutânea com seringa contendo três gotas de heparina (efeito anticoagulante) no início antes da primeira oferta da dieta modificada (dieta plena) e outra amostra no final (15 ± 2 dias de dieta) antes da última oferta da dieta modificada. A amostra foi condicionada em tubo de microcentrífuga (Ependorf) sendo o plasma devidamente separado por centrifugação (2500 rpm) durante 10 minutos, identificado e congelado a -20°C para posterior dosagem de aminoácidos, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

C. Avaliação antropométrica

Foi feita uma avaliação antropométrica semanal de acordo com a rotina de antropometria utilizado pelo serviço de neonatologia do NHU. O crescimento foi acompanhado através da avaliação do peso, comprimento e perímetro cefálico, aferido pelo examinador e auxiliado por um colaborador.

Os RNPT foram pesados em balança eletrônica infantil marca Filizola[®] sensível a 5g, tarada antes de cada pesagem, e os valores expressos em gramas. Na balança, antes de cada pesagem, foi feito assepsia com álcool 70° e forrada com papel toalha para todos os RNPT.

O comprimento foi mensurado com uma régua antropométrica (estadiômetro) modelo infantil, com prévia assepsia com álcool 70°. A medida foi feita da cabeça a planta dos pés, com o RNPT em decúbito dorsal; uma parte fixa apoiou a cabeça e outra parte móvel apoiou os pés, mantendo todo o corpo em extensão.

O perímetro cefálico foi mensurado com uma fita métrica flexível, inelástica graduada em centímetros e milímetros, foi usada como ponto de referência a medida da circunferência formada entre glabella - região occipital - glabella, com o RNPT em decúbito dorsal. A fita métrica também foi higienizada antes de cada medição com álcool a 70°.

D. Avaliação bioquímica dos marcadores de função renal

Conforme rotina do serviço de neonatologia foi colhida semanalmente de cada RNPT 1ml de sangue que foi posteriormente analisado quanto aos teores de uréia, creatinina e albumina.

III. Terceira etapa

Análise do perfil de aminoácidos

A. Análise do perfil de aminoácidos

Método de determinação de aminoácido no sangue

A determinação de aminoácidos foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, no laboratório da Empresa ELE (Exames laboratoriais e especialidades – Campinas/SP). As amostras foram transportadas dentro de um recipiente contendo gelo seco, com temperatura variando entre -30°C a -25°C, transportadas até o referido laboratório em que foi armazenada em congelador a -20°C até o momento do seu processamento para análise.

✓ O equipamento

O equipamento que foi utilizado, o Cromatógrafo Líquido de Alta Pressão da *Shimadzu Corporation*, fabricado no Japão, modelo LC-10. É um equipamento capaz de separar os aminoácidos de uma determinada amostra e cujos processamentos, reações pré-separação, são totalmente automatizados e comandados por computador. Consta dos seguintes módulos:

- *Bomba LC10AD*: responsável pelo transporte da fase A, uma solução de fosfato de sódio de 25 mm/l (milimolar/litro), pH 6,6. Essa solução corresponde a uma mistura de 20ml de acetonitrila, 20ml de metanol e 20 ml de tetraidofurano para cada litro de tampão fosfato de sódio.
- *Bomba LC10AD*: responsável pela fase B uma solução de metanol a 65%.

○ *Misturador de fases*: componente denominado CBM-10A, programado via computador, que faz a mistura das duas fases, o fluxo final do sistema corresponde a mistura das fases sendo de 0,8 ml/min, com gradiente linear e proporções de acordo com a tabela 1. As fases A e B são submetidas à pressurização com gás hélio, que promove a desgaseificação, ou seja, a remoção do oxigênio do sistema pela sua combinação como hélio. Esse procedimento evita que o oxigênio que se acumula no pistão das bombas forme bolhas que impeçam a aspiração e a injeção das fases no sistema.

○ *Auto injetor SIL-10 A*: funciona de acordo com a programação feita pelo computador em que promove a reação pré-coluna das amostras com o reagente OPA (Ortophital Dialdeído), que resulta em um complexo colorido, o qual posteriormente é captado em um detector de fluorescência. Constando de um *rack* com frascos numerados em que são colocadas as amostras analisadas, o padrão e o padrão interno contendo uma seringa com uma agulha que perfura os septos dos frascos para retirar alíquotas a serem misturadas e injetadas na coluna de cromatografia.

○ *Módulo CTO 10 A*: é o controlador da temperatura da coluna mantida a 25 °C durante o período das análises.

○ *Pré coluna*: a coluna é protegida por um sistema de filtro contendo resina, acoplado imediatamente antes da coluna, por onde passa toda a fase líquida móvel (fases, amostras após derivatização) antes de chegar à coluna cromatográfica e sua função é proteger e prolongar a vida útil da coluna.

○ *Coluna de sílica C 18*: é aonde ocorre a eluição ou separação dos aminoácidos de acordo com a polaridade e com o peso molecular de cada um. Coluna da Altech Associaes, Inc (USA), denominado Adsorbosphere OPA-HR de 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e contendo partículas de 5 µm.

TABELA 1 – Gradiente de mistura das fases A e B em função do tempo

<i>Tempo (min)</i>	<i>% fase A</i>	<i>% fase B</i>
0 – 1	84	16
36	0	100
41	0	100
41,10	84	16
55	84	16
55,10	Stop	Stop

- *Detector de fluorescência Shimadzu RF 535*: com lâmpada de xenônio cuja detecção dos aminoácidos é feita de 455 nm de emissão e 335 nm de excitação, detectando o complexo colorido, formado na derivatização entre a amostra e o reagente OPA, gerando um sinal elétrico, captado pelo detector que é transformado em gráfico chamado cromatograma. Com impressora HP modelo 670C.
- *Computador Microtec*: responsável por todos os comandos do equipamento de acordo com um programa seqüencial pré-estabelecido

✓ *A técnica*

O sangue descongelado foi primeiramente desproteinizado com metanol puro. Cada amostra que analisada foi pipetada (10 microlitros) e colocada em um frasco especial que recebeu uma numeração com o intuito de identificação. Outro frasco devidamente identificado recebeu o OPA, responsável pela chamada reação pré-coluna, está é uma substância que reagiu com o grupo amino dos aminoácidos que resultou em um complexo molecular colorido (isoindole) que foi captado pelo detector de fluorescência.

Para a preparação do OPA foram pesados 10 µg, adicionados 250 µl de mercaptoetanol. Outro frasco recebe a carboximetilcisteína (300 nanomoles/25microlitros), um aminoácido sintético, que não existe naturalmente em qualquer material passível de análise, e que por isso funciona como padrão interno. Em cada amostra analisada o padrão interno adicionado, por ser previamente conhecido, determina o erro da análise calculado pelo computador. O erro aceitável é de no máximo 10%. Todos os frascos identificados previamente foram colocados nas posições específicas do auto-injetor (*rack*), preestabelecidas na programação. O tempo de processamento para cada amostra desde a sua colocação no auto-injetor e inicialização da corrida pelo programa, até ser gerado o cromatograma foi em média 1 hora.

A primeira análise realizada, antes das amostras do estudo, é a do padrão de aminoácidos, mistura de aminoácidos conhecida como concentração de 25 nanomoles/5ml, que determina um cromatograma padrão, que serve para avaliar se o sistema está em equilíbrio, calibrado e, portanto, em condições de processar as determinações das amostras. De acordo com a

programação efetuada no computador realizada por um profissional capacitado, é acionada a seqüência de procedimentos automatizados que determinam a reação pré-coluna, o caminho a ser executado pelo equipamento, ou seja, a injeção do padrão interno da amostra, a injeção do OPA na amostra, a mistura destas substâncias e a espera de sua reação, para ser injetada na coluna cromatográfica. A reação com o OPA produz o complexo colorido posteriormente detectado. Sequencialmente tem início a corrida da amostra através da coluna dinamizada pelas fases móveis, em que se dá a eluição dos aminoácidos ou a separação propriamente dita de acordo com a sua polaridade e peso molecular.

Cada aminoácido eluído (complexo colorido) é captado pelo detector ultravioleta, fazendo a seguir o traçado cromatográfico que fornece os dados qualitativos e quantitativos. A dosagem qualitativa a partir da identificação do tempo de eluição em reação a mistura padrão de aminoácidos previamente conhecida, e a dosagem quantitativa a partir do cálculo da área de cada pico identificado. O OPA utilizado na reação pré-coluna não reage com os aminoácidos taurina, prolina, triptofano os quais não foram dosados devido a esta limitação técnica. Os aminoácidos dosados foram: fenilalanina, tirosina, metionina, treonina, glicina, glutamina, leucina, lisina, valina e histidina.

B - Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando a média (X) e o erro padrão da média (EPM) para todos os dados ($X \pm \text{EPM}$) utilizando-se o Microsoft Excel 2003 para planilhamento dos dados e o “software” SigmaStat para Windows[®], na versão 2.0. Para os testes com amostras paramétricas foram utilizados para as comparações os testes de ANOVA de uma via de medidas repetitivas e t’student pareado. Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de gráficos e tabelas. Foi considerado como diferença significativa valor de “ p ” menor que 0,05¹⁰⁹.

4. RESULTADOS

Quanto ao peso de nascimento dos RNPT, a média foi de 1093,54g. O peso de nascimento do grupo I (LHB-FM85[®]) foi de 1171,00±56,36, do grupo II (LHB-E) foi de 1126,00 ±98,32 e do grupo III (LHB-L) foi de 989,44±72,57. ANOVA de uma via de medidas repetitivas ($p=0,16$) com pós teste de Tukey, sendo não significativa à diferença entre os grupos.

4.1 Antropometria dos RNPT dos diferentes grupos estudados.

De acordo com dados antropométricos dos RNPT, foi avaliado o crescimento em peso, comprimento e perímetro cefálico. Para o ganho (medida final – medida inicial), para as três variáveis, foi realizado o teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas com pós teste de Tukey.

Quanto ao ganho de peso (g) dos RNPT estudados, o grupo I (LHB-FM85[®]) foi de 187,50±27,47, do grupo II (LHB-E) foi de 132,00±44,77 e do grupo III (LHB-L) foi de 225,89±39,21, sem diferença significativa entre os grupos. O resultado referente ao ganho de peso está ilustrado na figura 6.

Quanto ao comprimento (cm) dos RNPT estudados, o grupo I (LHB-FM85[®]) foi de 1,51±0,30, do grupo II (LHB-E) foi de 1,80±0,79 e do grupo III (LHB-L) foi de 1,81±0,31.

Quanto ao perímetro cefálico (cm) dos RNPT estudados, o grupo I (LHB-FM85[®]) foi de 1,10±0,33, do grupo II (LHB-E) foi de 1,71±0,39 e do grupo III (LHB-L) foi de 2,00±0,31. Destaca-se a diferença significativa para o perímetro cefálico nos grupos II e III. Os resultados referentes ao comprimento e perímetro cefálico estão ilustrados na figura 7.

4.2 Concentrações dos aminoácidos plasmáticos

Os resultados referentes à concentração de aminoácidos essenciais e não essenciais da **primeira coleta** de sangue (antes do início da alimentação com a dieta referida, momento -1) em relação com a **segunda coleta** de

sangue (após a última alimentação com a dieta referida, momento 15 dias) foi realizada por meio do teste paramétrico t'- student pareado.

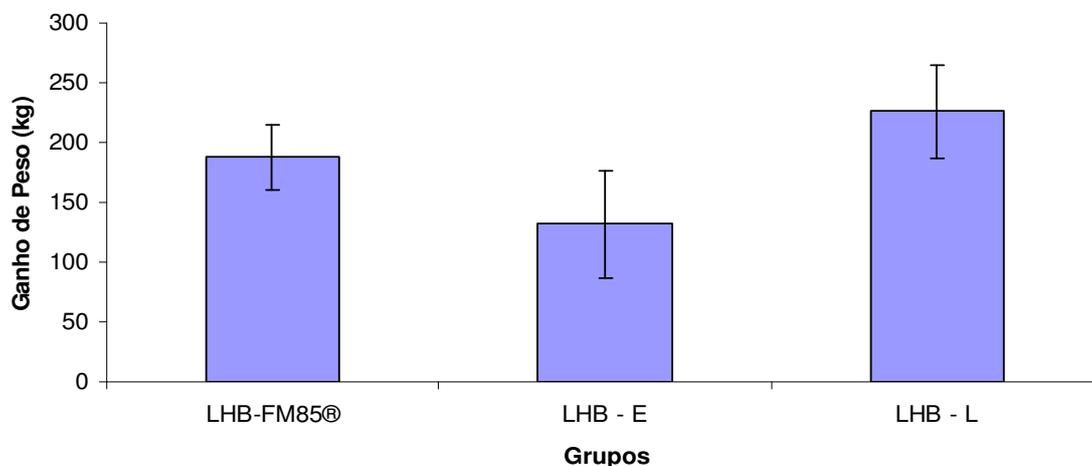


Figura 6 – As colunas representam os valores médios e as barras o erro padrão da média, diferença não significativa entre os grupos ($p= 0,28$).

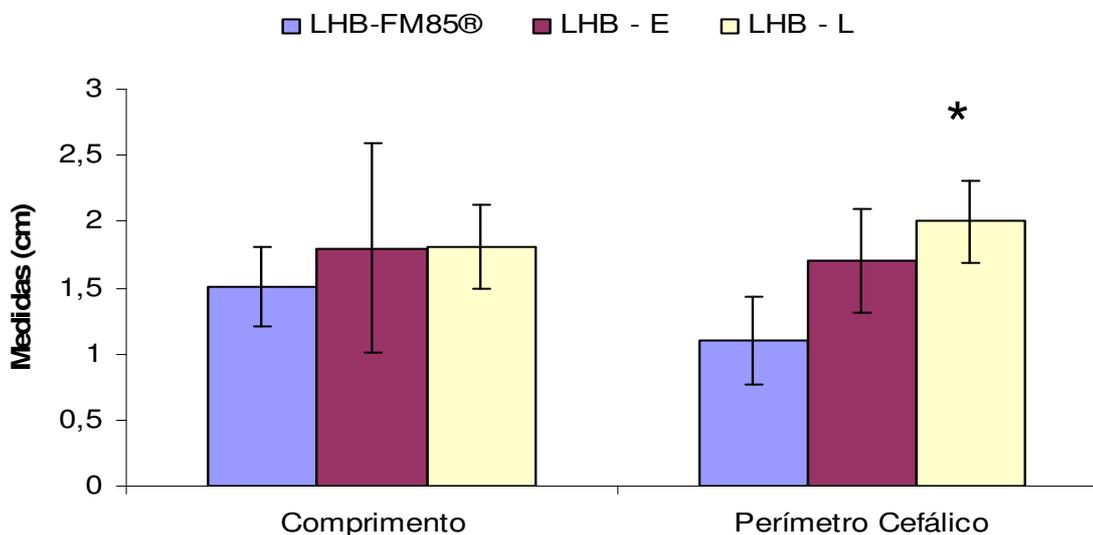


Figura 7 – As colunas representam os valores médios e as barras o erro padrão da média. Diferença não significativa entre os grupos quanto ao comprimento, $p=0,82$. *Diferença significativa entre os grupos I (LHB-FM85®) e III (LHB-L) quanto ao perímetro cefálico $p=0,04$ ($p<0,01$).

No grupo I (LHB-FM85[®]), para o aminoácido fenilalanina a média±erro padrão da média foi de 11,9±1,22 e 29,72±0,73 respectivamente. Para o aminoácido leucina foi de 25,25±1,09 e 31,02±2,23. Para o aminoácido metionina foi de 3,47±0,57 e 16,51±0,59. Para o aminoácido treonina foi de 20,54±1,74 e 67,7±5,04. Para o aminoácido glicina foi de 25,18±2,42 e 50,38±3,18. Para o aminoácido lisina foi de 15,95±0,86 e 21,87±0,99. Para o aminoácido valina foi de 19,89±1,70 e 76,54±1,67. Para o aminoácido histidina foi de 14,50±1,08 e 61,18±2,01.

Os resultados referentes à concentração de aminoácidos essenciais do grupo I (LHB-FM85[®]) estão ilustrados na figura 8.

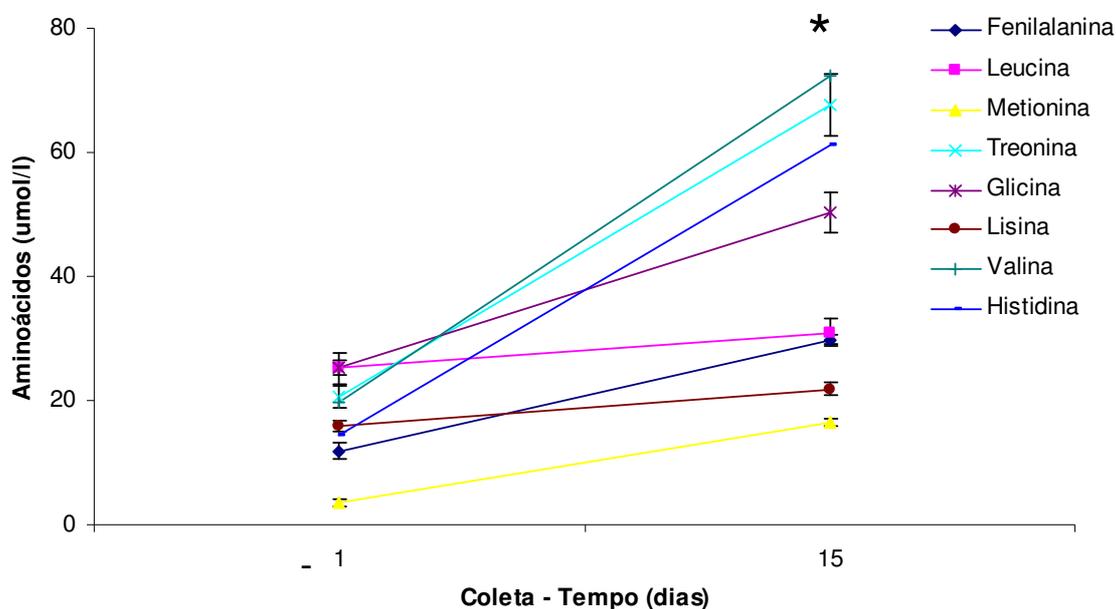


Figura 8 - Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos essenciais plasmáticos do grupo I (LHB-FM85[®]). Os símbolos representam os valores médios e as barras o erro padrão da média. * Diferença significativa em relação ao tempo dos aminoácidos fenilalanina $p < 0,0001$, metionina $p < 0,0001$, treonina $p < 0,0001$, glicina $p < 0,0007$, lisina $p < 0,007$, valina $p < 0,0001$ e histidina $p < 0,0001$. Diferença não significativa para o aminoácido leucina $p = 0,07$.

O resultado referente à concentração de aminoácidos não essenciais da **primeira coleta** de sangue em relação à **segunda coleta** de sangue do grupo I (LHB-FM85[®]), para o aminoácido tirosina foi de 11,21±0,78 e 34,34±2,39 e para o aminoácido glutamina foi de 11,04±0,19 e 17,3±1,02.

Os resultados referentes à concentração de aminoácidos não essenciais do grupo I (LHB-FM85[®]) estão ilustrados na figura 9.

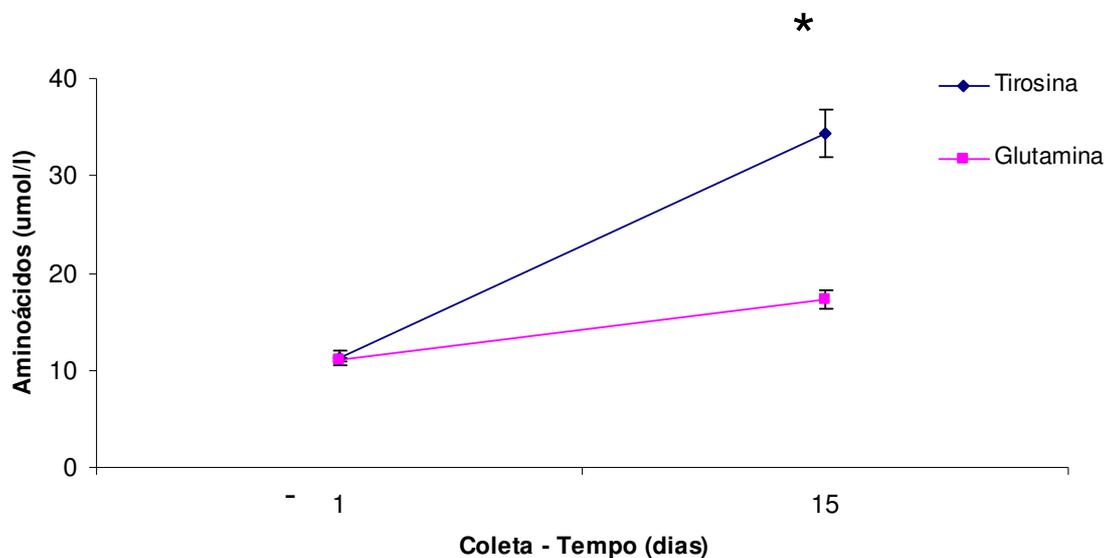


Figura 9 - Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos não essenciais plasmáticos do grupo I (LHB-FM85[®]). Os símbolos representam os valores médios e as barras o erro padrão da média. * Diferença significativa em relação ao tempo dos aminoácidos tirosina $p < 0,0001$ e glutamina $p < 0,001$

Os resultados referentes à concentração de aminoácidos essenciais da **primeira coleta** de sangue em relação à **segunda coleta** de sangue do grupo II (LHB-E), para o aminoácido fenilalanina foi de $11,72 \pm 1,04$ e $13,44 \pm 0,61$ respectivamente. Para o aminoácido leucina foi de $25,59 \pm 0,89$ e $25,43 \pm 0,85$. Para o aminoácido metionina foi de $3,40 \pm 0,41$ e $10,01 \pm 0,73$. Para o aminoácido treonina foi de $20,61 \pm 1,07$ e $94,35 \pm 2,95$. Para o aminoácido glicina foi de $26,02 \pm 2,64$ e $44,54 \pm 3,60$. Para o aminoácido lisina foi de $15,46 \pm 0,95$ e $26,10 \pm 1,45$. Para o aminoácido valina foi de $19,26 \pm 1,47$ e $74,98 \pm 2,88$. Para o aminoácido histidina foi de $14,87 \pm 0,92$ e $35,79 \pm 3,87$. Os resultados referentes à concentração de aminoácidos essenciais do grupo II (LHB-E) estão ilustrados na figura 10.

Os resultados referentes à concentração de aminoácidos não essenciais da **primeira coleta** de sangue em relação com a **segunda coleta** de sangue do grupo II (LHB-E), para o aminoácido tirosina foi de $11,22 \pm 0,84$ e $16,4 \pm 0,91$ e para o aminoácido glutamina foi de $11,37 \pm 0,27$ e $21,19 \pm 1,34$. Os resultados

referentes à concentração de aminoácidos não essenciais do grupo II (LHB-E) estão ilustrados na figura 11.

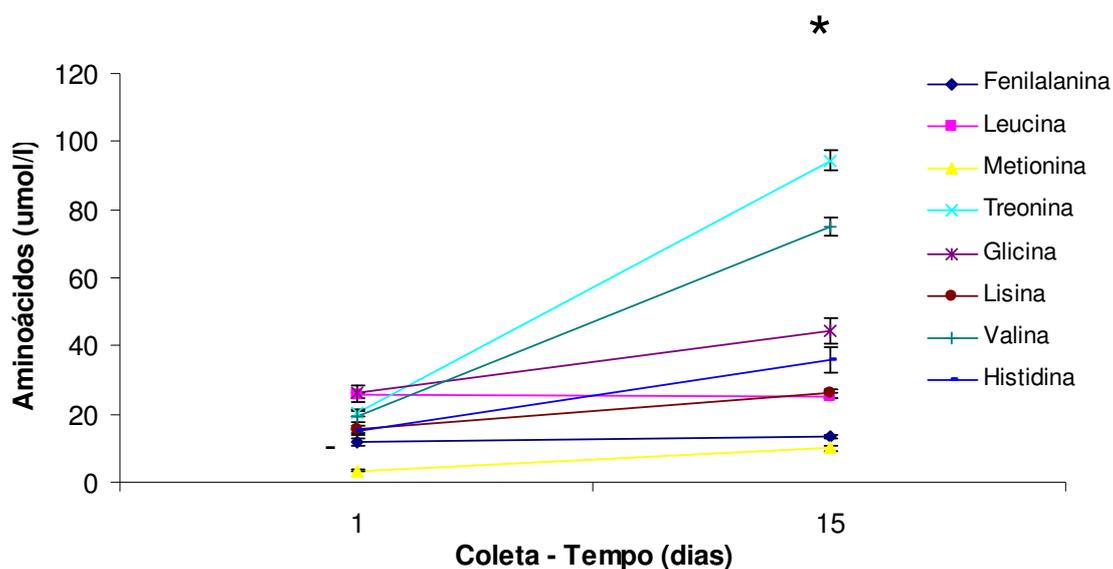


Figura 10 - Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos essenciais plasmáticos do grupo II (LHB-E). Os símbolos representam os valores médios e as barras o erro padrão da média. * Diferença significativa em relação ao tempo dos aminoácidos metionina $p < 0,0001$, treonina $p < 0,0001$, glicina $p < 0,0003$, lisina $p < 0,0002$, valina $p < 0,0001$ e histidina $p < 0,0007$. Diferença não significativa para os aminoácidos fenilalanina $p = 0,22$, leucina $p = 0,87$

Os resultados referentes à concentração de aminoácidos essenciais da primeira coleta de sangue em relação a segunda coleta de sangue do grupo III (LHB-L), para o aminoácido fenilalanina foi de $11,3 \pm 1,18$ e $15,42 \pm 0,83$ respectivamente. Para o aminoácido leucina foi de $26,00 \pm 0,92$ e $28,09 \pm 1,32$. Para o aminoácido metionina foi de $4,65 \pm 0,49$ e $11,08 \pm 0,63$. Para o aminoácido treonina foi de $20,74 \pm 1,52$ e $98,24 \pm 3,28$. Para o aminoácido glicina foi de $25,71 \pm 2,18$ e $41,48 \pm 3,20$. Para o aminoácido lisina foi de $16,55 \pm 0,91$ e $27,08 \pm 3,03$. Para o aminoácido valina foi de $19,59 \pm 2,18$ e $72,24 \pm 1,54$. Para o aminoácido histidina foi de $15,16 \pm 0,99$ e $34,02 \pm 2,93$. Os resultados referentes à concentração de aminoácidos essenciais do grupo III (LHB-L) estão ilustrados na figura 12. Os resultados referentes à concentração de aminoácidos não essenciais da primeira coleta de sangue em relação com a segunda coleta de sangue do grupo III (LHB-L), para o aminoácido tirosina foi de $10,68 \pm 0,69$ e $17,49 \pm 0,74$ e para o aminoácido glutamina foi de $11,53 \pm 0,36$

e $24,62 \pm 1,92$. Os resultados referentes à concentração de aminoácidos não essenciais do grupo III (LHB-L) estão ilustrados na figura 13.

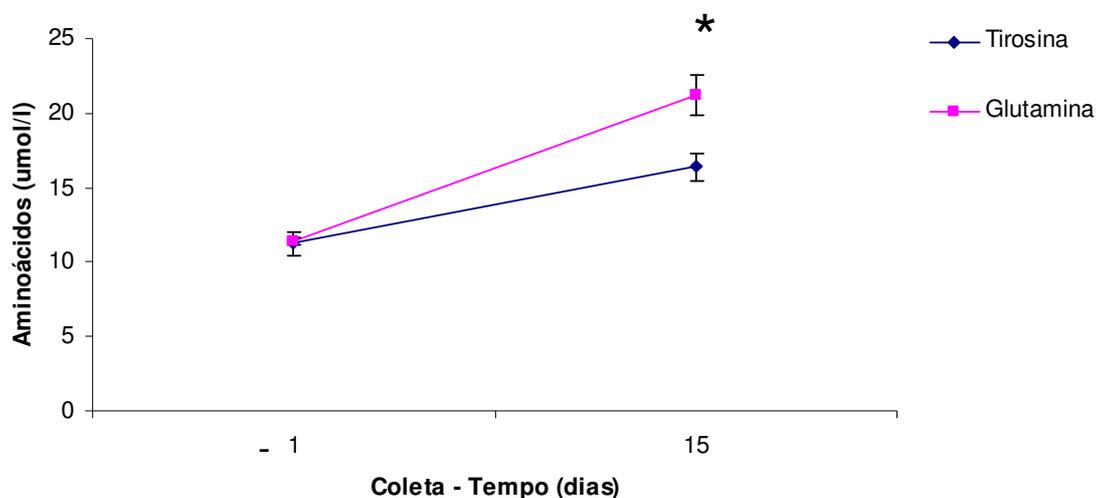


Figura 11 - Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos plasmáticos não essenciais do grupo II (LHB-E). Os símbolos representam os valores médios e as barras o erro padrão da média. * Diferença significativa em relação aos aminoácidos tirosina $p < 0,001$, glutamina $p < 0,001$.

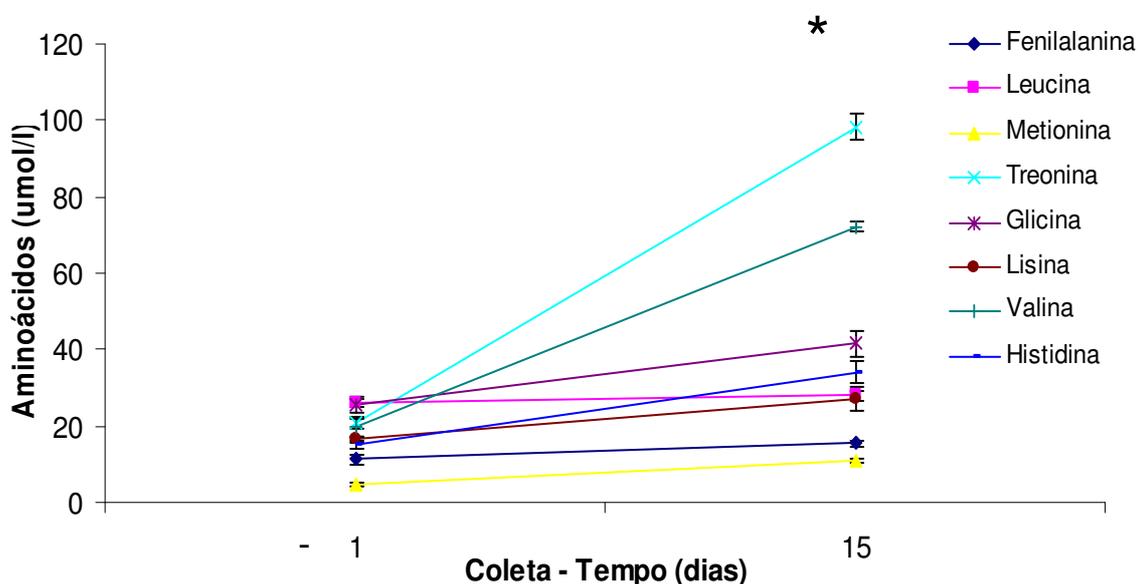


Figura 12 - Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos essenciais plasmáticos do grupo III (LHB-L). Os símbolos representam os valores médios e as barras o erro padrão da média. * Diferença significativa em relação aos aminoácidos metionina $p < 0,0001$, treonina $p < 0,0001$, glicina $p < 0,001$, lisina $p < 0,01$, valina $p < 0,0001$ e histidina $p < 0,0001$. Diferença não significativa para os aminoácidos fenilalanina $p = 0,001$ e leucina $p = 0,08$.

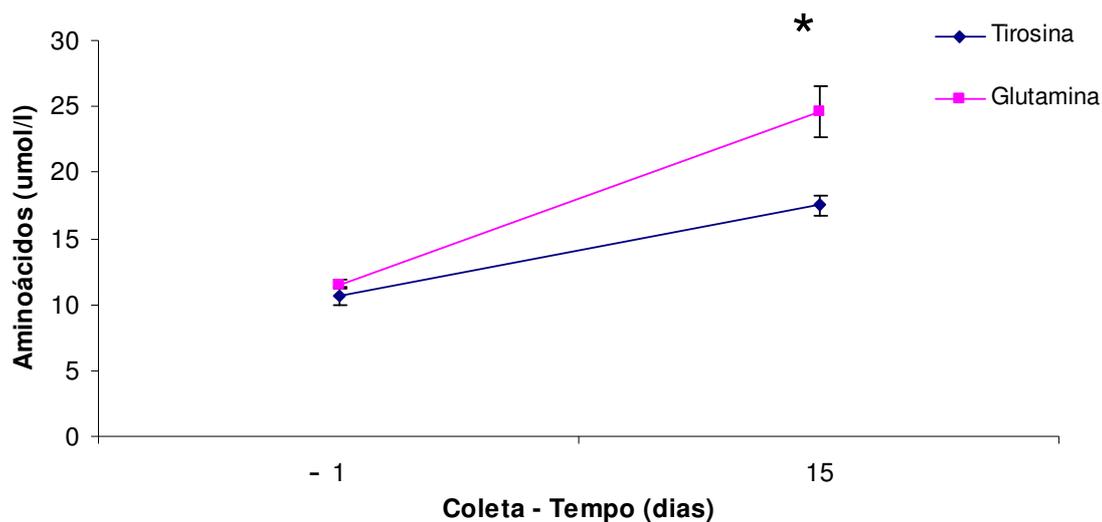


Figura 13 - Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos não essenciais plasmáticos do grupo III (LHB-L). Os símbolos representam os valores médios e as barras o erro padrão da média. * Diferença significativa em relação aos aminoácidos tirosina $p < 0,0001$ e glutamina $p < 0,001$.

4.3 Diferença na concentração dos aminoácidos nos diferentes grupos do estudo.

Os resultados referentes à concentração de aminoácidos em relação à **segunda coleta** de sangue (momento 15 dias) quando comparados os grupos, I (LHB-FM85[®]), II (LHB-E) e III (LHB-L) para todos os aminoácidos, foi realizado o teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas com pós teste de Tukey. Os resultados referentes à diferença de concentração dos aminoácidos nos grupos do estudo estão ilustrados na tabela 2 e figura 14.

Tabela 2 - Diferença na concentração dos aminoácidos dos recém nascidos pré-termos nos diferentes grupos do estudo.

	<i>X±EPM</i>			Pós teste Tukey		
				<i>p</i>		
<i>Aminoácido</i>	LHB-FM85	LHB-E	LHB-L	GI - GII	GII -	GI - GIII
<i>ANOVA</i>	GI	GII	GIII		GIII	
<i>p</i>						
Fenilalanina	29,72±0,73	13,44±0,61	15,5±0,83	** p<0,0001	p>0,05	** p<0,0001
p<0,0001						
Tirosina	34,34±2,39	16,4±0,91	17,49±0,74	*p<0,001	p>0,05	*p<0,001
p<0,0001						
Metionina	16,51±0,59	10,01±0,73	11,08±0,63	*p<0,01	p>0,05	*p<0,01
p<0,0001						
Treonina	67,7±5,04	94,35±2,95	98,24±3,28	*p<0,01	p>0,05	*p<0,01
p<0,0001						
Glutamina	17,3±1,02	21,19±1,34	24,62±1,92	p>0,05	p>0,05	*p<0,01
p<0,006						
Histidina	61,18±2,01	35,79±3,87	34,02±2,93	*p<0,001	p>0,05	*p<0,001
p<0,0001						
Glicina	50,38±3,18	44,54±3,11	41,48±3,20			
p<0,15						
Lisina	21,87±0,99	26,1±1,45	27,08±3,03			
p<0,17						
Valina	76,54±1,67	74,98±2,88	72,24±1,54			
p<0,36						
Leucina	31,02±2,23	25,43±0,85	28,09±1,33			
p<0,15						

* Significativo ** Extremamente significativo

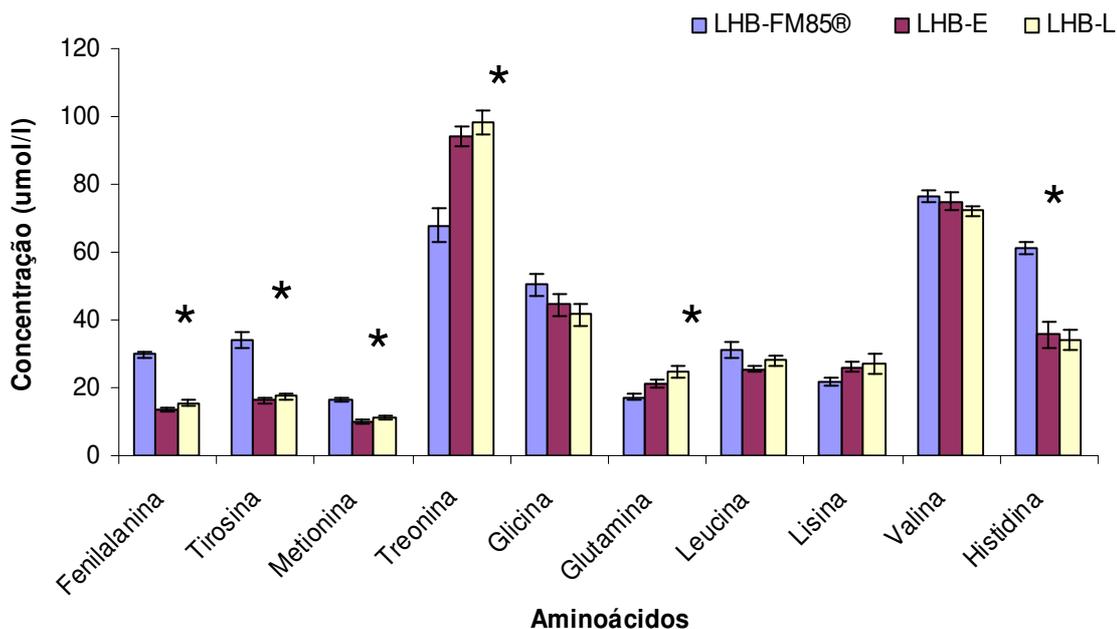


Figura 14 - Gráfico ilustrando a concentração dos aminoácidos plasmáticos. As colunas representam os valores médios e as barras o erro padrão da média. *Diferença significativa dos aminoácidos em relação aos grupos.

4.3 Dados de conferência dos RNPT dos diferentes grupos estudados.

Tabela 3 - Dado inicial e final dos marcadores de função renal nos recém nascidos pré- termo nos diferentes grupos de estudo.

Grupos	<i>Uréia</i>		<i>Creatinina</i>		Albumina	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
LHB-FM85®	15,50	16,70	0,64	0,43	2,63	2,85
LHB – E	25,80	12,20	0,47	0,50	2,95	2,88
LHB – L	21,11	15,33	0,56	0,39	3,08	3,12

5. DISCUSSÃO

"O recém nascido prematuro tem somente três necessidades essenciais: calor humano da mãe, a certeza da sua presença e do leite de seus peitos. Somente o aleitamento materno satisfaz a todos os três." Colette Clark

Em se tratando de aditivos para o LH em RNPT, estudos da qualidade e composições dos aa nas diversas preparações são geralmente conduzidos a fim de aprimorar a dieta para essa RNPT¹¹⁰, pois o perfil de aa é mais adequado quando os bebês são alimentados com a composição do LH^{111,112}.

Aditivos derivados do LH têm sido estudados desde décadas passadas¹¹³⁻¹¹⁵, e hoje há estudos que utilizam técnicas de evaporação e liofilização^{106,107,116,117}.

O primeiro relato¹¹⁸ comparando a proteína do LH com hidrolisado protéico heterólogo para alimentar RNPT foi conduzido no ano de 1947, os RNPT alimentados com proteína heteróloga tiveram maior ganho de peso do que aqueles alimentados com "pool" de LH.

Em 1961, foram testados aditivos contendo hidrolisado protéico heterólogo com teores variando de 1,7 a 7,7g/kcal na tentativa de relacionar com o crescimento. Notaram que prematuros com uso de 2,5kg/proteína ganharam pouco peso. Já as crianças alimentadas com 3,8kg/proteína o ganho de peso foi satisfatório, enquanto que, inadvertidamente, os recém nascidos que receberam ingestão de proteína em excesso como 8kg/proteína, o crescimento havia diminuído e a mortalidade foi significativamente maior do que aqueles alimentados com outras dietas¹¹⁹.

No ano de 1990, foi observado¹²⁰ que se utilizado aditivo derivado do LH para enriquecer o próprio LH na alimentação de RNPT, o perfil de aa sanguíneo destas crianças, se assemelha ao perfil de aa encontrado em RNT alimentados com LH, sendo este considerado como padrão ouro¹²¹.

Estudos avaliaram o perfil de aa sanguíneo de RNPT alimentados com LH aditivado com FM85[®] e observaram que há necessidade da melhor adequação da proteína ofertada por este aditivo. O hidrolisado protéico heterólogo pode resultar em modificações dos macronutrientes bioquímicos e também pode interferir no neurodesenvolvimento do RNPT^{122,123}.

A razão do presente estudo se deu na valorização do aditivo do LH, fator crucial da diferença das dietas dos RNMBP. A oferta das dietas teve como propósito verificar o comportamento nutricional dos diferentes grupos de crianças alimentadas. Para isso contamos com grupos os mais homogêneos possíveis, em relação ao peso de nascimento; todos os RNPT apresentaram características semelhantes.

De acordo com os dados antropométricos dos RNPT, foi avaliado o ganho do crescimento em peso, comprimento e perímetro cefálico. Em nossos resultados foi observado que, os alimentados com o aditivo liofilizado tiveram maior ganho de peso, porém não houve diferença significativa em relação aos outros grupos estudados, os alimentados com aditivo evaporado tiveram menor ganho de peso próximo a aqueles alimentados com hidrolisado protéico heterólogo também sem diferença estatística.

Quanto ao ganho de comprimento dos RNPT alimentados com os aditivos liofilizado e evaporado foi praticamente maior, porém sem significância quando comparado aos alimentados com o hidrolisado protéico heterólogo.

Enquanto que o ganho do perímetro cefálico, nos RNPT alimentados com aditivo liofilizado, foi significativamente maior que os RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo. O perímetro cefálico dos RNPT alimentados com aditivo evaporado não teve diferença significativa em relação ao aditivo liofilizado.

Talvez o maior crescimento craniano deva ser pelo perfil de aa do LHB-L. Isso porque a composição básica inicial das diferentes dietas foi semelhante, porém com teor protéico maior no aditivo liofilizado, demonstrado pelas análises bioquímicas realizadas¹⁰⁷.

Em relação ao ganho de peso, comprimento e perímetro cefálico quando comparamos nossos resultados com o que seria esperado para o crescimento fetal proposto em um estudo realizado em 2008, que relata que o aditivo de hidrolisado protéico heterólogo proporcionou menor crescimento cerebral em comparação aos grupos alimentados com LH aditivado com proteína homóloga¹⁰¹.

Um aspecto que deve ser analisado é o crescimento insatisfatório do perímetro cefálico observado em RNMBP, um estudo concluiu que uma menor circunferência da cabeça pode estar associada a resultados adversos quanto

ao desenvolvimento neuropsicomotor em longo prazo das crianças acompanhadas, principalmente quando essas crianças são alimentadas com hidrolisado protéico heterólogo para RNPT ¹²⁴⁻¹²⁶.

No presente estudo, o único parâmetro de crescimento que apresentou diferença significativa entre os três grupos estudados foi o crescimento do perímetro cefálico. Provavelmente a interação dos nutrientes adicionados ao LH, tanto o aditivo evaporado quanto o liofilizado promovam uma melhor biodisponibilidade e melhor absorção de nutrientes.

O maior crescimento do perímetro cefálico nos RNPT que receberam aditivo liofilizado não pode ser explicado pelo maior aporte de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, pois teoricamente tanto os aditivos homólogos quanto o aditivo heterólogo não acrescentam gordura ao LH. A qualidade melhor dos aa ofertados pelo aditivo homólogo com provável suprimento maior de determinados aa em detrimento de outros, pode estar implicada no melhor crescimento cerebral.

Devido ao melhor crescimento, podemos destacar em nossa pesquisa a importância de um aditivo oriundo do LH nas dietas para alimentar RNPT para um possível melhor neurodesenvolvimento.

Pesquisadores¹²⁷ compararam o crescimento de RNMBP em ventilação mecânica com os que não necessitaram de ventilação mecânica, por cinco semanas após o nascimento. O parâmetro de ventilação mecânica foi utilizado pelos autores como marcador de severidade do quadro clínico. Todos os RNPT receberam no período de nutrição enteral total, LH aditivado com FM85[®], com o intuito de manter 115 a 135 kcal/kg/dia e 3 a 4g/kg/dia de proteína. O crescimento observado foi abaixo do esperado, os RNPT ganharam em média 8,2 a 9,7g/kg/dia em peso, 0,8 a 1,0cm/semana em comprimento e 0,45 a 0,60cm/semana no perímetro cefálico.

Quando comparamos os resultados observados por estes autores com os resultados encontrados no presente estudo observa-se que, o grupo que recebeu aditivo de LH liofilizado, as taxas de ganho de peso e perímetro cefálico tiveram uma tendência a serem maiores que aquele grupo que recebeu aditivo FM85[®] demonstrado numericamente.

Estudiosos¹²⁸ observaram que a velocidade de crescimento em comprimento não tem diferença nas primeiras cinco semanas após o

nascimento, a partir de então, há uma desaceleração no ganho em comprimento. Esta medida variou de 0,92cm/semana a 1,0cm/semana, maior nos RNPT com peso entre 1.250g e 1.500g. O crescimento do perímetro cefálico apresentou uma aceleração nas primeiras quatro semanas, sendo maior para o grupo de RNPT entre 750g e 1000g, 0,80cm/semana quando comparado com o crescimento de 0,75cm/semana dos RNPT com peso entre 1.000g e 1.500g; a partir de então a velocidade de crescimento se mantém constante de 0,85cm/semana para os menores e 0,80cm/semana para os maiores.

A importância do conhecimento destes detalhes do crescimento esta no fato de que no presente estudo os RNPT foram acompanhados durante as primeiras cinco semanas de idade pós-natal, sendo que uma grande parte deles foi logo após a transição da nutrição parenteral para a enteral total e, portanto, no período de queda da velocidade de ganho de peso e antes da segunda aceleração. Isto dificulta a comparação com outros estudos, que acompanharam o crescimento de RNPT até a alta hospitalar ou mais.

Em 2003 e 2004 estudos semelhantes ^{129,130} compararam grupos de RNPT alimentados com LH e LH aditivado durante 30 dias ou até a alta hospitalar e observaram um ganho de peso nesse período de 335g, 1,9cm em comprimento e 1,9cm em perímetro cefálico nos RNPT alimentados com LH aditivado. Quando comparamos com as médias do crescimento em apenas 15 dias de acompanhamento, observamos que houve um crescimento satisfatório em todos os parâmetros avaliados. O estudo justificou o crescimento de peso reduzido quando comparado com outros estudos, em decorrência do curto período de observação.

No ano de 2005¹³¹ uma pesquisa comparou três grupos de RNPT alimentados com LH acrescido de aditivos comerciais e LH prematuro, acompanhou-os por 90 dias ou até a alta hospitalar. Nos RNPT alimentados com LH aditivado, observaram um ganho de 17,1g/kg/dia de peso, 1,2cm/semana de comprimento e 0,9cm/semana de perímetro cefálico.

Ao compararmos estes resultados com os encontrados no presente estudo, observamos que o ganho de todos os parâmetros de crescimento foram maiores no estudo de 2005. Talvez o resultado de maior ganho

observado pelo estudo realizado em 2005, seja pelo período de acompanhamento por mais tempo.

A superioridade do LH na alimentação de RNPT já esta bem documentada¹³². Um estudo¹³³ retrospectivo dá suporte aos estudos de outros pesquisadores¹³⁴ do assunto, pela observação de que o LH tem impacto importante no crescimento cerebral e no desenvolvimento, mesmo quando não promove grande ganho de peso, reforçando o conceito de que o ótimo crescimento pós-natal de RNMBP ainda não é conhecido. Contribuem para esta afirmação os achados¹³⁵ de que acelerar o ganho de peso de RNMBP pode levar as conseqüências futuras em relação à obesidade, resistência insulínica e problemas cardiovasculares.

Fica claro que o conhecimento do que é ótimo em nutrição de RNMBP ainda não é totalmente conhecido, enquanto isso pesquisadores devem estar compromissados com o que parece ser o ideal, que não cause alterações funcionais em curto prazo e traga melhor desenvolvimento em longo prazo. Neste aspecto, enriquecer o LH com aditivo contendo proteína homóloga, como o proposto neste estudo, parece ser mais apropriado.

Estudo¹³⁶ sugere que para análise do perfil de aa as amostras de sangue devam ser colhidas imediatamente antes da alimentação, assim pode-se analisar o perfil de aa sem a interferência da dieta posteriormente ofertada.

A metodologia referida acima foi seguida no que diz respeito ao momento das coletas do sangue, observou-se que a maioria das amostras tomadas antes da primeira dieta do primeiro dia os valores dos aa eram significativamente menores do que aqueles tomados imediatamente após a última dieta no décimo quinto dia.

Quanto aos resultados referentes à concentração de aa essenciais em relação às coletas de sangue dos RNPT alimentados com o hidrolisado protéico heterólogo, todos os valores foram significativamente maiores na segunda coleta, exceto o valor da leucina que aumentou, porém sem significância. Os resultados referentes à concentração de aa não essenciais, os valores de tirosina e glutamina, foram significativamente maiores, isto é se comportando como os aa essenciais.

E quanto à concentração de aa essenciais dos RNPT alimentados com os aditivos evaporado e liofilizado se comportaram de maneira semelhante,

todos os valores dos aa foram significativamente maiores na segunda coleta, exceto para os valores de fenilalanina e leucina que aumentaram, porém sem significância. Os resultados referentes à concentração de aa não essenciais, os valores de tirosina e glutamina, foram também significativamente maiores.

Ressaltamos que a distribuição de certos aa no hidrolisado protéico heterólogo oferecido aos RNPT estudados possa ser uma hipótese que contribua para a diferença observada no que se refere ao crescimento do perímetro cefálico. Os LH aditivados, evaporado e liofilizado, aumentaram o teor protéico, sempre com uma proporcionalidade da distribuição do LH original.

Os valores de fenilalanina se apresentam não proporcionais em RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo, pois a capacidade de degradação deste aa é maior em RNPT que recebem leite rico em caseína¹³⁷.

Apesar do aumento significativo dos valores de fenilalanina, não observamos repercussão metabólica importante nos RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo no decorrer do estudo, mas estudos admitem que em longo prazo possa ser um fator ruim no desenvolvimento cognitivo¹³⁸.

Embora o ganho das medidas antropométricas dos RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo foi considerado normal, níveis elevados de fenilalanina pode predispor a acidose metabólica, ter formação de substâncias tóxicas no cérebro, déficits cerebrais, cognitivos e distúrbios no crescimento.

Autores concluíram que altas concentrações de aa na dieta não melhoram o crescimento neonatal, e podem até ser desfavoráveis em termos de tolerância metabólica. Por não haver diferença no crescimento dos três grupos estudados, isto parece implicar que um alto teor de aa não é usado para o anabolismo, sendo provavelmente oxidado^{139,140}.

Quando foi comparado à concentração de fenilalanina entre os RNPT alimentados com as diferentes dietas, verificou que RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo tiveram índices séricos maiores deste aa, extremamente significativos, quando comparados com àqueles RNPT alimentados com os aditivos evaporado e liofilizado. Assim, o nível de fenilalanina foi maior nos RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo, e apresentaram índice menor do perímetro cefálico quando comparados com àqueles alimentados com aditivos de LH.

A tirosina um aa não essencial, provém tanto da ingesta diária de proteína como da síntese endógena a partir da hidroxilação da fenilalanina¹⁴¹, com aumento da ingesta de fenilalanina, ocorre a inibição da enzima tirosinase, aumentando a disponibilidade de tirosina, podendo ocasionar um efeito deletério no desenvolvimento cerebral levando as conseqüências como distúrbio do sono, déficit de memória, dificuldade de atenção e concentração¹³⁷.

Supõe-se que os níveis de tirosina sérica elevados nas primeiras semanas de vida sejam prejudiciais para o SNC em desenvolvimento, além de ser quimicamente semelhante à fenilalanina, ela provoca inibição da mielinização, resultando em prejuízo para o desenvolvimento¹⁴².

Os RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo apresentaram valores mais elevados de fenilalanina, como conseqüência valores elevados também de tirosina. Podemos sugerir que o metabolismo destes aa depende de um sistema enzimático complexo, que no RNPT ainda é precário. Assim, o aumento das concentrações plasmáticas de tirosina nos RNMBP estudados pode estar diretamente relacionado com a proteína do seu aditivo na dieta. Estes resultados podem oferecer evidências adicionais para a limitada capacidade do RNPT catabolizar tirosina.

Também é de interesse o metabolismo da metionina, pois estudos^{143,144} sugerem que o RNPT é incapaz de converter metionina em cisteína, com isso o desenvolvimento da atividade da metionina não é eficiente por algum tempo após o parto¹⁴⁵. Já outros estudos¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ mostram que RNPT desenvolve a capacidade de converter metionina rapidamente após o nascimento.

Quando o hidrolisado protéico heterólogo foi oferecido, talvez como conseqüência da imaturidade de algumas vias metabólicas, os níveis de certos aa (fenilalanina, tirosina e metionina) apresentam-se elevados. Já os aditivos de LH por conterem menores concentrações desses aa apresentam-se mais equilibrados. A sugestão é que o aditivo do LH cause menos sobrecarga metabólica do que o hidrolisado protéico heterólogo, bons resultados refletiram na importância do crescimento do perímetro cefálico nos RNPT aqui estudados.

Outro motivo da alta concentração plasmática da metionina nos RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo quando comparadas com dos RNPT alimentados com aditivos de leite humano, pode ser resultado do

metabolismo desse aminoácido, devido à imaturidade da criança, ou devido maior conteúdo de caseína do aditivo heterólogo¹⁵⁰.

Estudos mostraram que RNPT com alto índice de metionina, eram alimentado com hidrolisado protéico heterólogo, e ao substituir por um aditivo de origem de LH o qual apresenta menor conteúdo de metionina, os índices foram menores. Esse dado mostra que a causa mais comum de hipermetioninemia isolada em RNPT está no consumo de metionina em excesso através de dietas contendo proteína heteróloga usadas para alimentação¹⁵¹⁻¹⁵⁴.

Evidências mostram os efeitos de determinados aa na dieta, particularmente da treonina, na barreira intestinal, pois aparenta ser de fundamental importância para a manutenção para um bom funcionamento do intestino prematuro¹⁵⁵. Resultados sugerem que hidrolisado protéico heterólogo em comparação com proteína do LH em RNPT reduz o crescimento da mucosa intestinal. Assim, a diminuição do metabolismo de treonina intestinal e da função da barreira intestinal, pode predispor o RNPT alimentado com hidrolisado protéico heterólogo ao desenvolvimento da enterocolite necrosante¹⁵⁶.

Os RNPT alimentados com aditivos de LH apresentaram valores maiores de treonina e valores menores de fenilalanina, tirosina e metionina. Enquanto os RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo apresentaram valores menores de treonina e valores maiores de fenilalanina, tirosina e metionina.

Estudo observou que valores de treonina se apresentam em quantidades menores no LH prematuro quando comparados ao leite maduro¹⁵⁷. Esse estudo vem a fortalecer a idéia de adicionar o LH para prematuros, sendo que o leite utilizado para a nossa pesquisa foi o leite maduro, pois acredita ser a melhor opção nutricional, principalmente quando aditivado com próprio LH.

Estudo realizado em 2007¹⁵⁸ sugere que o metabolismo da treonina em RNPT durante a vida pós-natal precoce é alto, o aparecimento sistêmico de treonina nos RNPT alimentados com aditivos de LH é resultado não somente de uma dieta mais adequada, como também de uma melhor digestão^{159,160}. Portanto, a observação mais surpreendente a emergir neste estudo foi o elevado valor de treonina nos RNPT alimentados com aditivo de LH.

Portanto, o LH aditivado com FM85[®] não nos mostrou proporcionar uma concentração sanguínea adequada de fenilalanina, tirosina, metionina e treonina em comparação com LH aditivado oriundo do próprio LH.

Nossos resultados são similares aos de outro estudo¹⁶¹ no qual foi observado que os níveis plasmáticos da treonina eram superiores em RNPT alimentados com LH comparados com aqueles alimentados com hidrolisado protéico heterólogo, porém o crescimento em peso e comprimento foram os mesmos em ambos os grupos.

Outro aminoácido estudado, a glutamina, deve ser ofertado em quantidade adequada, porém ainda faltam informações confiáveis sobre o conteúdo de glutamina no LH¹⁶². Estudo¹⁶³ afirma não haver diferença no teor de glutamina no LH de mães após parto de RNPT e a RNT, e foi observado¹⁶⁴ que o teor de glutamina diminui durante da lactação.

Em nosso trabalho apresentamos dados sobre os valores de glutamina em RNPT, nos alimentados com aditivo liofilizado os valores foram significativamente maiores do que nos RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo. E nos RNPT alimentados com aditivo evaporado os valores de glutamina não tiveram diferença significativa em comparação com os outros dois grupos.

A glutamina é um dos aa mais abundantes no LH¹⁶³, assim o aditivo de LH nos parece ser um estímulo fundamental para a função intestinal e conseqüentemente para o crescimento de RNPT, e a sua composição de aa, por exemplo, glutamina e a treonina são necessárias para manter funções específicas intestinais em RNPT, porém os valores adequados destes aa ainda não estão bem estabelecidos.

Tem sido sugerido que a glutamina pode beneficiar RNPT em aleitamento materno, particularmente RNMBP, logo após o nascimento. Concentrações sanguíneas de glutamina são mais elevadas em RNPT alimentados com LH do que em RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo^{165,166}.

Além disso, os RNMBP por apresentarem reservas energéticas reduzidas e pouca musculatura esquelética, são mais susceptíveis a estados de deficiência de glutamina e, portanto um suporte do LH aditivado com própria proteína do LH pode ter resultados benéficos ao RNPT, devido às características intrínsecas

deste aa: promover o crescimento; favorecer a maturação do trato gastrointestinal; prevenir a enterocolite necrosante; melhorar o balanço nitrogenado através da redução do catabolismo protéico; proporcionar melhor desenvolvimento e funcionalidade das células do sistema imune e possibilitando maior resistência às infecções^{167,168}.

A concentração plasmática do aa histidina foi significativamente menor nos RNPT alimentados com aditivos de LH do que nos RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo. Enquanto os aa lisina, glicina, valina e leucina não tiveram diferenças significativas entre os LH aditivados.

Para avaliar se o LH doador pasteurizado satisfaz às necessidades nutricionais dos RNPT, em termos de ácidos graxos livres e aa, um estudo coletou amostras de doadoras de LHB e a composições de aa nas amostras de leite das doadoras foram medidos antes e após a pasteurização e os valores foram comparados. Os resultados mostraram que a pasteurização não influencia na composição de aa do LHB. O estudo conclui que o LHB não é afetado pela pasteurização, pois os aa são termicamente estáveis, mas apresentam baixas concentrações de histidina e que a adição nutricional direcionada de LH doador para alimentação de RNPT deve ser necessária¹⁶⁹.

O conteúdo de lisina é indicador de qualidade de proteína e valor nutricional do leite. Muitos estudos examinaram os efeitos da extração, tratamento e armazenamento de LH e seus componentes. Um destes estudos¹⁷⁰ investigou o conteúdo disponível de lisina no LH e as variações em lisina resultante da manipulação de leite. Apesar da manipulação através do armazenamento a frio ou calor não afetar o teor de proteína do LH, a qualidade de proteína é modificada, pois o estudo sugere que a pasteurização provoca uma perda muito significativa de lisina disponível.

A concentração plasmática de lisina analisada nos RNPT não foi significativa quando comparado entre os grupos estudados. Não podemos afirmar que a pasteurização ou o resfriamento alterou a concentração de certos aa, especialmente da lisina. Os valores plasmáticos de valina também foram estatisticamente sem significância entre os grupos estudados.

Outro estudo¹⁷¹ avaliou o padrão de aa em RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo por período prolongado, e observou que os aa fenilalanina, metionina, glicina e valina, foram significativamente maiores no

grupo alimentado com hidrolisado protéico heterólogo do que no grupo alimentado com LH. Talvez no presente estudo o curto período de observação não tenha resultado em alguma diferença dos aa que não foram significativos.

No que se refere o valor da concentração plasmática de leucina, os RNPT alimentados com aditivos de LH e os RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo, não apresentaram diferença significativa em seus valores.

Apesar de não termos dosados todos os aa em nosso estudo, podemos sugerir com os resultados que uma adição de LH no próprio LH para dieta dos RNMBP aparenta ser benéfica quando observamos a não restrição do crescimento neonatal, e um crescimento significativo do perímetro cefálico destes RNPT com a dieta completamente homóloga.

Foi interessante observar que os tipos de aa plasmáticos diferem segundo a fonte da proteína usada para o aditivo e que apesar das diferenças no perfil de aa, os dados clínicos como uréia, creatinina e albumina se mantiveram em níveis normais, assim como em outros estudos similares^{172,173}.

Um estudo de revisão sistemática e metanálise¹⁷⁴, envolvendo RNMBP, divididos em dois grupos, avaliou os efeitos do metabolismo do LH, um foi suplementado com próprio LH e o outro com hidrolisado protéico heterólogo. Os valores de uréia, creatinina e albumina foram normais e similares nos dois grupos. Houve boa tolerância de proteínas de ambas as fontes, mas a diferença do perfil de aa no plasma sugere que a qualidade da proteína em RNPT alimentados com hidrolisado protéico heterólogo deve ser reavaliada.

As investigações abordam e presumem que o LH aditivado com o próprio LH é o melhor alimento para RNPT, seja evaporado ou liofilizado. RNPT também podem ser alimentados com aditivos de hidrolisado protéico heterólogo nas condições em que não houver um aditivo de origem humano, respeitando as necessidades especiais do prematuro.

6. CONCLUSÃO

- A média do crescimento em peso e comprimento dos RNPT não mostrou diferença significativa em relação aos grupos analisados.

- A média do perímetro cefálico dos RNPT alimentados com LHB-L foi significativamente maior, quando comparado com os RNPT alimentados com LHB-E e com LHB-FM85®.

- Os valores dos aminoácidos analisados do grupo LHB-FM85® foram significativamente maiores na segunda coleta em relação à primeira coleta exceto o aminoácido leucina.

- Os valores dos aminoácidos analisados do grupo LHB-E foram significativamente maiores na segunda coleta em relação à primeira coleta exceto os aminoácidos fenilalanina e leucina.

- Os valores aa analisados do grupo LHB-L foram significativamente maiores na segunda coleta em relação à primeira coleta exceto os aminoácidos fenilalanina e leucina.

- Os valores dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e metionina foram significativamente maiores no grupo LHB-FM85® em relação aos grupos LHB-E e LHB-L.

- O valor do aminoácido treonina foi significativamente maior nos grupos LHB-E e LHB-L em relação ao grupo LHB-FM85®.

-O valor do aminoácido glutamina foi significativamente maior no grupo LHB-L em relação aos grupos LHB-E e LHB-FM85®.

- O valor do aminoácido histidina foi significativamente maior nos grupos LHB-E e LHB-L em relação ao grupo LHB-FM85®.

- Os valores dos aminoácidos glicina, lisina, valina e leucina não foram diferentes estatisticamente entre os grupos estudados.

- Os marcadores renais: uréia, creatinina e albumina não foram diferentes estatisticamente entre os grupos estudados.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nascimento MBR, Issler H. Aleitamento materno: fazendo a diferença no desenvolvimento, saúde e nutrição dos recém-nascidos de termo e pré-termo. *Rev. Hosp. Clin.*, 2003 58;1: 49-60.
2. Bortolozzo EA, Tiboni EB, Candido LM. Leite humano processado em bancos de leite para o recém nascido de baixo peso: análise nutricional e proposta de um novo complemento. *Rev Pan Am Salud Publica* 2000;16 ;3:199–205.
3. Akrê J. Alimentação Infantil: bases fisiológicas. IBFAN/ Instituto de Saúde de São Paulo, 1994.
4. Who. Working Group on Infant Growth. An evaluation of infant growth: the use and interpretation of anthropometry in infants. *Bull World Health Organ.* 1995 73;2:167–174.
5. Giugliani ERJ. O aleitamento materno na prática clínica. *J Pediatr, RJ* 2000 76;2:238-52.
6. Schanler RJ, Hurst NM, Lau C. The use of human milk and breastfeeding in premature infants. *Clin Perinatol*; 1999, 26:379-98.
7. Meier P. Breastfeeding in the special care nursery. *Pediatr Clin North Am*; 2001,48:425-42.
8. Schanler RJ, Hurst NM. Human milk for the hospitalized preterm infant. *Semin Perinatol.* 1994;18:476-84.
9. Meier P, Brown L. State of the Science: breastfeeding for mothers and low birth weight infants. *Nurs Clin North Am.* 1996;31:351-65.
10. Lucas A, Cole TJ. Breastmilk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 1990;336:1519-23.
11. Hylander MA, Strobino DM, Dhanireddy R. Human milk feedings and infection among very low birth weight infants Abstract. *Pediatrics.* 1998;102:630.
12. Jain L, Sivieri E, et al. Energetics and mechanics of nutritive sucking in the preterm and term neonate. *J Pediatr* 1987;111:894-8.
13. Drosten F. Case management of a premature infant transitioning to the breast. *J Hum Lact* 2001;17:47-50.
14. American Academy of Pediatrics, Work Group on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 1997;100:1035-9.
15. Gross SJ, David RJ, Baumann L, Tomarelli RM. Nutritional composition of milk produced by mothers delivering preterm. *J Pediatr* 1980;96:641-4.
16. Valentine CJ, Hurst NM, Schanler RJ. Hind milk improves weight gain in low-birth-weight infants fed human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;18:474-7.
17. Slusher T, Hampton R, Bode-Thomas F, et al. Promoting the exclusive feeding of own mother's milk through the use of hindmilk and increased maternal milk volume for hospitalized, low birth weight infants (<1800g) in Nigeria: a feasibility study. *J Hum Lact* 2003;19:191-8.
18. Tully DB, Jones F, Tully MR. Donor milk: what's in it and what's not. *J Hum Lact* 2001;17:152-5.
19. Vinagre RD. Análise crítica do uso do leite humano procedente de banco de leite na alimentação do recém-nascido prematuro [Dissertação]. SP: Universidade de São Paulo; 1999.
20. Guerrini P. Human milk fortifiers. *Acta Paediatr* 1994;402:37-9.

21. Morley R, Lucas A. Randomized diet in the neonatal period and growth performance until 7,5-8y of age in preterm children. *Am J Clin Nutr* 2000;71:822-8.
22. Atkinson SA. Human milk feeding of the micropremie. *Clin Perinatol* 2000;27:235-47.
23. Boehm G, Muller DM, Senger H, et al. Nitrogen and fat balances in very low birth weight infants fed human milk fortified with human milk or bovine milk protein. *Eur J Pediatr* 1993;152:236-9.
24. Canadian Paediatric Society, Nutrition Committee. Nutrition needs and feeding of premature infants. *Can Med Assoc J* 1995;152:1765-85.
25. Schanler RJ. Fortified human milk: the nature's way to feed premature infants. *J Hum Lact* 1998;14:5-11.
26. Schanler RJ, Shulman RJ, Lau C. Growth of premature infants fed fortified human milk abstract. *Pediatr Res* 1997;41:240A.
27. McClure RJ, Newel SJ. Effect of fortifying breast milk on gastric emptying. *Arch Dis Child* 1996;74:60-2.
28. De Curtis M, Candusso M, Pieltain C, Rigo J. Effect of fortification on the osmolality of human milk. *Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;81:141-3.
29. Ruiz JG, Charpak N, Figueroa Z. Predictional need for supplementing breastfeeding in preterm infants under Kangaroo Mother Care. *Acta Paediatr* 2002;91:1130-4.
30. McCoy R, Kadowaki C, Wilks S, Engstrom J, Meier P. Nursing management of breastfeeding for preterm infants. *J Perinat Neonatal Nurs* 1988;2:42-55.
31. Boo NY, Goh ES. Predictors of breastfeeding in very low birthweight infants at the time of discharge from hospital. *J Trop Pediatr* 1999;45:195-201.
32. Kunz C, Rodriguez M, Koletzko B, et al. Nutritional and biochemical properties of human milk, part I: general aspects, proteins and carbohydrates. *Clin Perinatol* 1999;26:307-333.
33. Riordan J. The Biologic Specificity of Breastmilk. In: Riordan, J.; Auerbach Kg - Breastfeeding and human lactation. 2ed. Boston, Jones and Bartlett Publishers 1998:121-161.
34. Ruocco RM. Colostro Humano: Contribuição Ao Estudo da Sua Composição Leucocitária. SP, Tese [Doutorado] Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1992.
35. Rodriguez-Palmero M, Koletzko B, Kunz C, et al. Nutritional and biochemical properties of human milk, part II: lipids, micronutrients and bioactive factors. *Clin Perinatol* 1999;26:335-359.
36. Rozolen CD, Kopelman BI et al, Aleitamento materno: Diagnóstico e tratamento em neonatologia, SP, Ateneu; 2004.
37. Valdés V, Sanches AP, Lobbok M. Manejo clínico da lactação: assistência à nutriz e ao lactente. *Revinter RJ*, 1996.
38. Almeida JA. Amamentação: uma híbrida natureza-cultura. RJ Editora Fiocruz, 1999.
39. Jellife DB. Unique proprieties of human milk: remarks on some recent developments. *J Reprod Med* 1975;14:133.
40. Lemos JA, Bauer CR, Korones SB, et al. Very Low Birth Weight Outcomes of The National Istitute of Child Health and Human Development Neonatal

- Research Network, January 1995 Through December 1996. *Pediatrics* 2001;1:107.
41. American Academy of Pediatrics. Committee on nutrition. Commentary on breast-feeding and infant formulas, including proposed standards for formulas. *Pediatrics* 1976;57:278-85.
 42. Lucas A, Morley R, Cole TJ. A randomized multicenter study of human milk versus formula and later development in preterm infant. *Arch Dis Child* 1994;70:141-6.
 43. Perreira, GR; Alimentação do Pré-termo: necessidades específicas e fontes nutricionais. In: Programa de Atualização em Neonatologia – PRORN. POA, 2004;43-69.
 44. McLurre RJ, Newell SJ. Randomized controlled trial of trophic feeding and gut motility. *Arch Dis Child* 1999;80:54-58.
 45. Barros MC. Enterocolite necrosante. in: Kopelman BI et al, Diagnóstico e tratamento em neonatologia, SP, Ateneu 2004.
 46. Hay WW. Nutritional requirements of extremely low birth weight infants. *Acta Paediatr Supplement* 1994; 402:94-9.
 47. Palhares DB et al. Aminoácidos plasmáticos de recém nascidos pré-termo alimentados com leite humano de banco de leite ou fórmula do leite de vaca. *Jornal de Pediatria*, 1990;66:188-92.
 48. Goulart AL, Rozolen CD, Kopelman BI et al. Nutrição enteral do recém-nascido pré-termo: Diagnóstico e tratamento em neonatologia, SP, Ateneu;2004.
 49. Day EM, et al. Electrolyte abnormalities in very Low birth weight infants. *Pediatr. Res* 1976;10:522-6.
 50. Thureen PJ, Hay WW. Conditions in preterm infants requiring special nutritional management. In: Tsang R. et al (eds). *Nutritional needs of the preterm infants: scientific basis and practical guidelines*. Baltimore-USA: Williams & Wilkins, 1993;243-66.
 51. Barlow B, et al. A experimental study of acute neonatal enterocolitis: the importance of breast milk. *J Pediatrics Surgery*, 1974;9;587.
 52. Hamosh M. Lipid metabolism in premature infants. *Biol Neon*, 1987;52:50-64,
 53. Contreras LJ, Flores HS, Cisneros S. Disminucion de la morbilidad em neonatos pretermino alimentados com leche de su madre. *Biol Méd Hosp Infant mex*, 1992;49:671.
 54. Schanler RJ, Oh W. Composition of breast milk obtained from mothers of premature infants as compared to breast milk obtained from donors. *J Pediatrics*, n.96, 1980; 679-81,
 55. Falkner F. The physical development of the premature infant: some standards and certain relation hip to calorie intake. *J Pediatrics* 1962;60:895-906
 56. Atkinson SA, Bryan MH, Anderson GH. Human milk feeding in premature infants: protein, fat and carbohydrate balances in the first two weeks of life. *J Pediatrics*, 1981;99:617.
 57. Santos SC. Aminoácidos plasmáticos de recém nascidos pré-termo alimentados com diferentes dietas de leite humano de banco, Campo Grande 91f. Dissertação [Mestrado] Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2003.

58. Steer PA, Lucas A, Sinclair JC. Feeding the low birth weight infant. In: Sinclair JC, Racken MB. Effective care of the newborn infant. Oxford: Oxford University, 1992;94-140.
59. Whitelaw A, Sleath K. Myth of the marsupial mother: Home care of very low birth weight babies in Bogota, Colombia. *Lancet*, 1995;2:1206.
60. Palhares DB, Braga LP. Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *J. Pediatrics RJ*, 2007;83-1:59-63.
61. Nejar FF, Segall-Correa AM, Ferreira M, et al. Padrões de aleitamento materno e adequação energética, *Cad. Saúde Publica*, 2004;20-1:64-71.
62. Parish A, Bhatia J. Feeding strategies in the ELBW infant. *J Perinatol*. 2008;28 (suppl):S18–S20.
63. Tyson JE, Parikh NA, Verde JC, Higgins RD. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network Intensive care for extreme prematurity: moving beyond gestational age. *N Engl J Med*. 2008; 358 16:1672–1681.
64. Clemens RA, Hernell O, Michaelsen KF. Human Milk vs. Cow's Milk and the Evolution of Infant Formulas. *Milk and Milk Products in Human Nutrition*. Nestlé Nutr Inst Workshop Ser Pediatr Program, vol 67, pp 17–28, Nestlé, Vevey/S. Karger AG, Basel, © 2011.
65. Lönnerdal B. Biological effects of novel bovine milk fractions. *Nestlé Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2011;67:41-54.
66. Castellote C, Casillas R, Ramírez-Santana C, et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr*. 2011 Jun;1416:1181-7.
67. Hay WW. Nutrient supplies for optimal health in preterm infants. Current issues on the nutrition of the preterm infant. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;45:S163–S169.
68. Shaikh U, Chantry C. Reflections on the American Academy of Pediatrics 2005 policy statement on Breastfeeding and the use of human milk. *J Hum Lact*. 2006 Feb;22;1:108-10.
69. Muglia LJ, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med*. 2010; 362 6:529–535.
70. Ehrenkranz RA. Early, aggressive nutritional management for very low birth weight infants:What is the evidence? *Semin Perinatol* 2007; 31:48-55.
71. Hay WW. Early postnatal nutritional requirements of the very preterm infant based on a presentation at the NICHD-AAP Workshop on Research in Neonatology. *J Perinatol*.2006;26:13–18.
72. Lassi ZS, Haider BA, Bhutta ZA. Community-based intervention packages for reducing maternal and neonatal morbidity and mortality and improving neonatal outcomes. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Nov 10;11: Review.
73. Ensor T, Cooper S, Davidson L, et al. The impact of economic recession on maternal and infant mortality: lessons from history. *BMC Public Health*. 2010 Nov 24;10:727.
74. Cousens S, Blencowe H, Stanton C, et al. National, regional, and worldwide estimates of stillbirth rates in 2009 with trends since 1995: a systematic analysis. *Lancet*. 2011 Apr 16;377:1319-30.

75. Thureen PJ, Hay WW. Nutritional requirements of the very low birth weight infant. In: Neu J, editor. *Gastroenterology and Nutrition*. Philadelphia: Elsevier Science; 2008. p. 208–222.
76. Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, et al. Breastfeeding and the use of human milk. *American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. Pediatrics*. 2005 Feb;115;2:496-506.
77. Woo K, Spatz D. Human milk donation: what do you know about it? *MCN Am J Matern Child Nurs*. 2007 May-Jun;32;3:150-5;156-7 Review .
78. Hay WW. Intravenous nutrition for the extremely preterm infant. In: Pereira G, editor. *Nutrition of the Premature Infant*. RJ: medbook Editora Cientifica; 2008. pp. 141–178
79. Van Goudoever JB, Van der Schoor SR, Stoll B, Burrin DG, et al. Intestinal amino acid metabolism in neonates. *Nestlé Nutr Workshop Pediatr Program*. 2006; 58:95-102;102-8.
80. Feferbaun R, Falcão MC. *Nutrição do Recém-Nascido*. Ed SP: Atheneu, 2003. Cap. 26, 315 -328
81. Pietz J, Achanti B, Lilien L, et al. Prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants: 20-year experience. *Pediatrics* 2007;119:164–170.
82. Coutsoydis I, Adhikari M, Nair N, Coutsoydis A. Feasibility and safety of setting up a donor breastmilk bank in a neonatal prem unit in a resource limited setting: An observational, longitudinal cohort study. *BMC Public Health* 2011 May 20;11;1:356
83. McGuire W, Anthony MY. Donor human milk versus formula for preventing necrotizing enterocolitis in preterm infants: systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:11–14.
84. Sisk PM, Lovelady CA, Dillard RG, Gruber KJ, O'Shea TM. Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Perinatol* 2007;27:428–433.
85. Hay WW. Nutrition and development of the fetus: carbohydrate and lipid metabolism. In: Walker WA, Watkins JB, Duggan CP, editors. *Nutrition in Pediatrics*. ed 4. Basic Science and Clinical Applications: Hamilton, Decker; 2008. 311–325.
86. Kashyap S. Is the early and aggressive administration of protein to very low birth weight infants safe and efficacious *Curr Opin Pediatr*. 2008 Apr;20(2):132-6.
87. Rocha NM, Martinez FE, Jorge SM. Cup or bottle for preterm infants: effects on oxygen saturation, weight gain and breastfeeding. *J Hum Lact*. 2002;18:132-8.
88. Pinelli J, Saigal S, Atkinson SA. Effect of breast milk consumption on neurodevelopmental outcomes at 6 and 12 months of age in VLBW infants. *Adv Neonatal Care*. 2003;3:76-87.
89. Schutzman DL, Porat R, Salvador A, Janeczko M. Neonatal nutrition: a brief review. *J Pediatr*. 2008 Nov;4(4):248-53. 2008 Dec 23.
90. Lien E, Davis A. A multicenter study of the growth, acceptability and protein status of a lower protein term infant formula with increased bovine alpha-lactalbumin. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 34:A479.
91. Santos SC, Figueiredo CM, Andrade SMO, Palhares DB. Plasma amino acids in preterm infants fed different human Milk bank. *Eur J Clin Nutr Met* 2007; 2: 51 – 56.

92. Clark RH, Chace DH, Spitzer AR; Pediatrix Amino Acid Study Group. Effects of two different doses of amino acid supplementation on growth and blood amino acid levels in premature neonates admitted to the neonatal intensive care unit: a randomized, controlled trial. *Pediatrics*. 2007;120;6:1286–1296.
93. Young TE. Prolact+ H²MFTM Human Milk Fortifier. NEOFAX[®] Twenty-second ed: 2009;321 – 7.
94. Zello GA, Menendez CE, Rafii M, Clarke R, Wykes LJ, Ball RO, Pencharz PB. Protein kinetics in the preterm neonate studied at differing short-term protein intakes using various stable amino acid isotopic tracers. *Pediatr. Res*. 2003;53:338-344.
95. Wu G. Amino acids: metabolism, function and nutrition. *Amino acids* 2009; 37:1-177.
96. Bishara R, Dunn MS, Merko SE, Darling P. Nutrient composition of hindmilk produced by mothers of very low birth weight infants born at less than 28 weeks' gestation. *J Hum Lact*. 2008 May;24;2:159-67.
97. Hay WW, Brown LD, Regnault TRH: Fetal requirements and placental transfer of nitrogenous compounds. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, editors. *Fetal and Neonatal Physiology*. ed 4. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2008.
98. Huppi PS, et al. Nutrition for the brain. Commentary on the article by Isaacs et al. 308. *Pediatr Res*. 2008;63:229–231.
99. Lodygensky GA, Seghier ML, et al. Intrauterine growth restriction affects the preterm infant's hippocampus. *Pediatr Res*. 2008;63:438–443.
100. Isaacs EB, Gadian DG, Sabatini S, et al. The effect of early human diet on caudate volumes and IQ. *Pediatr Res*. 2008;63:229–231.
101. Pereira GR, Nieman I. Métodos de nutrição por via enteral em recém-nascido pré-termo. In: Pereira Gr, editors. *Nutrição do recém-nascido pré-termo*. RJ: medbook 2008; 31 – 43.
102. Mena PM. Ácidos Graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPICL): seus efeitos no Recém-nascido Pré-termo. In: Pereira GR, Leone CR, Navantino AF, editors. *Nutrição do Recém-nascido Pré-termo*. 1ª ed RJ: medbook; 2008.
103. Quigley M, Henderson G, Anthony MY, McGuire W. Fórmula Milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants (Review). *The Cochrane Library* 2009;1– 46.
104. Sandström O, Lonnerdal B, Graverholt G, Hernell O. Effects of α -lactalbumin enriched fórmula containing different concentrations of glycomacropeptide on infant nutrition. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 921 – 8.
105. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K. Clinical assessment of gestational age in the newborn infant. *J. Pediatrics*, 1997;119:417.
106. Serafim, PO. Suplemento homólogo do leite humano acrescido ao leite humano de banco para alimentação do recém nascido de muito baixo peso. CG [Dissertação Mestrado]. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2010.
107. Thomaz, DMC. Manipulação de um suplemento oriundo do próprio leite humano para alimentação de recém nascidos de muito baixo peso, e análise da tolerância gastrointestinal, crescimento e perfil bioquímico. CG. [Tese Doutorado]. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2010.

108. Santos MM. Preparo de um concentrado de Leite Humano Especial para Recém-nascido Pré-termo. Ribeirão Preto. [Mestrado] Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1994.
109. Shott S. Statistics for Health Professionals. London: W.B. Saunders Company, 1990.
110. Reynolds RM, Bass KD, Thureen PJ. Achieving positive protein balance in the immediate postoperative period in neonates under-going abdominal surgery. *J Pediatr*. 2008;152:63–67.
111. Sluncheva B. Strategies for nutrition of the preterm infant with low and very low birth weight. *Akush Ginekol* 2010;49;2:33-9.
112. Koletzko B, Schiess S, Brands B, et al. Infant feeding practice and later obesity risk. Indications for early metabolic programming. *Gesundheitsschutz*. German 2010 Jul;53;7:666-73.
113. Lucas A, McLaughlan P, Coombs RR. Latent anaphylactic sensitisation of infants of low birth weight to cows' milk proteins. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984 Nov 10;289;6454:1254-6.
114. Moro EG, Fulconis, Minoli I, Pohlandt F, Rähä NCR. Growth and plasma amino acid concentration in very low birth infants fed either human milk protein fortified human milk or a whey predominant formula. *Scand Paediatr Jan* 1989;78;1:18-22.
115. Braga LP, Palhares DB. Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *J Pediatr RJ* 2007 Jan-Feb;83;1:59-63.
116. Reali A, Greco F, Fanaro S, Atzei A, Puddu M, Moi M, Fanos V. Fortification of maternal milk for very low birth weight (VLBW) pre-term neonates. *Early Hum Dev*. Jul 2010;86;1:33-6.
117. Ewaschuk JB, Unger S, Harvey S, O'Connor DL, Field CJ. Effect of pasteurization on immune components of milk: implications for feeding preterm infants. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2011 Apr;36;2:175-82.
118. Gordon HH, Levine SZ, McNamara H. Feeding of premature infants: a comparison of human and cow's milk. *Am J Dis Child* 1947;73:442–452.
119. Omans WB, Barness LA, Rose CS, Gyorgy P. Prolonged feeding studies in premature infants. *J Pediatr* 1961;59:951–957.
120. Pger SKT, Axelsson IE, Rähäolber NCR. Amino acid concentrations in plasma and urine in very low birth weight infants fed protein unenriched or human milk protein-enriched human milk. *Pediatrics* 1990; 86:909-15.
121. Atkinson SA, Hanning RM. Amino acid metabolism and requirements of the premature infant: is human milk the “gold standard”? In: Protein and non-protein nitrogen in human milk. 1989;187–209.
122. Santos SC, Figueiredo CM, Andrade SMO, Palhares DB. Plasma amino acids in preterm infants fed different human Milk bank. *Eur J Clin Nutr Met* 2007;2:51–56.
123. Palhares DB, Thomaz DMC, Tavares LV, Serafin P. Effect of diet on serum amino acid profile in very-low-birthweight neonates. *Advances in Medicine and Biology*, Volume 31. 2011.
124. Peterson J, Taylor HG, Minich N, Klein N, Hack M. Subnormal head circumference in very low birth weight children: neonatal correlates and school-age consequences. *Early Hum Dev* 2006;82:325—34.
125. Brandt I, Sticker EJ, Lentze MJ. Catch-up growth of head circumference of very low birth weight, small for gestational age preterm infants and mental development to adulthood. *J Pediatr* 2003;142:463—8.

126. Cooke RJ, Embleton ND, Griffin IJ, Wells JC, McCormick KP. Feeding preterm infants after hospital discharge: growth and development at 18 months of age. *Pediatr Res* 2001;49:719–22.
127. Loui A, Raab A, Obladen M, Brätter P. Calcium, phosphorus and magnesium balance: FM85 fortification of human milk does not meet mineral needs of extremely low birthweight infants. *Europ J Clin Nutr* 2002; 56:228 – 235.
128. Xavier CC, Anchieta LM, Ornelas SI. Crescimento do recém-nascido pré-termo. *SP, Nestlé* 2004:24-77.
129. Ketut DKW, Soetjningsih; Suandi IKG; Hamid HA. The efficacy of fortified human milk compared to human milk alone for the growth of low birth weight infants. *Paediatrica Indonesiana* 2003;43: 9-10.
130. Mataloun MB, Leone CR, Ono N, Vaz FC. Repercussões neonatais do uso de leite materno com aditivos e fórmula para pré termo em recém nascidos de muito baixo peso. *Pediatria* 2004;26;4:247-56.
131. Schanler RJ, Lau C, Hurst NM, Smith EO. Randomized trial of donor human milk versus preterm fórmula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. *Pediatrics* 2005;116;2:400-406.
132. Cockerill J, Uthaya S, Doré CJ, Modi N. Accelerated postnatal head growth follows preterm birth. *Arch child fetal neonatal ed* 2006;91:184-187.
133. Singhal A, Farrooqi S, O'rahilly S, et al. Early nutrition and leptin concentrations in later life. *Am J Clin Nutr* 2002;75:993-9.
134. Singhal A, Fewtren M, Cole TJ et al. Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescence born preterm. *Lancet* 2003;361:1089-97.
135. Hales CN, Ozanne SE. The dangerous road of catch-up growth. *J Physiol* 2003;547:5-10.
136. Graham-Thiers PM, Bowen LK. Effect of protein source on nitrogen balance and plasma amino acids in exercising horses. *J Anim Sci.* 2011 Mar;89;3:729-35.
137. William W. Hay, Jr. Strategies for Feeding the Preterm Infant *Neonatology.* October 2008; 94;4: 245–254.
138. Anderson PJ, Wood SJ, Francis DE, Coleman L, Anderson V, Boneh A. Are neuropsychological impairments in children with early-treated phenylketonuria (PKU) related to white matter abnormalities or elevated phenylalanine levels? *Dev Neuropsychol* 2007; 32;2:619-748.
139. Van den Akker CH, Braake FW, Rövekamp-Abels WW, Van Goudoever JB. Quality of amino acid solutions for preterm infants. *Pediatrics* 2008 Apr;121;4:865-6.
140. Davis AM, Harris BJ, Lien EL, et al. Alpha-lactalbumin-rich infant formula fed to healthy term infants in a multicenter study: plasma essential amino acids and gastrointestinal tolerance. *Eur J Clin Nutr* 2008 Nov;62;11:1294-301.
141. Wurtman RJ. Synapse formation and cognitive brain development: effect of docosahexaenoic acid and other dietary constituents. *Metabolism.* 2008 Oct;57 Suppl 2:S6-10 Review.
142. Cieśla J, Frączyk T, Rode W. Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta Biochim Pol.* 2011 May 2.

143. Stipanuk MH. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 2004;24:539–577.
144. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview *J Nutr* 2006;136:1636-1640.
145. Biju T, Lourdes L, Carole B, et al. Metabolism of Methionine in the Newborn Infant: Response to the Parenteral and Enteral Administration of Nutrients *Pediatr Res*. 2008 October; 64;4: 381–386.
146. Sarwar G, Darling P, Ujiie M, Botting HG, Pencharz PB. Use of amino acid profiles of preterm and term human milks in evaluating scoring patterns for routine protein quality assessment of infant formulas. *J AOAC Int*. 1996 Mar-Apr;79;2:498-502.
147. P Thureen, WC Heird. Protein and energy requirements of the preterm/low birthweight (LBW) infant. *Pediatr Res*. 2005;57:95–98R.
148. Paula P. Meier RN, et al. Improving the Use of Human Milk During and After the NICU Stay *Clin Perinatol*. 2010 March; 37;1:217–245.
149. Riabkova MG, Tsypin LE, Grebennikov VA, et al. Principles of nutritional support of critically ill premature infants. *Anesteziol Reanimatol*. Russian Jan-Feb 2010;1:34-7.
150. Taylor SN, Basile LA, et al. Intestinal permeability in preterm infants by feeding type: mother's milk versus formula. *Breastfeed Med*. 2009 Mar;4;1:11-5.
151. Ten Hoedt AE, Van Kempen AA, Boelen A, Duran M, et al. High incidence of hypermethioninaemia in a single neonatal intensive care unit detected by a newly introduced neonatal screening programme. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30:978.
152. Arslonoglu S, Moro GE, Ziegler EE. Adjustable fortification of human milk fed to preterm infants: Does it make a difference? *J Per*. 2006;26:614 – 21.
153. Kashyap S. Enteral intake for very low birth weight infants: what should the composition be? *Semin Perinatol*. 2007 Apr;31;2:74-82. Review.
154. Mudd SH. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: A review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2011 Feb 15;157;1:3-32.
155. Chen L, P Li, Wang JJ, Li XL, Gao HJ, Yin YL, Hou YQ, Wu Glucocorticoid regulation of amino acid and polyamine metabolism in the small intestine. *Amino Acids* . 2009;37:123 –9.
156. Puiman PJ, Jensen M, Stoll B, et al .Intestinal Threonine utilization for Protein and Mucin Synthesis Is Decreased in Formula-Fed Preterm Pigs.*J Nutr*. 2011 May 18.
157. Darling PB, Dunn M, Sarwar G, et al. Threonine kinetics in preterm infants fed their mothers' milk or formula with various ratios of whey to casein. *Am J Clin Nutr*. 1999 Jan;69;1:105-14.
158. Lei GK, Bertolo RF, Adjiri Awere A, Pencharz PB. Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.2007; 292:G1293– 301.
159. Burrin DG, Stoll B. Key nutrients and growth factors for the neonatal gastrointestinal tract.*Clin Perinatol*. 2002 Mar;29;1:65-96 Review.
160. Sophie RD, Van S, Darcos L, et al. The gut takes nearly all: threonine kinetics in infants. *American J Clin Nutr*, October 2007;86:4,1132-1138.
161. Polberger S, Rähä NC, Juvonen P, et al. Individualized protein fortification of human milk for preterm infants: comparison of ultrafiltrated human milk

- protein and a bovine whey fortifier. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999 Sep;29;3:332-8.
162. Jochum F, Colling S, Meinardus P, et al. Total glutamine content in human milk is not influenced by gestational age. *Acta Paediatr.* 2006 aug;95;8:985-90.
 163. Singhal A, Cole TJ, Fewtrell, Lucas A. Breast milk feeding and lipoprotein profile in adolescents born preterm: follow-up of a prospective randomized study. *Lancet.* 2004;363:1571-8.
 164. Tubman TR, Thompson SW, McGuire W. Glutamine supplementation to prevent morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Jan 23;1:1457.
 165. Feldman R, Eidelman AI. Direct and indirect effects of breast milk on the neurobehavioral and cognitive development of premature infants. *Dev Psychobiol.* 2003;43:109-19.
 - 166- Morley R, Fewtrell MS, Abbott RA, et al. Neurodevelopment in children born small for gestational age: a randomized trial of nutrient-enriched *versus* standard formula and comparison with a reference breastfed group. *Pediatrics.* 2004;113:515-21.
 167. Köhler ES, Sankaranarayanan S, Van Ginneken CJ, et al. The human neonatal small intestine has the potential for arginine synthesis; developmental changes in the expression of arginine-synthesizing and -catabolizing enzymes. *BMC Dev Biol.* 2008 Nov 10;8:107.
 168. Van Zwol A, Neu J, Van Elburg RM. Long-term effects of neonatal glutamine-enriched nutrition in very-low-birth-weight infants. *Nutr Rev.* 2011 Jan;69;1:2-8.
 169. Valentine CJ, Morrow G, Fernandez S, et al. Docosahexaenoic Acid and Amino Acid Contents in Pasteurized Donor Milk are Low for Preterm Infants. *J Pediatr.* 2010 dec;157;6:906-10.
 170. Silvestre D, Ferrer E, Gayá J, et al. Available lysine content in human milk: stability during manipulation prior to ingestion. 2006;26;1:71-9.
 171. Olle H, Lönnerdal BO. Nutritional evaluation of protein hydrolysate formulas in healthy term infants: plasma amino acids, hematology, and trace elements 1,2,3. *American J Clin Nutr.* 2003;78:2,296-301.
 172. Van den Akker CH, Braake FW, Wattimena DJ. Effects of early amino acid administration on leucine and glucose kinetics in premature infants. *Pediatr Res.*2006;59;5:732– 735.
 173. Quigley MA, G Henderson, et al. Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Oct 17;4.
 174. Boyd CA, Quigley MA, Brocklehurst P. Donor breast milk versus infant formula for preterm infants: systematic review and metaanalysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2007;92:169–175.



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS



Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1412 da Pesquisadora Luciana Venhofen Martinelli Tavares intitulado "Determinação de aminoácidos em crianças pré-termo alimentada com três dietas modificadas de Leite Humano", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 04 de junho de 2009, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos

Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 04 de junho de 2009.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Mãe, você está sendo convidada a participar dessa pesquisa e eu gostaria que antes de tomar uma decisão, que você lesse o que eu proponho abaixo. As informações a seguir estão sendo fornecidas para que decida de maneira livre e esclarecida a participação de seu recém-nascido (Rn) neste estudo que está sendo conduzido pela Fisioterapeuta Luciana Venhofen Martinelli Tavares sob orientação do Profº Dr. Durval Batista Palhares. Farão parte desta pesquisa 30 bebês.

O leite humano é o melhor alimento a ser oferecido ao recém-nascido, mas, não é sempre igual. O recém-nascido prematuro precisa muito do leite humano, preferencialmente o de sua mãe. Quando isso não é possível, o bebe recebe o leite que vem do banco de leite o qual passa por um controle de qualidade do banco de leite. Pesquisas têm mostrado que, acrescentar suplementos ao leite humano traz benefícios ao crescimento e desenvolvimento desses recém-nascidos. O Leite de banco de leite pode não ser suficiente na constituição protéica e perfil de aminoácidos, isso porque os prematuros necessitam de mais calorias, minerais e proteínas para seu melhor desenvolvimento. Uma alternativa na alimentação do prematuro é o uso do LH com acréscimo de um aditivo, pois aumenta a taxa de crescimento expressa como ganho de peso, comprimento e tamanho da cabeça e se esse leite humano for o da própria mãe haveria benefícios no desenvolvimento além de potencializar a duração da lactação.

Por isso para acompanhar o crescimento e a nutrição de seu filho precisamos fazer exames de sangue e acompanhar o peso e comprimento, o que já é de rotina do hospital.

Após o início da pesquisa o Rn poderá ser incluído somente em um único estudo. Ele será pesado, medido estatura e a cabeça semanalmente para acompanharmos e o crescimento. Como rotina do UTI e do berçário, será colhida uma pequena amostra de sangue (1ml) para o acompanhamento do Rn semanalmente. Os bebes prematuros precisam receber esses aditivos, pois enriquecermos o leite humano com proteínas do próprio leite materno na diminuição dos custos com a alimentação. Trata-se, portanto, de tentativa para alcançarmos o alimento ideal para o RNPT e assim melhorarmos o atendimento aos RNs internados e contribuirmos com pesquisas nesta área, que promova crescimento, diminua o período de internação, reduza a incidência de complicações relacionadas à nutrição e para favorecer o vínculo materno infantil. O propósito deste estudo é saber se o leite humano acrescido com aditivos proporcionará no sangue uma quantidade aceitável de aminoácidos.

Os RN não serão excluídos de quaisquer rotinas do serviço de Neonatologia. Caso seja necessário o volume da dieta poderá ser usado de acordo com as manifestações clínicas do Rn. Os resultados dos exames serão de conhecimento somente da pesquisadora, e você poderá receber todas as informações a respeito da pesquisa sempre que desejar. Sua participação neste estudo é voluntária e sem compensação financeira pela participação, podendo escolher não fazer parte ou desistir a qualquer momento, não significando perda de qualquer benefício. A duração da pesquisa dependerá dos bebês que serão internados e que se encaixem no perfil procurado. Será realizado um sorteio para a escolha da dieta que o seu bebê receberá.

Todos os dados coletados serão confidenciais e a identidade dos Rns preservadas. A menos que requerido por lei, somente o pesquisador, a equipe do estudo e o Comitê de Ética terão acesso às informações sobre o estudo. Para consideração ou dúvida ética da pesquisa entre em contato com o comitê de ética da em pesquisa da UFMS fone (33457187).

Se você concorda em participar do estudo, e não tem dúvidas, peço que assine o termo livre e esclarecido em duas vias.

Pesquisadora:

Luciana Venhofen Martinelli Tavares

Eu _____ responsável pelo paciente
RG no HU número _____ declaro que entendi todo o conteúdo deste formulário e tomo a participação de meu Rn voluntária nesta pesquisa: Determinação de aminoácidos em crianças pré-termo alimentadas com três dietas modificadas de leite humano. Conheço os objetivos e estou ciente de sua duração.

Campo Grande – MS, / /