

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES AMBIENTES  
INTRAUTERINOS SOBRE A COMPOSIÇÃO  
HORMONAL DO COLOSTRO E LEITE MADURO E O  
PESO DE LACTENTES  
– COORTE IVAPSA –**

TESE DE DOUTORADO

**MARINA NUNES**

Porto Alegre, Brasil.

TESE DE DOUTORADO

*Influência de Diferentes Ambientes Intrauterinos sobre a Composição  
Hormonal do Colostro e Leite Maduro e o Peso de Lactentes – Coorte  
IVAPSA –*

**MARINA NUNES**

A apresentação dessa tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Doutor

Orientador: **Marcelo Zubaran Goldani**

Porto Alegre, Brasil.

2015

### CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Marina  
Influência de Diferentes Ambientes Intrauterinos  
sobre a Composição Hormonal do Colostro e Leite  
Maduro e o Peso de Lactentes - Coorte IVAPSA - /  
Marina Nunes. -- 2015.  
157 f.

Orientador: Marcelo Zubaran Goldani.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto  
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Aleitamento materno. 2. Leptina. 3. Insulina.  
4. Adiponectina. 5. PIG. I. Goldani, Marcelo  
Zubaran, orient. II. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E**  
**DO ADOLESCENTE**

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

27/02/2015

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof.<sup>a</sup> Dra. Heloisa Bettiol

Universidade de São Paulo

Dra. Leila Cristina Pedroso de Paula

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elsa Regina Justo Giugliani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcelo pela oportunidade de participar deste grupo, no qual fiz amizades que serão para sempre, e que me proporcionou um crescimento pessoal, científico e profissional intenso. Obrigada, também, por todo o brilhantismo singular e ao mesmo tempo pela humildade com que trata com as pessoas. Às vezes parecem qualidades incompatíveis, mas que estão indiscutivelmente presentes.

Ao professor Clécio H. da Silva, que conheci em 2007 e que voltamos a nos encontrar para trabalharmos juntos. Habilidoso nas palavras e minucioso nos detalhes, os quais não devem passar despercebidos. Alguém com quem posso discutir futebol e dividir as angústias do nosso tricolor porto-alegrense.

À professora Vera Bosa que também conheci na graduação como professora e com quem, hoje, pude trabalhar novamente.

À Isabel Werlang apesar de todos os percalços que passou sempre esteve presente, parceira e com uma calma invejável. Obrigada por dividir as tensões, as alegrias e as angústias. Minha co-orientadora, apesar de não tê-la oficializado. Devo-te mais essa.

À Monique Hahn com quem convivi quase que diariamente e que, junto com a Isabel, passamos a ser confidentes uma das outras, facilitando a rotina pela conexão que criamos dentro e fora do trabalho.

À Juliana Bernardi que se antecipou à minha tentativa de retornar a casa (UFRGS) com a prerrogativa de que teríamos muito trabalho pela frente. Foi quem me apresentou ao professor Marcelo e ao grupo.

À Mariana Brito e Tanara Vogel, cada uma com suas especificidades, uma mais agitada outra mais tranquila, mas que tornaram, também, o dia a dia mais inspirador. Também, as mais recentes no grupo: Thamíris Medeiros, Amanda, Salete Matos, Fabiana Copês e Marina Seady (IC) que assumiram as rotinas para o prosseguimento desse imenso trabalho.

A todos que já passaram pelo grupo e que fizeram e fazem muita falta. Não só pela redução de “mão-de-obra”, mas, principalmente, pelas conversas diárias e pela amizade criada, mas que acabaram seguindo seus próprios rumos: Renata Escobar, Roberta Sena, Márcio Bonesso, Adolfo Reis e a todas as ICs que também participaram, em especial, Maria Eduarda Claus, Bárbara Ergang, Mariana K. Alves, Juliana Sander, Júlia K. M. Barreto, Hellena Vido, Bianca Darde (experimental) entre outras.

A todas as mães e famílias que aceitaram participar dessa coorte e que nos receberam muitas vezes gratas pelo que estávamos fazendo, quando na verdade a maior gratidão vinha de nossa parte.

À Rosane Blanguer que está sempre disponível para nos atender nas várias dúvidas que surgem. Tem sempre todas as soluções de imediato.

Agradeço a todos familiares e amigos que de alguma forma participaram do meu crescimento pessoal e profissional, desde o princípio dessa jornada iniciada na graduação, com minha mudança para Porto Alegre.

À minha família, em especial, meus irmãos, Cris, Caco e Biti, sempre disponíveis para tudo e, principalmente, para ouvir minhas teorias apesar de dificilmente concordamos, para tornarmos a conferência mais abundante. Cada um com opinião própria, sempre

discutidas em alto e bom som, como toda família grande. Às esposas, Dani e Lilian, e meus sobrinhos também - Marthina, Maria Eduarda e Thales.

À minha irmã que foi morar longe para buscar seu próprio sonho, mas que não foi um empecilho para mantermos os mesmos laços que nos uniram no ventre de nossa mãe. Obrigada, por tudo, sempre e para sempre.

Aos meus pais, Zé e Salete, aos quais não canso de agradecer e, ainda assim, parece que nunca será suficiente. Pois sempre fizeram e fazem de tudo para que sejamos pessoas felizes e nos incentivam a buscar os nossos sonhos. Mesmo na “fase” que seria dos netos apenas, sempre mantêm constante a “fase dos filhos”. Apesar de todas as dificuldades já superadas por eles, estão sempre prontos para encarar juntos as nossas dificuldades. Segundo a teoria do seu Zé (meu pai), “pobre vive de teimoso” e, cá estamos, juntos novamente, para superar mais uma batalha.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a influência de diferentes ambientes intrauterinos na concentração de hormônios no leite materno e sua relação com o peso da criança nos primeiros seis meses de vida.

**Materiais e Métodos:** Trata-se de um estudo de coorte prospectivo de uma amostra de recém-nascidos a termo da cidade de Porto Alegre. O recrutamento dos pares mãe-bebê ocorria 24 a 48 horas após o parto e os sujeitos incluídos em um dos cinco grupos: Diabetes, Hipertensão, Tabagistas, Pequenos para Idade Gestacional (PIG) e Controle. O colostro foi coletado no pós-parto e o leite maduro no 1º mês. Foram quantificadas as concentrações de Leptina, Adiponectina e Insulina pelo método ELISA. O peso e a estatura das mães e das crianças foram obtidos em todas as entrevistas

**Resultados:** A concentração dos hormônios diminuiu com a maturação do leite materno com diferença estatística do colostro para o leite maduro para leptina no PIG ( $p=0,05$ ) e Insulina nos grupos PIG ( $p=0,012$ ) e Controle ( $p=0,041$ ). O grupo PIG diferiu estatisticamente do Controle na concentração de leptina no 1M ( $p=0,045$ ). O peso dos recém-nascidos PIG foi inferior aos outros grupos no nascimento e na alta hospitalar, mantendo-se diferente aos 15 dias do diabetes e controle, e, apenas do controle, no 1º mês. A partir dessa entrevista, a média de peso do PIG foi semelhante aos outros grupos indicando um *catch up* precoce avaliado pela diferença de escore-Z de peso para idade



(>0,67). Tanto a leptina ( $r=-0,295$ ;  $p=0,03$ ) quanto a insulina ( $r=0,262$ ;  $p=0,047$ ) do leite maduro se correlacionaram com o ganho de peso da criança no 1º mês.

**Conclusões:** A concentração dos hormônios no leite materno dos cinco grupos é semelhante ao nascimento, mas diminui do colostro para o leite maduro. A leptina e a insulina tem redução estatisticamente significativa no grupo FIG. O estudo demonstra uma antecipação metabólica do leite materno sobre a condição de FIG, relacionando-se com a possibilidade de um *catch up* precoce no primeiro mês de vida desses lactentes.

**Palavras chave:** Aleitamento materno, Leptina, Insulina, Adiponectina, IMC, FIG, Coorte, Peso, Recém-nascido.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the influence of different intrauterine environments on breast milk hormones concentration and its relationship with infant weight up to 6 months.

**Material and Methods:** This is a thematic, prospective and longitudinal term born cohort from Porto Alegre, Brazil. Mother-infant pairs were recruited 24 to 48 hours after birth and then included in one of five groups: diabetes, hypertension, smoking, mothers of Small for Gestational Age (SGA) and controls. Colostrum was collected at 24h postpartum and mature milk 1 month later. Breast milk leptin, adiponectin and insulin were determined by ELISA. In all interviews mother and infant weight and height were obtained.

**Results:** Adipokines levels decreased according to milk maturation with statistical difference in leptin from colostrum to mature milk in SGA group ( $p=0.05$ ) and insulin in SGA ( $p=0.012$ ) and control ( $p=0.041$ ) groups. SGA differed statistically from control at colostrum in leptin concentration ( $p=0,045$ ). SGA had low maternal BMI means values in all measurements reflecting in lower leptin and insulin concentration. SGA infant weight was statistically different from all groups at born and at discharge keeping different from diabetes and control at 15 days postpartum and only from control at 1 month. After, the weight mean of SGA was similar from others groups indicating an early catch up. Both, leptin ( $r=-0.295$ ;  $p=0.03$ ) and insulin ( $r=0.262$ ;  $p=0.047$ ) at 1 month were correlated with infant weight gain at 1 month.

**Conclusion:** Breast milk hormones are similar at birth in all groups but the concentration decreases from colostrum to mature milk. SGA had a significant reduction in leptin and insulin concentration. This study demonstrates breast milk metabolic anticipation on SGA, probably is related to early catch up at 1 month of life.

**Key words:** Breast milk, Leptin, Insulin, Adiponectin, BMI, SGA, Cohort, Weight, Newborn.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- **Figura 1.** Organograma logístico das entrevistas realizadas e as informações coletadas. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.
- **Figura 2.** Gráfico da diferença do escore – Z de Peso para Idade (P/I) em relação ao nascimento de acordo com os grupos. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.
- **Figura 3.** Gráfico da correlação dos hormônios no Pós Parto (PP) e no 1º Mês (1M). Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.

## LISTA DE TABELAS

- **Tabela 1.** Síntese das publicações referentes aos hormônios Leptina, Adiponectina e Insulina no Leite Materno.
- **Tabela 2.** Recomendações básicas para o ganho de peso durante a gestação de feto único. IOM, 2009.
- **Tabela 3.** Características socioeconômicas, dados pré-natais e do parto de acordo com os grupos. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.
- **Tabela 4.** Concentrações medianas de hormônios no Leite Materno entre os grupos. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.
- **Tabela 5.** Frequência de crianças avaliadas em aleitamento materno de acordo com os grupos. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.
- **Tabela 6.** Frequência e percentual de adequação do ganho de peso gestacional de acordo com o IOM, 2009. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.
- **Tabela 7.** Tendência do Índice de Massa Corporal (IMC) materno de acordo com o grupo. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.
- **Tabela 8.** Correlação dos hormônios no leite materno com o Índice de Massa Corporal materno. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.
- **Tabela 9.** Peso da criança ao longo de seis meses de acordo com o grupo. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.
- **Tabela 10.** Correlação dos hormônios do leite materno com o peso da criança. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.

**LISTA DE SIGLAS**

**ADIPO:** Adiponectina

**CONT:** Controle

**DOHaD:** Origens Desenvolvimentistas da saúde e doença/ *Developmental Origins of Health and Disease*

**DM:** Diabetes Mellitus

**DMG:** Diabetes Mellitus Gestacional

**ELISA:** *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*

**GHC:** Grupo Hospitalar Conceição

**HAS:** Hipertensão Arterial Sistêmica

**HCPA:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**IDH:** Índice de Desenvolvimento Humano

**IGN:** Ignorado

**IMC:** Índice de Massa Corporal

**IMCpg:** Índice de Massa Corporal pré-gestacional

**INCA:** Instituto Nacional de Câncer

**IOM:** *Institute of Medicine*

**IVAPSA:** Impacto das Variações do Ambiente Intrauterino sobre a Saúde do Adulto

**LEP:** Leptina

**LM:** Leite Materno

**LPT:** Laboratório de Pediatria Translacional

**ML:** Mililitro

**MS:** Ministério da Saúde

**NG:** Nanograma

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PIG:** Pequeno para Idade Gestacional

**PP:** Pós-parto

**P/I:** Peso para Idade

**RCIU:** Restrição de Crescimento Intrauterino

**SPSS:** *Statistical Package for Social Sciences*

**SUS:** Sistema Único de Saúde

**TBCO:** Tabagismo

**VIGITEL:** Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por Inquérito Telefônico

**7D:** entrevista aos 7 Dias

**15D:** entrevista aos 15 Dias

**1M:** entrevista no 1º Mês

**3M:** entrevista no 3º Mês

**6M:** entrevista no 6º Mês

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2.1 Ambiente Intrauterino.....	21
2.2 Diabetes Mellitus .....	21
2.3 Hipertensão Arterial .....	23
2.4 Tabagismo .....	24
2.5 Pequeno para Idade Gestacional (PIG).....	26
2.6 Leite Materno e hormônios .....	29
2.7 Leptina .....	30
2.8 Adiponectina.....	31
2.9 Insulina .....	31
3. JUSTIFICATIVA .....	44
4. OBJETIVOS.....	45
4.1 Objetivo Geral .....	45
4.2 Objetivo específico .....	45
4.3 Objetivos secundários.....	45
5. HIPÓTESE DE TRABALHO .....	46
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
6.1 Local de Estudo e Delineamento .....	47
6.2 Critérios de Inclusão e Exclusão .....	47



	17
6.3 Logística .....	48
6.4 Variáveis Coletadas .....	49
6.5 Procedimentos .....	51
6.5.1 Antropometria.....	51
6.5.2 Leite Materno .....	52
6.6 Processamento e Análise dos Dados .....	53
6.7 Cálculo da Amostra .....	54
6.8 Aspectos Éticos .....	55
7. RESULTADOS .....	56
8. DISCUSSÃO .....	67
8.1 Característica da amostra.....	67
8.2 Método utilizado para avaliar os hormônios .....	67
8.3 Índice de Massa Corporal materno.....	67
8.4 Concentração dos hormônios no Leite Materno.....	69
8.5 Peso dos lactentes .....	71
8.6 Pontos Fortes .....	73
8.7 Limitações .....	73
9. CONCLUSÕES .....	75
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	76
REFERÊNCIAS .....	77
11. ARTIGOS.....	87

11.1 Artigo submetido ao <i>European Journal of Nutrition</i> : .....	87
Title: Influence of intrauterine environment on hormone patterns in breast milk: the IVAPSA cohort study.....	88
11.2 Breast milk Leptin, Adiponectin and Insulin of Diabetics, Hypertensive, Smokers and mothers of SGA child – IVAPSA cohort .....	104
12. APÊNDICES .....	119
12.1 QUESTIONÁRIO PÓS-PARTO (PP).....	119
12.2 QUESTIONÁRIO 1 MÊS (1M).....	128
12.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	137
13. ANEXOS .....	139
13.1 MANUAL KIT ELISA - LEPTINA.....	139
13.2 MANUAL KIT ELISA – ADIPONECTINA.....	146
13.3 MANUAL KIT ELISA - INSULINA .....	153

## 1. INTRODUÇÃO

A presença de doenças como diabetes, hipertensão e, também, o tabagismo estão cada vez mais presentes nas atuais gestações (2009). Além disso, outra situação clínica amplamente estudada é a restrição de crescimento intrauterino. Todas relacionadas a alterações metabólicas nos recém-nascidos, nos lactentes e com consequências ao longo de todo o ciclo vital (BARKER et al., 2002; ONG et al., 2002; PUTZKER et al., 2014; SILVEIRA et al., 2007).

Os benefícios do aleitamento materno são amplamente divulgados e reconhecidos. Para o lactente, é a principal fonte de nutrientes e, além das vantagens imunológicas, exerce modulação metabólica significativa devido à presença de elementos bioativos como a Leptina (LEP), Adiponectina (ADIPO) e Insulina, dentre outros (DUNDAR et al., 2010; F. SAVINO et al., 2013; SAVINO; LIGUORI, 2008; SAVINO; LIGUORI; et al., 2009). Estes compostos atuam na regulação do processo de nutrição e gasto energético do indivíduo, por consequência, determinando a composição corporal (GUPTA et al., 2010; ILCOL; HIZLI; OZKAN, 2006; SAVINO; BENETTI; et al., 2013; SAVINO; FISSORE; et al., 2009; SCHUELER et al., 2013; SCHUSTER et al., 2011).

A LEP e a Insulina são hormônios proporcionalmente influenciados pela quantidade de tecido adiposo presente (BUTTE; HOPKINSON; NICOLSON, 1997; SHEHADEH; SUKHOTNIK; SHAMIR, 2006). Esta estimula a ingestão alimentar e diminui o gasto energético (KLUNDER-KLUNDER et al., 2013).

Estes hormônios presentes no leite materno (LM), também podem sofrer as consequências de adaptações do ambiente intrauterino de acordo com o tipo de fatores em que são expostos, como condições metabólicas adversas (LEY et al., 2012; LEY et al., 2010). Foi demonstrada a relação do IMC materno na concentração dos hormônios no leite

(BUTTE et al., 1997; EILERS et al., 2011; MAPLE-BROWN et al., 2012; MIRALLES et al., 2006).

Além disso, o tabagismo pode interferir na qualidade da amamentação (ZANARDO et al., 2005). Foram descritas as alterações na composição do LM de mães de crianças prematuras (BIELICKI; HUCH; VON MANDACH, 2004; EILERS et al., 2011) e em mães de crianças com restrição de crescimento intrauterino (DUNDAR et al., 2005). No entanto, ao nosso conhecimento, não há estudos observacionais prospectivos avaliando a influência de ambientes intrauterinos diversos na concentração de múltiplos hormônios no LM e a relação com o ganho de peso dos lactentes num período precoce do desenvolvimento somático.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Ambiente Intrauterino**

Estudos que relacionam a influência de situações precoces da saúde dos indivíduos ao longo da vida têm sido amplamente divulgados. Trazem a temática Origens Desenvolvimentistas da saúde e doença – DOHaD - e tentam explicar como a exposição precoce a diferentes fatores no início da vida podem desencadear um perfil de saúde-doença característico no decorrer do ciclo vital (SILVEIRA et al., 2007). Estes podem ser ambientais, sociais, genéticos, étnicos, demográficos, nutricionais ou até mesmo a presença de doença dos progenitores (BARKER et al., 2002; BERGEN, 2006; ERIKSSON et al., 2002; KOLETZKO et al., 2012; MONASTA et al., 2010; VUGUIN et al., 2013).

Dessa forma, ambientes intrauterinos assim como o período pós-natal são importantes momentos para determinação do perfil de saúde tanto da mulher (gestante/puérpera) quanto do recém-nascido. Assim, a presença de doenças crônicas durante a gestação poderá desencadear adaptações estruturais e funcionais no feto que podem alterar a programação metabólica, a qual tende a persistir no período pós-natal (SILVEIRA et al., 2007).

### **2.2 Diabetes Mellitus**

A prevalência de Diabetes cresce significativamente em todo o mundo, constituindo-se em uma epidemia conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS). Possui grande impacto negativo para a sociedade e para a saúde pública, e é, certamente, uma das doenças de maior comprometimento do orçamento na área da saúde. É um dos principais problemas da América Latina e Caribe, estimando-se uma prevalência de 19

milhões de pessoas com esta condição. Há uma projeção de que esse número possa ser aumentado para 40 milhões em 2025, caso não sejam tomadas medidas de prevenção (WHO, 2014).

Os três tipos mais frequentes de diabetes mellitus: tipo 1, tipo 2 e gestacional (DMG) estão relacionados com a saúde fetal. Durante a gestação, a glicose elevada ultrapassa a placenta, porém, o mesmo não acontece com a insulina. A exposição fetal a elevadas concentrações de glicose pode causar alterações no metabolismo neuroendócrino mediado por modificações na expressão de certos genes (DODE; SANTOS; GONZALEZ, 2011).

As gestantes com diabetes podem gerar fetos macrossômicos com organomegalias (MAYER; JOSEPH, 2013) associados com maior frequência de complicações perinatais (BENER; SALEH; AL-HAMAQ, 2011). Somado a isso, há um risco aumentado de natimortos, morte perinatal (EIDEM et al., 2011) e maior prevalência de prematuridade (BENER et al., 2011). A exposição ao Diabetes no período intrauterino também provoca alterações pós-natais permanentes aumentando a suscetibilidade para o desenvolvimento de obesidade (LAMB et al., 2010), excesso de peso na infância (GAILLARD et al., 2013; WROTNIK et al., 2008) e diabetes (DABELEA et al., 2008; PETTITT et al., 2008).

O aleitamento materno tem sido utilizado como estratégia de prevenção de obesidade na mulher no período pós-natal (HATSU; MCDOUGALD; ANDERSON, 2008), além de possíveis consequências benéficas futuras, pois diminui a prevalência de hipertensão, diabetes, dislipidemia e doença cardiovascular em idades posteriores (SCHWARZ et al., 2009). Para os filhos de mães diabéticas, o LM parece não sofrer prejuízos na quantidade de insulina a ser recebida através do leite, mesmo no DM tipo 1. As crianças cujas mães apresentam DM tipo 2 também não recebem quantidades superiores de

insulina, quando comparadas a um grupo controle sem DM ou mães com DM tipo 1 (WHITMORE et al., 2012). Contudo, a ação de outros hormônios presentes no LM precisa ser elucidada, já que, segundo Plagemann e colaboradores, a ingestão de leite por filhos de diabéticas pode aumentar o risco de obesidade com posterior desenvolvimento de intolerância à glicose na infância (PLAGEMANN et al., 2002). Dessa forma, a presença de diabetes durante a gestação se apresenta como um fator que pode interferir na saúde da criança.

### **2.3 Hipertensão Arterial**

A proporção de brasileiros diagnosticados com Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) cresceu de 21,5%, em 2006, para 24,4%, em 2009 segundo levantamento anual do Ministério da Saúde (MS). De acordo com o Vigitel, a proporção de hipertensos é maior entre mulheres (26,3%) do que entre homens (21,5%). Em relação à mortalidade por causas obstétricas, calcula-se que 24,9% ocorra devido a transtornos hipertensivos (Brasil, 2014).

O aumento do risco de desenvolvimento de doenças hipertensivas na gravidez aumenta na presença de obesidade e anemia (BILANO et al., 2014). A HAS define um ambiente específico que pode levar à programação do funcionamento de órgãos e sistemas fetais com impacto sobre a saúde da criança. Os riscos da pressão arterial elevada parecem ser compartilhados entre a mãe e seu filho, aumentando as chances de elevar a pressão arterial na criança (LAWLOR et al., 2012). Desordens hipertensivas estão associadas a altos níveis de morbidades e intervenções como cesariana, apesar da redução de mortalidade perinatal nessas condições (HEARD et al., 2004).

Além disso, pode provocar descolamento de placenta, placenta prévia, prematuridade, maior indicação de parto cesáreo e hemorragia pós-parto (TEDESCO et al.,

2013; YE et al., 2014). Pode provocar um ambiente de restrição de crescimento intrauterino ou o nascimento de crianças pequenas para idade gestacional (ANKUMAH et al., 2014; FERRAZZANI et al., 2011; XAVERIUS, P. K. et al., 2014). Também tem sido associado ao risco de redução das habilidades orais na criança (WHITEHOUSE et al., 2012) e piora nos resultados sobre cognição (GRUSLIN; LEMYRE, 2011).

Em nosso conhecimento não há estudos relacionando a hipertensão durante a gestação e as consequências no aleitamento materno. No entanto, algumas situações presentes em portadoras dessa doença, como é o caso do ganho excessivo de peso na gestação ou até mesmo a obesidade, podem ser tomados como base para estimar algumas alterações. O excesso de peso gestacional predispõe a mulher à retenção de peso e obesidade no pós-parto (MAMUN et al., 2010; NOHR et al., 2008), diabetes (AL MAMUN et al., 2013) e hipertensão (KULIE et al., 2011; LI et al., 2013; NOHR et al., 2008). Somado a isso, vários estudos demonstram a relação entre o IMC materno e as concentrações hormonais séricas da mãe e da criança e no LM (BRONSKY et al., 2006; BUTTE et al., 1997; DONERAY; ORBAK; YILDIZ, 2009; EILERS et al., 2011; FIELDS; DEMERATH, 2012; MAPLE-BROWN et al., 2012; MARTIN et al., 2006; MIRALLES et al., 2006; SCHUELER et al., 2013; UYSAL et al., 2002; WEYERMANN; BRENNER; ROTHENBACHER, 2007). Portanto, se faz necessário determinar a influência dessa doença também na concentração hormonal do LM.

## **2.4 Tabagismo**

Segundo a OMS cerca de cinco milhões de pessoas morrem por ano vítimas do uso do tabaco, e o fumo ainda é, atualmente, uma das principais causas de morte evitável. Estima-se que um terço da população mundial adulta faça uso do tabaco (YACH, 2014).



Nos países em desenvolvimento, os fumantes somam 48% dos homens e 7% das mulheres, enquanto nos desenvolvidos, a participação do sexo feminino mais do que triplica, num total de 42% de homens e 24% de mulheres fumantes. No Brasil, pesquisa realizada recentemente pelo MS, por meio do Instituto Nacional de Câncer (Inca), indica que 18,8% da população brasileira é fumante (22,7% dos homens e 16% das mulheres) (YACH, 2014).

Na gravidez, a nicotina presente no tabaco pode provocar constrição dos vasos uterinos e placentários, e promove taquicardia tanto da mãe quanto do feto (LEOPÉRCIO; GIGLIOTTI, 2004). Além disso, provoca alterações na função imune do feto e na função pulmonar no período neonatal (LIMA et al., 2010). Ainda, o tabagismo durante a gestação pode ocasionar o nascimento de crianças pequenas para idade gestacional (ZAMBONATO et al., 2004), com menor peso ao nascer (BEYERLEIN et al., 2011; MARTINEZ-MESA et al., 2012) em função da diminuição do transporte de oxigênio e da concentração de insulina fetal (INGVARSSON et al., 2007).

Posteriormente, no decorrer da vida destes indivíduos, existem várias outras associações desvantajosas àqueles que foram expostos ao tabagismo. Dentre elas podemos destacar mudanças no crescimento linear (MATIJASEVICH et al., 2011), maior IMC na infância (BEYERLEIN et al., 2011; MARTINEZ-MESA et al., 2012), risco para doenças crônicas futuras em decorrência da maior preferência pelo doce (AYRES et al., 2011), baixa estatura (KOSHY; DELPISHEH; BRABIN, 2011b), obesidade (OKEN; LEVITAN; GILLMAN, 2008; WIDEROE et al., 2003), *catch up* nos primeiros anos de vida (ONG et al., 2002) e síndrome metabólica (INO, 2010). Além disso, está associado à hiperatividade (KOSHY; DELPISHEH; BRABIN, 2011a), menores habilidades funcionais (PAVIC et al., 2012) e cefaleia na infância (FABRI et al., 2011; SILVA et al., 2011).

O fumo parece modificar a qualidade de alguns fatores no LM, que não a Leptina. Há uma variação quanto à concentração desta do colostro para o leite de transição, todavia parece ser semelhante entre fumantes e não fumantes (ZANARDO et al., 2005). Por outro lado, apesar de não alterar os níveis séricos de LEP e do LM das fumantes, parece reduzir a LEP sérica dos seus filhos, independente do peso de nascimento (OZKAN et al., 2005). Logo, o tabagismo durante a gestação é outro evento que pode definir o perfil de saúde da criança.

### **2.5 Pequeno para Idade Gestacional (PIG)**

O conceito de restrição de crescimento intrauterino (RCIU) por vezes confunde-se com o termo pequeno para idade gestacional (PIG) e não há consenso e unanimidade na definição conceitual, apesar de uma busca para tal determinação (MAYER; JOSEPH, 2013; ZHANG et al., 2010). Acredita-se que a RCIU esteja relacionado com uma afecção durante a gestação enquanto o PIG poderia decorrer da constitucionalidade biológica normal do crescimento somático fetal. (IAMS, 2010). Além disso, há variações em características não patológicas maternas que podem influenciar no crescimento fetal (MONGELLI; GARDOSI, 1995). No entanto, as afecções relacionadas com RCIU nem sempre são possíveis de serem detectadas (LOHAUGEN et al., 2013; VERKAUSKIENE et al., 2007).

Para o presente estudo, utilizaremos o termo RCIU idiopática como sinônimo de PIG, ou pelo menos não há a pretensão de discutir ou conceituar esses termos, pois todas as nossas crianças nasceram a termo e sem doença aparente. Portanto, a classificação de RCIU se dará segundo a curva de Alexander (GREG R. ALEXANDER et al., 1996). Ou seja, iremos considerar a Restrição de Crescimento Intrauterina de causa desconhecida pelo peso abaixo do percentil 5 da curva de crescimento acima citada, de acordo com a idade

gestacional, tentando aumentar a sensibilidade da busca dessas crianças consideradas pequenas.

O nascimento de PIGs tem variações de acordo com a região e o seu desenvolvimento socioeconômico (DA SILVA et al., 2010; MORAES et al., 2012). No Brasil, houve aumento nas taxas de baixo peso ao nascer até 2004 e estabilizou-se até 2010 com prevalência próxima de 10% dos nascimentos (MORAES et al., 2011; VELOSO et al., 2013). No Rio Grande do Sul, a taxa de crescimento anual das proporções de baixo peso ao nascer foi de 1,2%, entre 1994 e 2004, sendo que as proporções diferem entre as microrregiões e aumentam com o passar dos anos. Essa elevação da proporção do baixo peso se deu com o aumento do percentual de prematuros, do percentual de cesarianas e da redução do coeficiente de mortalidade infantil (MORAES et al., 2011) e pode acontecer por diversos fatores como questões sociais, culturais, baixo peso e altura materna, dentre outras, ou em função da restrição calórica durante a gestação (HEAMAN et al., 2013; MORAES et al., 2012; VAHDANINIA; TAVAFIAN; MONTAZERI, 2008; XAVERIUS, P. et al., 2014).

O perfil de saúde materno, então, pode gerar um ambiente desfavorável ao crescimento do feto e desencadear adaptações estruturais e funcionais e, possivelmente, prejudicar a programação em órgãos e tecidos fetais e persistir no período pós-natal (SILVEIRA et al., 2007). Barker e colaboradores descreveram a hipótese da programação metabólica de crianças que passaram por desnutrição intrauterina confirmando essa teoria. Eles correlacionaram o baixo peso ao nascer com doenças cardiovasculares na vida adulta (BARKER et al., 2002).

Diversas outras consequências da RCIU já foram descritas na literatura como obesidade (ONG et al., 2002), hipertensão (BARKER et al., 2002), resistência à leptina

(COUPE et al., 2012; JAQUET et al., 1999), dislipidemia, diabetes (VEENING; VAN WEISSENBRUCH; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2002), resistência insulínica (PUTZKER et al., 2014) entre outros desfechos desfavoráveis (KAIJSER et al., 2009; VERKAUSKIENE et al., 2007). Assim, o baixo peso ao nascer pode predizer o risco para desordens metabólicas relacionadas nesses indivíduos (PUTZKER et al., 2014).

O período pós-natal também provoca adaptações nas crianças nascidas com baixo peso. Elas parecem tentar compensar o período de restrição intrauterina e passam a ganhar peso rapidamente (*catch up*) (COUPE et al., 2009). Dessa forma, a alimentação do neonato se torna importante para a constituição desse crescimento. Não só pelas diferenças nas taxas de crescimento entre lactentes amamentados ao seio ou por fórmula infantil (IKEDA et al., 2014; KARATAS et al., 2011; KON et al., 2014; KRAMER et al., 2004; LONNERDAL, 2014), mas também pelo contraste que pode haver na composição interindividual no próprio leite materno a ser recebido por essas crianças de forma a programar, inclusive o apetite (GRUNEWALD et al., 2014; KARATAS et al., 2011; KON et al., 2014; SAVINO; FISSORE; et al., 2009; SCHUELER et al., 2013).

Quando comparado o LM de mães de PIG com crianças nascidas adequadas e grandes para idade gestacional pode se observar que os níveis de Leptina (LEP) foram inferiores e, especialmente no 1º mês, diferentes entre os três grupos. Contudo não há diferença no 2º e 3º mês. Os PIGs apresentaram crescimento mais rápido nos 15 dias e tiveram menor LEP no LM. Infere-se, então, que o LM parece ter uma regulação fisiológica de acordo com as necessidades da criança (DUNDAR et al., 2005).

## **2.6 Leite Materno e hormônios**

A nutrição e o crescimento infantil têm sido muito estudados em função da possível ligação com distúrbios metabólicos ao longo da vida. O LM é um dos fatores que potencialmente exerce efeito sobre esse desenvolvimento, especialmente, em função da sua composição e da presença de elementos bioativos, como hormônios. Estes, com importante papel na regulação do balanço energético controlando a ingestão alimentar e, por consequência, determinando a composição corporal dos indivíduos (GUPTA et al., 2010; SAVINO; BENETTI; et al., 2013; SAVINO; FISSORE; et al., 2009; SCHUELER et al., 2013; SCHUSTER et al., 2011).

No entanto, a concentração desses compostos no LM varia amplamente de mulher para mulher, independente de uma condição patológica associada e há uma correlação direta na presença nos diferentes órgãos e tecidos como sangue, cordão umbilical e leite (WEYERMANN et al., 2006). A ação destes hormônios tem sido muito estudada pelo papel na regulação da homeostase energética (SAVINO et al., 2011). Pois, provocam reflexos na saúde da criança, não apenas precocemente, mas também a longo prazo (BRUNNER et al., 2014).

Assim como o crescimento intraútero provoca alterações pós-natais na criança, os hormônios no LM também podem sofrer mudanças em consequências de adaptações no ambiente intrauterino de acordo com tipo de fatores a que são expostos. Já foram descritas as consequências na composição do LM de mães de crianças nascidas pré-termo (BIELICKI et al., 2004; EILERS et al., 2011), no tabagismo materno (ZANARDO et al., 2005), em mães de crianças com restrição de crescimento intrauterino (DUNDAR et al., 2005), diabetes de ambos os tipos (LEY et al., 2010; PLAGEMANN et al., 2002). No entanto, ainda não se tem trabalhos, ao que se sabe, na concentração de hormônios no LM

acompanhando as influências no desenvolvimento da criança num período tão precoce, a partir de diferentes ambientes intrauterinos.

## **2.7 Leptina**

A leptina (LEP) é um dos hormônios mais estudados quanto à presença no LM. É um hormônio derivado do gene *ob*, descoberto em 1994 e posteriormente avaliado no leite materno a partir de 1997. É um hormônio anorexígeno que atua em células neuronais do hipotálamo no sistema nervoso central sendo produzido nos adipócitos e, portanto, proporcionalmente influenciado pela quantidade de tecido adiposo presente (SAVINO; BENETTI; et al., 2013).

Pode ser encontrado na placenta humana, cordão umbilical e nas células mamárias (DUNDAR et al., 2010; JAQUET et al., 1998; WEYERMANN et al., 2006). A LEP sérica da mulher é transmitida do sangue para o LM além da produção da própria mama. Então, essas duas frações, do sangue e do LM, exercem um importante papel biológico sobre o neonato (CASABIELL et al., 1997), já que a LEP fornecida pela mãe parece ser absorvida pelas células intestinais e estomacais (PICO; SANCHEZ; et al., 2007; SANCHEZ et al., 2005).

Quantidades insuficientes de LEP durante o período da lactação parecem gerar menor proteção contra a obesidade e processos metabólicos (D'SOUZA A et al., 2014; DONERAY et al., 2009; MIRALLES et al., 2006; PICO; OLIVER; et al., 2007; PICO; SANCHEZ; et al., 2007). Estudos têm comprovado a relação da LEP no peso das crianças avaliadas (SAVINO; LIGUORI; et al., 2013; SAVINO et al., 2008): a menor exposição à LEP durante o período de aleitamento parece estar associada ao peso da criança, inclusive com maior massa gorda (DONERAY et al., 2009; FIELDS; DEMERATH, 2012;

MIRALLES et al., 2006; PICO; OLIVER; et al., 2007). Além do mais, a RCIU parece aumentar os níveis séricos de LEP (JAQUET et al., 1999) o que pode provocar uma resistência na vida pós-natal (COUPE et al., 2009; COUPE et al., 2012).

## **2.8 Adiponectina**

A ADIPO, também é uma adipocina e foi descoberta em 1995, mas só observada no LM em 2006. Atua no metabolismo da glicose e dos lipídeos, ao melhorar a sensibilização da insulina e a oxidação dos ácidos graxos e ao inibir a produção de glicose hepática (BRONSKY et al., 2006; NEWBURG; WOO; MORROW, 2010). Ao contrário da leptina, ela estimula a ingestão alimentar e diminui o gasto energético. Na presença de obesidade há menor quantidade circulante (KLUNDER-KLUNDER et al., 2013).

## **2.9 Insulina**

A insulina é um dos hormônios mais estudados em função da sua relação com o Diabetes, porém com poucas avaliações a partir do LM. É ativado após a ingestão alimentar fazendo a captação de glicose para diversos tecidos (DE GRAAF et al., 2004). Além disso, parece interferir na ação de hormônios enterais ao reduzir o esvaziamento gástrico e promover sensação de saciedade (SHEHADEH et al., 2006).

A concentração sérica da insulina é proporcional à quantidade de tecido adiposo, assim como a leptina. Ambos hormônios parecem ter efeitos centrais semelhantes e suscitam que haja modulação entre eles (BUTTE et al., 1997). Dessa forma, o desenvolvimento infantil pode ser influenciado por fatores ambientais, pela genética dos indivíduos e pela nutrição. Estes, além de gerarem uma programação metabólica que pode ser estabelecida já intraútero, exigem a necessidade de esclarecer os elementos para sua

constituição no período pós-natal. Estudos de coorte, portanto, são substanciais para determinar a causalidade das doenças também nessas situações. Na Tabela 1 estão descritos, resumidamente, estudos que avaliaram os mesmos hormônios no LM que investigamos.



**Tabela 1.** Síntese das publicações referentes aos hormônios Leptina, Adiponectina e Insulina no Leite Materno.

<b>Autor/ Ano</b>	<b>Hormônio avaliado no LM</b>	<b>Objetivo do estudo</b>	<b>Número Amostral (n)</b>	<b>Resumo dos achados</b>
<b>Casabiell et al., 1997</b>	Leptina	Avaliar a presença de LEP no colostro ou leite maduro.	n = 34	LEP está presente no LM da mesma forma que no sangue, porém em quantidades inferiores. Ela pode ser absorvida intacta pelas células intestinais e estomacais de ratos, possivelmente como deve acontecer nos humanos, já que há aumento nos níveis séricos da criança após a amamentação.
<b>Uçar et al., 2000</b>	Leptina	Estudar as concentrações de leptina no leite humano e suas relações com a leptina sérica da mãe e da criança, além da adiposidade, glicose, insulina, lipídios e níveis de lipoproteínas. Também comparar as concentrações de leptina leite inicial e final para investigar se a leptina atua na saciedade.	Amostras: Transversal – crianças entre 3 e 120 dias de vida.  n=18	Não houve diferença na concentração de LEP no leite inicial ou final. LEP do LM foi significativamente menor do que a sérica. Log da LEP do LM se correlacionou positivamente com a LEP sérica da mãe e da criança e negativa com o perfil lipídico. Não houve correlação entre Log LEP do LM e adiposidade materna e da criança, concentrações de lipídeos e lipoproteínas da criança.
<b>Uysal et al., 2002</b>	Leptina	Determinar se há relação entre as concentrações de leptina no LM e adiposidade em crianças amamentadas exclusivamente.	Amostras: não diz quando foram coletadas  n=50	Não houve diferença na concentração de LEP no LM de mães de crianças obesas ou não obesas. LEP do LM se correlaciona com o IMC materno e não se correlaciona com o IMC da criança.

<b>Bielicki et al., 2004</b>	Leptina	Comparar os níveis de leptina do leite materno entre gestações a termo e pré-termo.	Amostras: 2 - 3 dias (A), 4 – 5 dias (B) e 6 semanas (C) após o nascimento  A termo: n=24 Pré-termo: n=9	Concentração maior no LM pré-termo nos dois primeiros momentos A ( $p < 0,01$ ) e B ( $p < 0,05$ ). No LM a termo houve declínio significativo nos níveis de A para B, enquanto que no LM pré-termo não variou. Correlação moderada do LM (A) com o peso ao nascer da criança $r^2 = 0.16$ ; $p < 0.05$ ).
<b>Dündar et al., 2005</b>	Leptina	Investigar se há uma relação entre os níveis de LEP no LM e o ganho de peso pós-natal e comparar as variações nas concentrações de LEP em Pequenos (PIG), Adequados (AGA) e Grandes para Idade Gestacional (GIG).	Amostras: 15D e 1M, 2M e 3M  PIG n=11 AGA n=22 GIG n=14	LEP no LM foi inferior nos PIGs e superior nos GIG comparado com AGA. Os níveis de LEP no LM são diferentes entre PIG, AGA e GIG, especialmente no 1º mês. Não há diferença no 2º e 3º mês. Os PIGs apresentaram crescimento mais rápido nos 15D e tiveram menor LEP no LM. O LM parece ter uma regulação fisiológica de acordo com as necessidades da criança.
<b>Ozkan et al., 2005</b>	Leptina	Avaliar o efeito do tabagismo durante a gravidez sobre as concentrações de leptina materna e neonatal, e também sobre os níveis de leptina do leite materno.	Amostra: 7 dias pós-parto	Não houve diferença significativa entre os grupos nos níveis maternos de leptina e no LM ( $p = 0,14$ e $p = 0,96$ , respectivamente). No entanto, os níveis de leptina foram significativamente menor em recém-nascidos de mães fumantes em comparação com crianças nascidas de mães não tabagistas ( $p = 0,02$ ). Nossos resultados sugerem que o tabagismo

				materno não tem um efeito sobre os níveis de LEP sérica e do LM, mas diminui a concentração sérica neonatal independente do peso de nascimento.
<b>Zanardo et al., 2005</b>	Leptina	Testar, em mães fumantes, concentrações de interleucina (IL) 1 $\alpha$ , $\beta$ -endorfina e Leptina no colostro e leite de transição.	Amostras: 3 e 10 dias pós-parto Fumantes: n = 42 Não fumantes: n = 40	LEP no LM de transição foi significativamente menor do que no colostro tanto das fumantes como não fumantes. Não houve diferença na LEP do LM de transição entre fumantes e não fumantes.
<b>Bronsky et al., 2006</b>	Leptina Adiponectina	Investigar proteínas presente no leite materno, que são produzidas pelo tecido adiposo e estão relacionados com o metabolismo dos lipídeos.	Amostras: 48h após o início da lactação  n = 59	A LEP foi significativamente menor no LM pré-termo vs a termo (0,30 $\pm$ 0,09 vs 0,60 $\pm$ 0,05 $\mu$ g/L; P< 0,026). LEP se correlacionou com Peso pré-gestacional e do parto, IMC pré-gestacional, ganho de peso gestacional e idade gestacional. ADIPO se correlacionou com o peso pré-gestacional (r=0.288; p<0.027). Não houve correlação com o peso ao nascer (r=0.119; p<0.371).
<b>Iicol et al., 2006</b>	Leptina	Avaliar as concentrações de leptina no leite materno durante os primeiros 180 dias pós-parto, e determinar a relação entre as concentrações de leptina no leite	Amostras: Colostro (até 3 dias), Transição (4 a 14), Maduro precoce (15 a 30), Maduro (31 a 90) e Maduro	LEP no colostro foi mais elevada e diminuiu durante os primeiros 180 dias de lactação, mostrando uma relação inversa e significativa (r =-0,694, p<0,001) com os dias de lactação e se

		e os níveis circulantes de hormônios em mulheres que amamentam.	posterior (91 a 180) Colostro: n= 37 Transição: n= 27 Maduro: n= 37	relaciona significativamente com outros hormônios séricos maternos (leptina, cortisol, insulina e tiroxina).
<b>Martin et al., 2006</b>	Leptina Adiponectina	Determinar a presença de adiponectina no leite humano e caracterizar fatores maternos associados com potenciais variações em concentrações de adiponectina.	Amostras: 1 mês.  LEP Mexicanas: n=37 Brancas: n=30  ADIPO Mexicanas: n=37 Brancas: n=19	As concentrações medianas de ADIPO foram >40 vezes superiores as concentrações de LEP (16,6 vs 0,4ng/ml; p<0,0001). IMC materno pós-gestacional foi positivamente associado com as concentrações de ADIPO no leite. Mexicanas tiveram menores medianas de concentração de ADIPO no 1M do que as brancas não hispânicas (11,5 vs 19,8ng/ml; P=0,003). ADIPO está presente no leite humano e sua concentração está associada à duração do aleitamento materno, adiposidade e etnia.
<b>Miralles et al., 2006</b>	Leptina	Determinar se a concentração de leptina do leite se correlaciona com a leptina circulante e o IMC materno e com o ganho de peso dos bebês.	Amostras: 1, 3, 6, e 9 meses de lactação.  n=28	LEP do LM foi positivamente correlacionada com a concentração no plasma e com IMC materno. LEP 1M foi negativamente correlacionada com o IMC da criança aos 18 e 24 meses de idade.

<b>Weyermann et al., 2006</b>	Leptina Adiponectina	Medir as concentrações de adiponectina e leptina e relacionar com a presença destas no sangue, cordão umbilical e no leite materno.	Amostras: 6 semanas pós-parto  n=766	ADIPO do cordão umbilical é superior a sérica e do LM. ADIPO do LM é superior em mães de crianças que nasceram grandes para idade gestacional. LEP do cordão é significativamente menor do que a sérica e do LM. LEP do LM de mães de meninas é superior ao de meninos, mas não se correlaciona com a antropometria do nascimento.
<b>Weyermann et al., 2007</b>	Leptina Adiponectina	Avaliar o papel da adiponectina e leptina no leite humano em crianças obesas até 2 anos.	Amostras: 6 semanas pós-parto  n=674	Odds ratio ajustado para sobrepeso na idade de 2 anos foi 1,6 (IC 95% 1.0 -2.6) por unidade de aumento do log ADIPO e 1,1 (0,8 -1,5) por aumento unitário de log LEP. Entre as crianças que eram amamentadas por pelo menos seis meses, OR ajustada foi de 2,1 (1.1-4.2) por unidade aumento do log ADIPO, e 1,1 (0,7-1,6) por aumento unitário de log LEP.  LEP e ADIPO do LM se correlacionam positivamente entre si. LEP do LM de mães de meninas é superior ao de meninos. LEP aumenta com o aumento do IMC materno. ADIPO no LM é superior em não fumantes e diminui conforme o número de cigarros naquelas que fumam.

<b>Doneray et al., 2009</b>	Leptina	Investigar se a mudança no conteúdo de leptina no leite materno atua sobre ganho de peso corporal neonatal.	Amostras: 1º dia (1D) e entre 21º e 30º (30D) dia pós-parto.  (n=15)	Os níveis de LEP do leite maduro foram significativamente maiores do que no colostro. A LEP no leite maduro foi negativamente correlacionada com o delta IMC ( $r = -0,53$ ; $p < 0,05$ ), assim como o delta da concentração foi inversamente correlacionada com o delta IMC ( $r = -0,529$ ; $p < 0,05$ ).
<b>Woo et al., 2009</b>	Adiponectina	Determinar a associação entre adiponectina no leite materno e o peso da criança nos primeiros 6 meses de vida.	Amostras: Ohio: mensal até 6 meses México: 1 semana e 1, 3, 5 e 6 meses pós-parto. (Ohio: $n = 45$ e LM = 305; México: $n = 277$ e LM = 1074)	Não houve diferença estatística entre as duas coortes quanto a concentração de ADIPO no LM. Nos primeiros 6 meses, mais ADIPO no LM foi associado com menor Z-score de peso-para-idade ( $-0,20 \pm 0,04$ , $p < 0,0001$ ) e Z-score peso-para-comprimento ( $-0,29 \pm 0,08$ , $p = 0,0002$ ), mas não Z-score de comprimento para idade.
<b>Bronsky et al., 2011</b>	Leptina Adiponectina	Determinar mudanças intraindividuais nos níveis de proteínas no LM durante 12 meses de lactação.	Amostras: pós-parto (D0) e 1, 3, 6, 12 meses.  $n = 72$	LEP e ADIPO foram detectáveis no LM até 12M de lactação, com tendência decrescente até 3M e subsequente aumento até 12M. LEP no PP maior do que nas outras avaliações ( $p < 0,0001$ ). ADIPO foi maior aos 12M do que nos 3M e 6M ( $p = 0,0026$ ). Não houve correlação com o peso das crianças ao longo dos 12 meses de lactação.

<b>Eilers et al., 2011</b>	Leptina	Comparar diferentes métodos de preparação para a análise da leptina no leite humano e investigar os níveis de leptina no colostro e leite maduro de mães de prematuros ou bebês a termo.	Amostras: 3 dias (3D) e 28 dias (28D)  A termo: n=40  Pré-termo: n=37	O leite sem gordura foi a preparação mais estável para a análise de LEP. O LM pré-termo e a termo contém LEP em concentrações iguais. LEP do LM depende de índice de massa corporal das mães. Durante o primeiro mês os níveis de leptina diminuiram significativamente no leite a termo, mas não no prematuro.
<b>Karatas et al., 2011</b>	Leptina	Avaliar as alterações nos níveis de grelina, leptina e de gordura no LM anterior e posterior e a possível relação entre estes níveis com a idade e crescimento de recém-nascidos a termo saudáveis.	Amostras: 30 a 90 dias (1 a 3M) e 127 e 171 dias (4 a 6M) em crianças amamentadas ao seio (LM) e amamentadas ao seio e com fórmula infantil (LM+FI)  n = 62	Não houve diferença nas concentrações de LEP no LM anterior do posterior, apesar de a concentração ser maior no leite posterior. Os níveis de LEP nas crianças amamentadas ao seio diminuiram da primeira para a segunda entrevista. A LEP do leite posterior no LM+FI foi inferior em ambas as entrevistas quando comparada ao leite posterior LM. As crianças que consumiam fórmula infantil tiveram ganho de peso superior àquelas que recebiam LM+FI e, que, por conseguinte, ganharam mais peso do que aquelas amamentadas apenas ao seio.

<b>Cesur et al., 2012</b>	Adiponectina	Determinar os níveis de ADIPO e grelina no LM e soro das mães e seus bebês no 1M e 4M pós-parto, e investigar a relação entre os seus níveis e antropometria dos recém-nascidos durante a vida pós-natal precoce.	Amostras: 1 mês (1M) e 4 meses (4M)  n=25	As fontes de ADIPO para a criança provavelmente sejam tanto do LM quanto sérico. ADIPO do LM não se correlacionou com as medidas antropométricas da criança.
<b>Fields e Demerath, 2012</b>	Leptina Insulina	Avaliar a associação entre hormônios que regulam o apetite e fatores de crescimento (LEP, insulina, glicose) e fatores inflamatórios (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) no LM com a composição corporal de crianças no 1º mês de vida de recém-nascidos a termo saudáveis.	Amostras: 1 mês pós-parto  n=19	IMC pré-gestacional foi associado positivamente com a concentração de LEP LM (p=0,0027). Maior concentração de LEP foi associada ao menor escore-Z de IMC (r=-0,54; p=0,03). Concentrações maiores de insulina foram associadas com menor peso da criança, peso relativo e massa magra (r=-0,49 - 0,58; p<0,06). IMC materno se correlaciona com a LEP no LM.
<b>Ley et al., 2012</b>	Adiponectina Insulina	Investigar as associações de anormalidades metabólicas no pré-natal com insulina e ADIPO no leite humano e comparar as concentrações desses hormônios no colostro e leite maduro.	Amostras: Colostro (1ª semana) e leite maduro (3 meses)  n = 170	ADIPO e Insulina do colostro foram significativamente maiores do que no leite maduro. Anormalidades metabólicas maternas no pré-natal estão associadas com altas concentrações de insulina no leite maduro, enquanto que apenas variáveis obstétricas são associadas com as concentrações de ADIPO no colostro.



<b>Savino et al., 2012</b>	Adiponectina	Determinar a concentração de adiponectina no leite materno e investigar sua relação com a concentração sérica de adiponectina das mães e seus bebês e, também, avaliar a relação entre os níveis séricos de adiponectina e parâmetros antropométricos na criança.	Amostras: até 6 meses (n=60, mas 46 aceitaram coletar LM)	Foi encontrada uma correlação negativa entre ADIPO do LM e idade da criança ( $r = -0.30$ ; $p = 0.043$ ).
<b>Schuster et al., 2012</b>	Leptina	Avaliar os níveis de leptina no soro e no leite materno de 23 mães saudáveis e seus recém-nascidos em um estudo prospectivo, longitudinal.	Amostras: 1, 2, e 3 semanas (S) e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 meses (M) pós-parto.  (n=23, mas 15 tiveram todas as medidas obtidas)	Os níveis de LEP se mantiveram constantes da 1ª semana até o 1º mês. No 2º mês os níveis de LEP foram significativamente menores do que 1º e 3º mês. A partir do 4º mês os níveis aumentaram e mantiveram-se semelhantes até o 6º mês. LEP sérica é 22 vezes superior ao do LM e se correlacionam entre si e com o IMC materno. Foi encontrada associação negativa entre os níveis de LEP do LM da primeira semana e o ganho de peso ao final de 6 meses de lactação ( $r=-0.681$ , $p=0.007$ ).

<b>Whitmore et al., 2012</b>	Insulina	Identificar a origem da insulina presente no leite das mães com Diabetes Mellitus (DM) tipo 1, se endógeno ou exógeno por determinação dos níveis de insulina total, insulina endógena e peptídeo-C em comparação com o leite de mães sem DM. Este estudo também teve como objetivo comparar os níveis de insulina no leite materno de mães com DM tipo 2 e, em seguida, investigar qualquer relação entre glicose no sangue, insulina no leite, glicose, peptídeo-C, e o conteúdo de sódio no leite materno em cada um dos grupos.	Amostras: ao longo de 24h de 5 mães sem diabetes, 4 mães com diabetes tipo 1 e 5 mães com diabetes tipo 2.  n=199	Não houve diferença significativa na concentração de insulina do leite anterior e posterior e nem ao longo das 24h.  Não houve diferença significativa na média de insulina entre mães controle e mães com diabetes tipo 1 (P = 0,74), mães controle e mães com diabetes tipo 2 (P = 0,93), e entre as mães com diabetes tipo 1 e tipo 2 (P = 0,62).
<b>Woo et al., 2012</b>	Adiponectina	Examinar o ganho de peso infantil no segundo ano de vida de acordo com o nível de exposição de ADIPO no leite materno.	Amostras: 1 semana, 3, 6 e 12 meses.  n=192	Crianças expostas a elevados níveis de ADIPO no LM tem trajetória de crescimento acelerado no segundo ano de vida para escore-Z de Peso para idade e Peso para estatura, mesmo com baixo ganho de peso no primeiro ano de vida.  ADIPO sérica se correlaciona com a ADIPO do LM e a ADIPO sérica da criança.

<b>Schueler et al., 2013</b>	Leptina	Avaliar se as concentrações de GLP-1, PYY e LEP se alteram durante a amamentação (leite anterior e posterior), e estão associados com medidas antropométricas materna e infantil.	Amostras: 5 a 6 semanas pós-parto.  n=13	As concentrações de LEP não diferiram no leite anterior do posterior.  LEP no LM se correlacionou com o IMC materno e massa gorda.
<b>Brunner et al., 2014</b>	Leptina Adiponectina	Relacionar os níveis de leptina e adiponectina no LM com o ganho de peso e composição corporal até a 2 anos de idade.	Amostras: 6 semanas (6S) e 4 meses (4M) pós-parto.  6S: n = 152  4M: n = 120	LEP foi inversamente associada com o peso e massa magra da criança até 4M e diretamente associada com as medidas antropométricas maternas. ADIPO diminuiu significativamente aos 4M (p=0,03). ADIPO tende a ser inversamente proporcional a antropometria até 4M e positivamente associada com o ganho de peso e a soma de dobras aos 2 anos. Elevados níveis de ADIPO no LM pode estar associado ao maior ganho de peso e massa gorda até 2 anos.
<b>Kon et al., 2014</b>	Leptina Adiponectina	Estudar as possíveis relações entre a velocidade de crescimento em crianças amamentadas e os níveis de proteína, IGF-1 dentre outros, que regulam homeostase energética, no LM.	Amostras: 1, 2 e 3 meses de acordo com o ganho de peso (GP) da criança.  n = 103	Há uma tendência de que as crianças com elevado ganho de peso recebam maiores concentrações de LEP do leite aos 2M e 3M. Não houve diferença entre os grupos na concentração de ADIPO.

### **3. JUSTIFICATIVA**

O ambiente intrauterino traz consequências tanto para a saúde fetal quanto para a própria gestante. O leite materno pode influenciar a capacidade adaptativa do recém-nascido após a ação de um ambiente intrauterino adverso. Poucos estudos investigaram a relação entre o ambiente intrauterino e a influência na composição hormonal do LM, bem como sua ação sobre o crescimento pós-natal. Este estudo explora esta relação por meio de abordagem inédita, a qual permite a comparação de desfechos com diferentes determinantes de maneira concomitante, possibilitando novos achados e esclarecimentos na área do crescimento e desenvolvimento infantil.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência de diferentes ambientes intrauterinos na concentração de hormônios no leite materno e a relação com o peso da criança nos primeiros seis meses de vida.

### **4.2 Objetivo específico**

- Avaliar a concentração de Leptina, Adiponectina e Insulina no colostro e leite maduro nos diferentes ambientes intrauterinos.

### **4.3 Objetivos secundários**

- Analisar o Índice de Massa Corporal das mães antes da gestação e nos seis meses pós-parto.

- Descrever a relação entre Índice de Massa Corporal materno e a concentração dos hormônios no colostro e leite maduro.

## **5. HIPÓTESE DE TRABALHO**

O ambiente intrauterino pode modificar a composição do LM e trazer consequências à saúde da criança e refletir nas suas condições no decorrer da vida.

## **6. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1 Local de Estudo e Delineamento**

O estudo foi realizado na cidade de Porto Alegre, capital do estado do Rio Grande do Sul, localizada ao sul do Brasil. Atualmente, tem população estimada em aproximadamente 1,5 milhões de habitantes e Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 0,805.

Trata-se de uma Coorte prospectiva composta por uma amostra de mães e recém-nascidos a termo. O recrutamento ocorre 24 às 48h após o parto nos maiores hospitais de atendimento pelo Sistema Único de Saúde (SUS) da cidade – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Grupo Hospitalar Conceição (GHC). Os pares mães-lactentes são acompanhados até o 6º mês de vida das crianças e a fase de recrutamento ainda não foi finalizada, pois o número amostral de 520 pares ainda não foi alcançado. A coorte IVAPSA – Impacto das Variações do Ambiente Intrauterino sobre a Saúde do Adulto – tem como objetivo compreender efeitos de variações ambientais perinatais sobre o crescimento, o comportamento, o metabolismo e o neurodesenvolvimento, assim como a identificação precoce de vulnerabilidade para efeitos deletérios destas variações.

### **6.2 Critérios de Inclusão e Exclusão**

Foram incluídos na pesquisa todos os indivíduos que consentiram participar e que se encaixaram em um dos cinco grupos temáticos:

- Diabetes (DM) – tipo 1, 2 ou gestacional diagnosticado pelo médico do pré-natal;
- Hipertensão (HAS) – crônica, pré-eclâmpsia, eclâmpsia ou gestacional diagnosticado pelo médico do pré-natal;
- Tabagismo (TBCO) – mulheres que responderam afirmativamente sobre o uso de tabaco em qualquer fase da gestação, independente do número de cigarros fumados;

- Pequeno para Idade Gestacional (PIG) – crianças nascidas abaixo do percentil 5 da curva de peso para idade gestacional (GREG R. ALEXANDER et al., 1996) sem doença aparente que tenha causado a restrição de crescimento - idiopática;

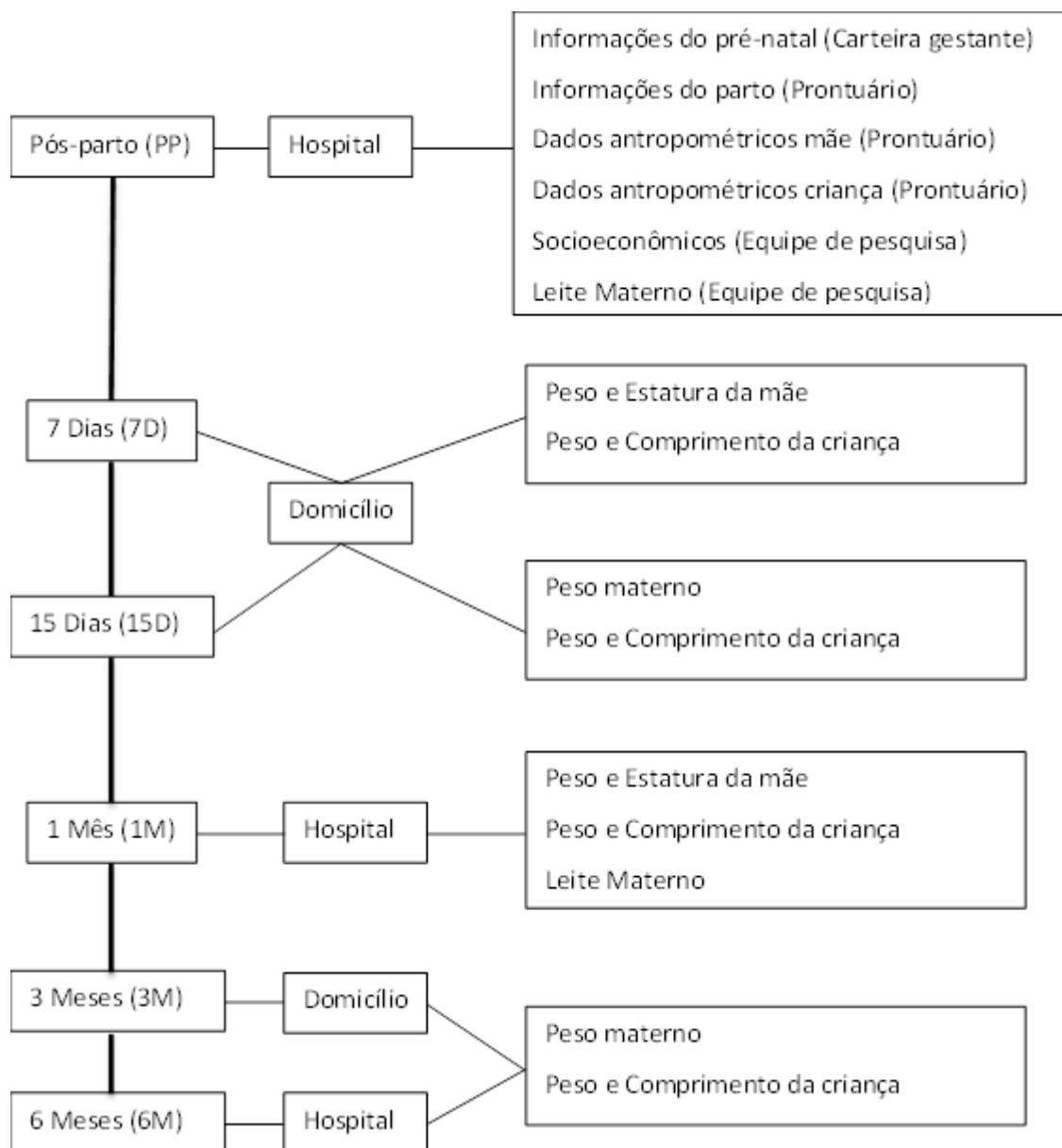
- Controles (CONT) – que não possuem nenhuma das características acima ou outra doença presente.

Os sujeitos recrutados apresentavam apenas características de um único grupo. Devido a dificuldade de obter indivíduos para atingir grupos puros não houve distinção entre o tipos da doença, como nos grupos DM e HAS. Foram considerados critérios de exclusão: prematuridade (<37 semanas), gestação gemelar, anomalias congênitas ou más-formações, mães HIV+ e recém-nascidos que necessitem de internação hospitalar.

### **6.3 Logística**

O estudo foi dividido em 6 entrevistas, sendo a primeira no pós-parto (PP) e, posteriormente, aos 7 (7D) e aos 15 (15D) dias e 1 (1M), 3 (3M) e 6 (6M) meses de vida da criança. As entrevistas de 1M e 6M são realizadas no HCPA enquanto as restantes ocorrem no domicílio das mães. Nelas, foram coletados dados sobre o nascimento, do pré-natal, maternos, sociais, econômicos, familiares, de saúde, além da antropometria e material biológico. As informações foram colhidas a partir de questionários semiestruturados, elaborados pela própria equipe de pesquisa. Dentre os materiais biológicos coletados está o leite materno (no PP e 1M). Maiores informações sobre o protocolo desta pesquisa já foram anteriormente publicadas (BERNARDI et al., 2012). Abaixo, na Figura 1, está descrito o número de entrevistas, o local de realização destas e quais as informações coletadas para a realização deste trabalho.





**Figura 1.** Organograma logístico das entrevistas realizadas e as informações coletadas. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.

#### 6.4 Variáveis Coletadas

Cor: questionado sobre a percepção da mãe quanto a sua cor, ou seja, dado relatado e posteriormente codificado como branco/ não branco.

Situação Conjugal: obtida a partir da declaração da mãe quanto a sua situação e codificada como com companheiro/ sem companheiro.

Escolaridade: dado coletado em anos completos de estudo, sem contar a repetência escolar, caso ocorresse. Posteriormente, essa variável foi codificada em duas categorias ( $\leq 8$  anos;  $> 8$  anos).

Classe Social: avaliada através de um questionário pré-codificado, segundo Critério de Classificação Econômica Brasil (ABIPEME, 2010), o qual identifica a classe socioeconômica da família a partir da existência de determinados itens na residência, como eletrodomésticos, por exemplo, além do grau de instrução do chefe da família. Com base na soma da pontuação dos itens presentes, que pode variar de 0 a 46 pontos, determina-se um escore que define em qual classe social a família pertence. As classes sociais possíveis são: Classe A1: 42 a 46 pontos, Classe A2: 35 a 41 pontos, Classe B1: 29 a 34 pontos, Classe B2: 23 a 28 pontos, Classe C1: 18 a 22 pontos, Classe C2: 14 a 17 pontos, Classe D: 8 a 13 pontos e Classe E: 0 a 7 pontos. Para o presente estudo não subdividimos as classes A, B e C.

Idade: foi calculada considerando-se a data do recrutamento (PP) em relação a data de nascimento da mãe.

Peso pré-gestacional: foi retirado da carteira da gestante, em quilogramas (Kg), e, quando ausente, relatado pela mãe.

Ganho de peso gestacional: calculado pela subtração do peso antes do parto pelo peso pré-gestacional (Kg). O peso antes do parto foi retirado do prontuário médico.

Peso materno atual: aferido pelos pesquisadores nas entrevistas posteriores ao pós-parto, em quilogramas (Kg).

Altura materna: aferido pelos pesquisadores, em metros.

IMC pré-gestacional: obtido pela divisão do peso em Kg pela altura ao quadrado em metros ( $\text{Kg/m}^2$ ) e posteriormente classificado de acordo com as categorias

da OMS (Magreza:  $<18,5 \text{ Kg/m}^2$ ; Adequado:  $>18,5 <24,9 \text{ Kg/m}^2$ ; Sobrepeso:  $>24,9 <29,9 \text{ Kg/m}^2$  e Obesidade:  $>29,9 \text{ Kg/m}^2$ ).

Tipo de parto: obtido do prontuário médico e codificado em vaginal/ cesárea.

Sexo da criança: retirado do prontuário médico e codificado em feminino/ masculino.

Apgar: extraído do prontuário médico de uma pontuação que varia de zero a dez.

Peso ao Nascer: colhido do prontuário médico, em gramas (g).

Peso e estatura da criança: medidos pelos pesquisadores em todas as entrevistas, em centímetros (cm) e em quilogramas (Kg), respectivamente.

## **6.5 Procedimentos**

### **6.5.1 Antropometria**

Em todas as entrevistas foi realizada a antropometria, na qual foram aferidos o peso e estatura, exceto na entrevista do PP em que as medidas foram obtidas do prontuário médico. A altura da mãe foi medida pelos pesquisadores. As medidas antropométricas do nascimento, como, peso, comprimento e perímetro cefálico foram retiradas do prontuário médico.

As crianças eram pesadas, duas vezes, sem roupas e no colo da mãe que, também, usava o mínimo possível de vestimentas, em balança portátil (Marte®). Depois a mãe subia individualmente na balança e o peso da criança obtido a partir da subtração do peso mãe + criança do peso da mãe. Ainda sem roupas as crianças tinham seu comprimento medido em superfície lisa e dura com antropômetro infantil (AlturaExata®), sem adereços na cabeça. A estatura das mães foi medida em estadiômetro portátil (AlturaExata®) em pé, sem adereços

na cabeça e com os cabelos soltos. Os mesmos instrumentos foram utilizados tanto nos domicílios quanto no HCPA.

### **6.5.2 Leite Materno**

A coleta do LM foi realizada pela mãe a partir da ordenha manual e, quando necessário, auxiliada pelo entrevistador. Foi previsto um volume inicial de LM de 5mL, no entanto, se apenas uma quantidade inferior fosse obtida, não era descartada. As amostras do colostro eram colhidas logo após o término dos questionamentos do recrutamento, mantidas em isopor térmico preenchido com gelo até a chegada ao Laboratório de Pediatria Translacional (LPT) localizado no HCPA. As amostras de leite maduro foram colhidas na entrevista de 1M, que acontecia no HCPA, e mantidas da mesma forma até a armazenagem no LPT.

O colostro (PP) e o leite maduro (1M) eram, então, depositados em um recipiente estéril, posteriormente dividido em alíquotas identificadas em eppendorfes de 1,5ml e armazenado em freezer -80°C até sua análise. Para a quantificação dos hormônios, LEP, ADIPO e Insulina, foram utilizados kits comerciais de ELISA (Millipore®), conforme indicação do fabricante. Para tal, selecionou-se o máximo possível de amostras que tivessem sido coletadas tanto no recrutamento quanto na entrevista de 1M, já que nem todas as mães puderam ter seu LM coletado devido à perda de uma entrevista ou em função de o leite não estar disponível ainda.

Antes da análise laboratorial, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 15.000rpm a 4°C para isolar a gordura. Então, foram separadas três subamostras, uma para cada hormônio. Neste momento, foram armazenadas em freezer -20°C até quantificação em duplicata de um hormônio por dia (KARATAS *et al*, 2011; EILERS *et al*, 2011).

## 6.6 Processamento e Análise dos Dados

Os dados foram analisados no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS 18, IBM®). Estatísticas descritivas foram realizadas e apresentadas conforme sua distribuição, paramétrica ou não, identificada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*.

O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar a homogeneidade da amostra nas variáveis categóricas (Cor da mãe, Situação conjugal, Escolaridade, Classe social, IMC pré-gestacional, Tipo de parto e Sexo da criança), assim como *Kruskal-Wallis* para as variáveis não paramétricas contínuas (Idade materna e Apgar 5 minutos). *Wilcoxon* foi empregado para os testes não paramétricos pareados (Leptina, Adiponectina e Insulina) e para a variável paramétrica IMC materno foi empregado o teste T pareado.

Para comparar as médias de peso da criança e IMC materno ao longo das entrevistas utilizou-se ANOVA com *post hoc* de *Tukey*. *Games-Howell* foi o teste *post hoc* para avaliar as diferenças entre os grupos na concentração dos hormônios. Para verificar a correlação dos hormônios com o peso da criança e o IMC materno foi aplicada a correlação de *Spearman*. Para todos os casos foi considerado nível de significância  $<0,05$ .

O ganho de peso gestacional, obtido pela diminuição do peso do parto do peso pré-gestacional, foi classificado de acordo com o IMC pré-gestacional. A partir deste, define-se o mínimo e o máximo de peso a ser adquirido durante a gestação, segundo a recomendação do IOM (2009), conforme descrito abaixo.

**Tabela 2.** Recomendações básicas para o ganho de peso durante a gestação de feto único. IOM, 2009.

<b>Índice de Massa Corporal (IMC) antes da gravidez</b>	<b>Classificação de Obesidade em relação ao IMC (OMS) (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Ganho total de peso durante a gestação (gramas)</b>
<b>Magreza</b>	Abaixo de 18,5 kg/m <sup>2</sup>	12.700g – 18.143g
<b>Adequado</b>	18,5 – 24,9 kg/m <sup>2</sup>	11.339g – 15.875g
<b>Sobrepeso</b>	25,0 – 29,9 kg/m <sup>2</sup>	6.803g – 11.339g
<b>Obesidade (incluindo todas as classes)</b>	Acima de 30 kg/m <sup>2</sup>	4.989g – 9.071g

Os dados de peso e estatura das crianças foram importados para o programa *Anthro* versão 3.2.2 da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o cálculo de escore-Z de acordo com a idade e com base nas curvas de crescimento da OMS de 2006. A análise do escore-Z foi utilizada para classificar o *catch up* nas crianças, ou seja, crescimento acelerado, o qual é caracterizado pela diferença superior ou igual a 0,67 de escore-Z em relação ao nascimento, segundo Ong e colaboradores, 2000 (ONG et al., 2000).

### **6.7 Cálculo da Amostra**

O cálculo do tamanho amostral foi baseado no número de amostras necessárias para a realização dos testes bioquímicos (Leptina, Adiponectina e Insulina) para detectar uma diferença entre as médias de 1,5 de desvio padrão, considerando nível de significância de 5% e poder de 90%, que exige no mínimo 10 amostras por grupo. Este cálculo foi estimado por nós, já que não há uma referência na literatura devido a ampla variação na concentração de hormônios no leite materno e por não haver um padrão de adequação da quantidade aceitável ou recomendável destes.

### **6.8 Aspectos Éticos**

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HCPA sob o número 11009-7 e do GHC sob o número 11-027. Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e seus nomes incluídos no estudo somente após a anuência.

## 7. RESULTADOS

No total foram incluídos 74 pares mãe-bebê, dos quais 12 pertenciam ao grupo DM, 10 HAS, 19 TBCO, 12 PIG e 21 CONT. No grupo DM todas as mulheres eram classificadas como diabetes gestacional (DMG) com diagnóstico a partir do final do segundo trimestre. Apenas uma delas já teve DMG em uma gestação anterior e todas elas receberam indicação de tratamento apenas com dieta. Do grupo HAS, 2 eram hipertensas crônicas, 3 pré-eclâmpsia e 5 HAS gestacional.

Os dados socioeconômicos, relativos à assistência pré-natal e ao parto e a antropometria materna demonstraram que os grupos são homogêneos. As mães estudadas eram, na maioria, casadas (82,4%) com ensino médio (56,3%), pertencentes principalmente à Classe Social C (60,2%) e de idades médias entre 20 e 30 anos (média de 26,41 anos). A maioria delas tinha IMC adequado (52,2%), no entanto houve também, um percentual elevado de mulheres que apresentaram excesso de peso (sobrepeso e obesidade – 41,8%) como pode ser observado na Tabela 3.

Em relação a valores *missing*, a escolaridade de uma mãe do grupo TBCO e duas do grupo CONT foi Ignorado (IGN). A classe social de um sujeito do grupo DM foi IGN, pois a mãe não sabia a escolaridade do chefe de família. Apenas uma mãe, do grupo PIG, era da classe social E, e foi incluída na classe D. Não havia famílias classificadas como classe social A. Uma mãe dos grupos DM, TBCO e PIG e 4 do grupo CONT não puderam ter seu IMC pré-gestacional calculado devido inexistência de um dos dados nos seus registros médicos ou por não saber o peso antes de engravidar. Uma mãe dos grupos TBCO, PIG e CONT não tiveram LEP detectada no PP. Uma mãe do grupo CONT extrapolou a curva de concentração de ADIPO no 1M e foi excluída das análises.



**Tabela 3.** Características socioeconômicas, dados pré-natais e do parto de acordo com os grupos. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.

	<b>DM</b>	<b>HAS</b>	<b>TBCO</b>	<b>PIG</b>	<b>CONT</b>
	<b>(12)</b>	<b>(10)</b>	<b>(19)</b>	<b>(12)</b>	<b>(21)</b>
<b>Cor mãe, n (%)</b>					
Branca	6 (50,0)	7 (70,0)	11 (57,9)	3 (25,0)	12 (57,1)
<b>Situação conjugal, n (%)</b>					
Com companheiro	11 (91,7)	8 (80,0)	16 (84,2)	10 (83,3)	16 (76,2)
<b>Escolaridade materna, n (%)</b>					
≤ 8 anos	2 (16,7)	4 (40,0)	8 (44,4)	4 (33,3)	10 (52,6)
> 8 anos	10 (83,3)	6 (60,0)	10 (55,6)	8 (66,7)	9 (47,4)
<b>Classe Social, n (%)</b>					
B	2 (18,2)	5 (50,0)	4 (21,1)	3 (25,0)	7 (33,3)
C	9 (81,8)	4 (40,0)	14 (73,7)	7 (58,3)	10 (47,6)
D	0 (0)	1 (10,0)	1 (5,3)	2 (16,7)	4 (19,0)
<b>Idade mãe, x<sub>±</sub>DP</b>	26,64 (5,75)	29,11 (9,02)	26,28 (5,96)	22,48 (5,42)	27,54 (7,49)
<b>IMC pré-gestacional, n (%)</b>					
Magreza (<18,5 Kg/m <sup>2</sup> )	0 (0)	0 (0)	2 (11,1)	2 (18,2)	0 (0)
Adequado (≥18,5≤ 24,9 Kg/m <sup>2</sup> )	4 (36,4)	3 (30,0)	10 (55,6)	8 (72,7)	10 (58,8)
Sobrepeso (>24,9≤ 29,9 Kg/m <sup>2</sup> )	4 (36,4)	5 (50,0)	3 (16,7)	1 (9,1)	6 (35,3)
Obesidade (>29,9 Kg/m <sup>2</sup> )	3 (27,3)	2 (20,0)	3 (16,7)	0 (0)	1 (5,9)
<b>Tipo de parto, n (%)</b>					
Vaginal	7 (58,3)	3 (30,0)	14 (73,7)	10 (83,3)	16 (76,2)
<b>Sexo criança, n (%)</b>					
Feminino	9 (75,0)	6 (60,0)	10 (52,6)	6 (50,0)	10 (47,6)
<b>Apgar 5 min, x (±DP)</b>	9,42 (0,51)	9,5 (0,53)	9,72 (0,46)	9,67 (0,49)	9,52 (0,68)

*Todas as variáveis acima não diferiram estatisticamente entre os grupos ( $p > 0,05$  no teste Qui-quadrado para variáveis categóricas e Kruskal-Wallis para variáveis contínuas não paramétricas). Classe social de acordo com os critérios ABIPEME, 2010. DM: Diabetes Mellitus; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; TBCO: Tabagismo; PIG: Pequeno Para Idade Gestacional; CONT: controle.*

A concentração dos hormônios no LM no PP é muito semelhante e não há diferença entre os grupos (Tabela 4). Apenas a LEP 1M teve diferença estatística entre os grupos, sendo esta encontrada entre o PIG e CONT. A variação da LEP nas duas ocasiões mantém-se semelhante em cada grupo enquanto que no PIG reduz praticamente a metade. É a menor concentração encontrada além de ser próxima de 50% do observado para o CONT. A concentração de insulina no 1M também diminui e, novamente, a menor concentração é verificada no PIG com diferença estatística entre as aferições. No CONT também houve queda com diferença estatística. A concentração desse hormônio no 1M é semelhante aos outros grupos. Os resultados se mantiveram os mesmos quando se dividiu a concentração dos hormônios pelo IMC materno, ou seja, unidade de hormônios por  $\text{Kg/m}^2$ .

O tipo de alimentação ou estar amamentando não influenciaram na concentração dos hormônios em ambas as entrevistas. Poucas mães não amamentaram seus filhos, apesar de poucas delas o fazerem de forma exclusiva. Aos 6M apenas 11 (14,86%) crianças estavam em aleitamento materno exclusivo sendo o chá o alimento mais precocemente introduzido (dados não apresentados). Na Tabela 5 são apresentadas as crianças que puderam ser avaliadas em cada entrevista e o percentual de crianças que ainda estavam sendo amamentadas ao seio. Excetuando-se as crianças que não foram avaliadas, praticamente 100% das crianças continuavam a receber leite materno até os seis meses de idade.

**Tabela 4.** Concentrações medianas de hormônios no Leite Materno entre os grupos. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.

	<b>DM</b>	<b>HAS</b>	<b>TBCO</b>	<b>PIG</b>	<b>CONT</b>	<b>p</b>
ng/ml	md (n)	md (n)	md (n)	md (n)	md (n)	
<b>Leptina PP (coloastro)</b>	0,668 (7)	0,603 (7)	0,599 (15)	0,641 (10)	0,813 (17)	0,715
<b>Leptina 1M (maduro)</b>	0,460 (7)	0,503 (7)	0,544 (15)	0,377 (10)***	0,715 (16)***	0,026**
<b>p</b>	1,000	0,465	0,753	0,050*	0,234	
<b>Adiponectina PP (coloastro)</b>	10,230 (7)	18,260 (7)	13,110 (17)	14,370 (10)	8,790 (18)	0,105
<b>Adiponectina 1M (maduro)</b>	12,430 (7)	14,710 (7)	10,190 (17)	9,990 (10)	9,870 (17)	0,754
<b>p</b>	0,109	0,465	0,112	0,123	0,959	
<b>Insulina PP (coloastro)</b>	49,370 (7)	58,580 (7)	46,300 (17)	60,485 (10)	55,035 (18)	1,000
<b>Insulina 1M (maduro)</b>	22,830 (7)	25,620 (7)	22,800 (17)	16,665 (10)	22,030 (18)	0,330
<b>p</b>	0,273	0,144	0,084	0,012*	0,041*	

\* $p < 0,05$  para o teste Wilcoxon de amostras pareadas; \*\* $p < 0,05$  para o teste Kruskal-Wallis entre os grupos; \*\*\* $p = 0,045$  para o teste post hoc Games Howell. md: mediana; DM: Diabetes Mellitus; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; TBCO: Tabagismo; PIG: Pequeno Para Idade Gestacional; CONT: controle; PP: pós-parto; 1M: 1 mês.

**Tabela 5.** Frequência de crianças avaliadas em aleitamento materno de acordo com os grupos. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.

	<b>DM</b>	<b>HAS</b>	<b>TBCO</b>	<b>PIG</b>	<b>CONT</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>7 dias</b>	9 (100)	9 (100)	13 (100)	8 (100)	14 (100)
<b>15 dias</b>	10 (100)	10 (100)	15 (100)	9 (90)	14 (100)
<b>1 mês</b>	9 (100)	6 (85,7)	19 (100)	10 (100)	18 (100)
<b>3 meses</b>	8 (100)	7 (100)	17 (100)	9 (100)	15 (88,2)
<b>6 meses</b>	3 (50)	7 (77,8)	10 (83,3)	7 (87,5)	10 (76,9)

*O número amostral difere do basal, pois aqui constam apenas as crianças visitadas nas respectivas entrevistas, sem as perdas. DM: Diabetes Mellitus; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; TBCO: Tabagismo; PIG: Pequeno Para Idade Gestacional; CONT: controle.*

A classificação do ganho de peso gestacional foi diferente entre os grupos ( $p=0,027$ ).

Pouco mais de 20% ganhou peso abaixo do adequado, sendo em grande parte do grupo PIG. Aproximadamente metade das mães ganhou peso acima da recomendação, com maior percentual no grupo HAS. Tanto no Grupo DM quanto TBCO aproximadamente 60% das mães ganharam peso além da recomendação, assim como aproximadamente metade daquelas do grupo CONT, apesar de a maioria ser saudável quanto ao IMCpg (Tabela 6).

**Tabela 6.** Frequência e percentual de adequação do ganho de peso gestacional de acordo com o IOM, 2009. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.

	<b>DM</b>	<b>HAS</b>	<b>TBCO</b>	<b>PIG</b>	<b>CONT</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Abaixo</b>	1 (10)	0 (0)	3 (15,8)	7 (58,3)	4 (21,1)
<b>Adequado</b>	3 (30,0)	2 (20,0)	5 (26,3)	4 (33,3)	5 (26,3)
<b>Acima</b>	6 (60,0)	8 (80,0)	11 (57,9)	1 (8,3)	10 (52,6)

*\* $p=0,027$  para o teste Qui-quadrado. DM: Diabetes Mellitus; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; TBCO: Tabagismo; PIG: Pequeno Para Idade Gestacional; CONT: controle.*

A Tabela 7 apresenta a tendência das médias de IMC materno. Houve diferença entre os grupos em todas as aferições tendo o grupo PIG os menores valores médios sempre. Além disso, quando comparado o IMCpg pareado ao IMC 1M, apenas o grupo DM ( $p=0,079$ ) e o

PIG ( $p=0,265$ ) não tiveram diferença estatisticamente significativa indicando valores médios semelhantes no IMCpg e após o primeiro mês pós-parto (HAS:  $p=0,019$ , TBCO:  $p<0,001$  e CONT:  $p<0,001$ ).

O Ganho de Peso gestacional apenas se correlacionou com a ADIPO do PP fraca e inversamente ( $r=-0,268$ ;  $p=0,046$ ). A menor concentração de ADIPO PP foi encontrada no grupo CONT. O IMCpg e IMC 1M se correlacionaram positivamente com a LEP das duas aferições e com a Insulina 1M, enquanto que para a ADIPO não houve correlação ( $p>0,05$ ) como pode ser visto na Tabela 8.

**Tabela 7.** Tendência do Índice de Massa Corporal (IMC) materno de acordo com o grupo. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.

Kg/m <sup>2</sup>	DM		HAS		TBCO		PIG		CONT		p
	n	(x±DP)	n	(x±DP)	n	(x±DP)	n	(x±DP)	n	(x±DP)	
<b>IMCpg</b>	11	27,38 (5,72)**	10	26,58 (3,59)	19	23,90 (4,83)	12	21,09 (3,46)**	19	25,07 (5,73)	0,026*
<b>IMC parto</b>	11	31,86 (6,14)**	10	32,80 (3,72)**	19	30,24 (5,30)**	12	24,66 (2,77)**	21	30,95 (5,05)*	0,001*
<b>IMC 1M</b>	9	28,26 (6,42)	7	30,47 (2,79)**	19	26,62 (4,61)	10	22,32 (2,30)**	18	29,70 (5,57)*	0,006*
<b>IMC 6M</b>	6	26,06 (6,12)	9	29,47 (4,28)**	12	25,98 (5,68)	8	21,81 (1,93)**	13	28,48 (6,81)	0,048*

\* $p<0,05$  para ANOVA \*\* $p<0,05$  para o teste post hoc Tukey. IMCpg: Índice de Massa Corporal pré-gestacional; DM: Diabetes Mellitus; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; TBCO: Tabagismo; PIG: Pequeno Para Idade Gestacional; CONT: controle.

**Tabela 8.** Correlação dos hormônios no leite materno com o Índice de Massa Corporal materno. IVAPSA Coorte, Porto Alegre, Brasil, 2015.

	<b>n</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>	<b>p</b>
<b>IMCpg</b>			
LEPTINA PP	54	0.344	0.011*
LEPTINA 1M	52	0.737	<0.001*
ADIPONECTINA PP	57	-0.063	0.644
ADIPONECTINA 1M	55	0.046	0.740
INSULINA PP	57	0.107	0.428
INSULINA 1M	56	0.362	0.006*
<b>IMC 1M</b>			
LEPTINA PP	47	0.348	0.017*
LEPTINA 1M	54	0.782	<0.001*
ADIPONECTINA PP	50	-0.222	0.121
ADIPONECTINA 1M	57	-0.016	0.908
INSULINA PP	49	0.070	0.634
INSULINA 1M	58	0.432	0.001*

\* $p < 0.05$  para correlação de Spearman. IMCpg: Índice de Massa Corporal pré-gestacional; IMC 1M: Índice de Massa Corporal no 1º mês; PP: pós-parto; 1M: 1 mês.

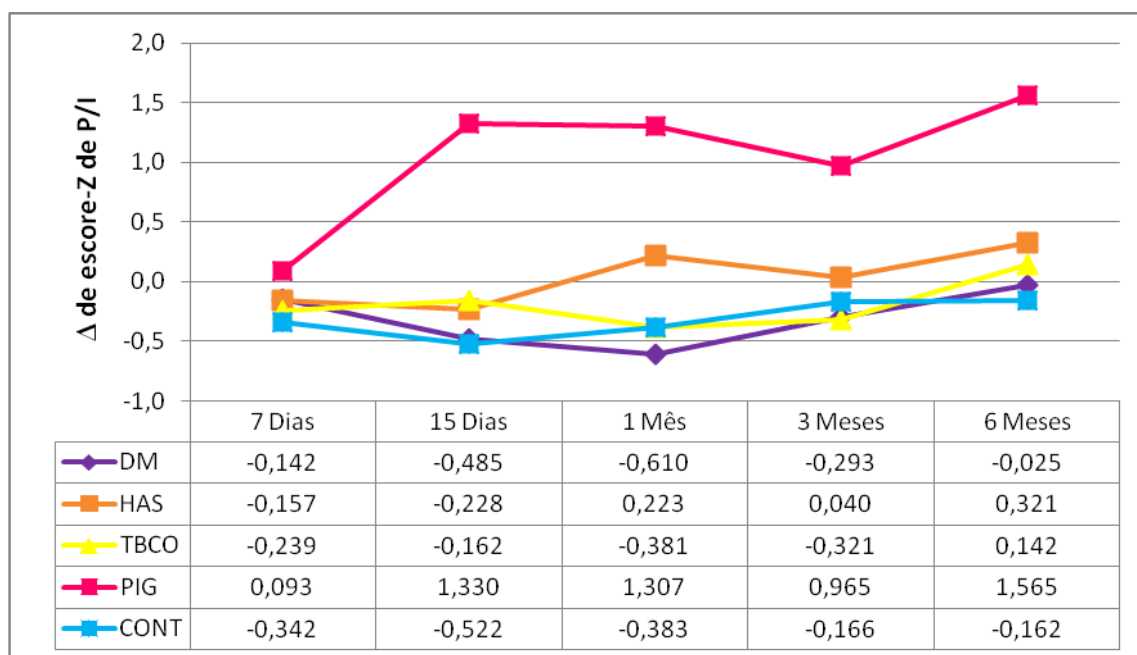
Na Tabela 9 é possível verificar as aferições do peso das crianças desde o nascimento até os 6 meses de idade. Nela observa-se que há diferença entre os grupos, de forma geral até os 15 dias, depois essa diferença desapareceu sendo mantida em alguns grupos específicos como o PIG X CONT. No entanto, não é mais encontrada nos 3M e 6M. Entre os grupos, o PIG teve menor Peso ao Nascer entre os grupos mantendo-se inferior na alta hospitalar. Aos 7D essa diferença foi encontrada apenas quando comparado ao grupo DM ( $p=0,010$ ) e ao CONT ( $p=0,015$ ); com 1M é manteve-se apenas quando comparado ao grupo CONT ( $p=0,048$ ) desaparecendo nas entrevistas de 3M e 6M.

**Tabela 9.** Peso da criança ao longo de seis meses de acordo com o grupo. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.

	n	DM g (x±DP)	n	HAS g (x±DP)	n	TBCO g (x±DP)	n	PIG g (x±DP)	n	CONT g (x±DP)	P
<b>Peso ao Nascer</b>	12	3410,42 (409,06)**	10	3251,50 (455,18)**	18	3154,72 (349,22)**	12	2540,83 (171,16)**	21	3375,24 (435,54)**	<0,001*
<b>Peso na alta hospitalar</b>	11	3170,0 (428,09)**	10	3023,5 (354,35)**	19	3054,21 (262,37)**	12	2415,0 (200,24)**	21	3239,52 (423,47)**	<0,001*
<b>Perda de peso até a alta hospitalar</b>	11	229,09 (127,24)	10	228,0 (153,12)	18	112,78 (216,48)	12	100,0 (110,82)	21	135,71 (193,46)	0,201
<b>Peso aos 7D</b>	9	3491,11 (542,18)**	9	3295,0 (409,85)	13	3200,0 (489,36)	8	2710,51 (310,80)**	14	3387,5 (486,61)**	0,011*
<b>Peso aos 15D</b>	10	3745,0 (461,1)	10	3537,0 (498,46)	17	3487,35 (492,31)	10	3125,0 (586,66)	13	3582,69 (529,29)	0,107
<b>Peso com 1M</b>	9	4261,11 (685,81)	7	4345,71 (542,95)	19	4175,0 (630,78)	10	3775,0 (456,43)**	18	4413,61 (506,06)**	0,085
<b>Peso com 3M</b>	8	6119,37 (487,27)	7	5967,86 (634,05)	17	5744,41 (848,17)	9	5616,67 (637,87)	17	6279,41 (959,27)	0,217
<b>Peso com 6M</b>	6	7795,0 (467,28)	9	7747,78 (612,64)	12	7578,75 (962,28)	8	7650,62 (941,93)	13	7788,08 (618,14)	0,958

\* $p < 0,05$  para ANOVA; \*\* $p < 0,05$  para o teste post hoc de Tukey. DM: Diabetes Mellitus; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; TBCO: Tabagismo; PIG: Pequeno Para Idade Gestacional; CONT: controle.

A Figura 2 apresenta o Gráfico com os dados da diferença de escore – Z de Peso para Idade (P/I) das entrevistas em relação ao nascimento para caracterização do *catch up*. Observa-se no grupo PIG um crescimento acelerado precocemente, já nos primeiros dias de vida. Foi o único grupo a ter diferença de escore – Z superior a 0,67.



**Figura 2.** Gráfico da diferença do escore – Z de Peso para Idade (P/I) em relação ao nascimento de acordo com os grupos. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.

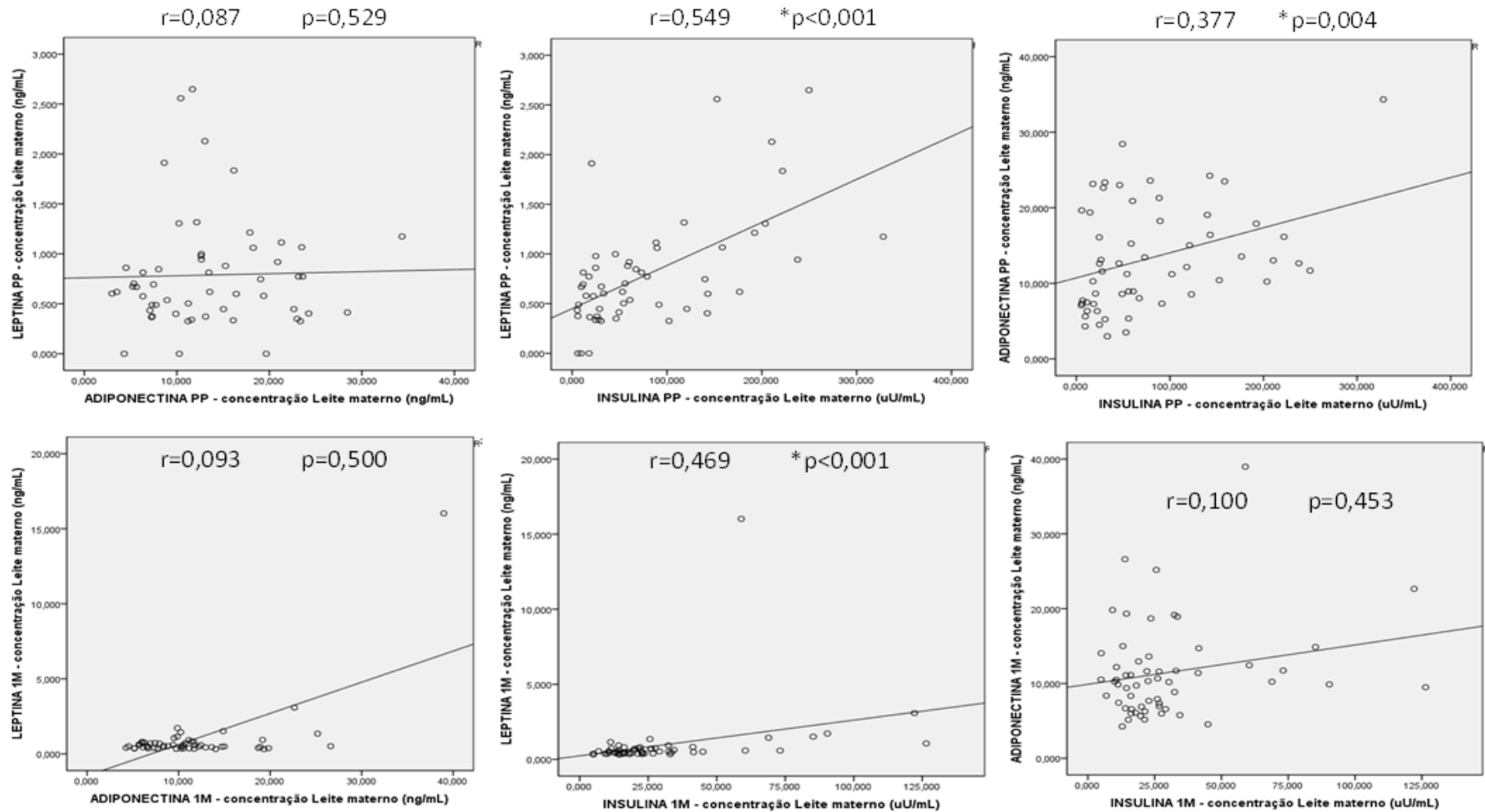
A Tabela 10 apresenta a correlação dos hormônios com o peso da criança. Observa-se que tanto a LEP quanto a Insulina no 1M foram modestamente associadas ao ganho de peso das crianças no 1M. Além disso, como mostra a Figura 3, tanto no PP quanto no 1M, a LEP e a Insulina se correlacionaram entre si ( $r=0,549$ ,  $p<0,001$ ;  $r=0,469$ ,  $p<0,001$ , respectivamente), enquanto a ADIPO do PP apenas foi correlacionada à Insulina no PP ( $r=0,377$ ,  $p=0,004$ ).



**Tabela 10.** Correlação dos hormônios do leite materno com o peso da criança. Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.

	<b>n</b>	<b>Coefficiente de Correlação</b>	<b>p</b>
<b>Peso ao Nascer</b>			
LEPTINA PP	55	0,304	0,024*
LEPTINA 1M	54	0,266	0,052
ADIPONECTINA PP	58	-0,222	0,094
ADIPONECTINA 1M	57	-0,266	0,045*
INSULINA PP	58	0,149	0,265
INSULINA 1M	58	0,083	0,534
<b>Ganho de peso 1M</b>			
LEPTINA PP	47	0,012	0,936
LEPTINA 1M	54	-0,295	0,030*
ADIPONECTINA PP	50	-0,100	0,488
ADIPONECTINA 1M	57	-0,192	0,153
INSULINA PP	49	-0,091	0,534
INSULINA 1M	58	-0,262	0,047*

\* $p < 0,05$  para a Correlação de Spearman. DM: Diabetes Mellitus; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; TBCO: Tabagismo; PIG: Pequeno Para Idade Gestacional; CONT: controle; PP: pós-parto; 1M: 1 mês.



**Figura 3.** Gráfico da correlação entre os hormônios no Pós Parto (PP) e no 1º Mês (1M). Coorte IVAPSA, Porto Alegre, 2015.  $*p<0,05$  para Correlação de *Spearman*.

## **8. DISCUSSÃO**

### **8.1 Característica da amostra**

Os grupos demonstraram ser homogêneos entre si, apesar dos diferentes quadros clínicos gestacionais. As mães têm médias de idade semelhantes, assim como sua cor/raça, renda, classe social e situação conjugal. O diagnóstico quanto ao IMC pré-gestacional e o tipo de parto também não diferiram entre os grupos. O tipo de alimentação e estar ou não amamentando foi semelhante entre os grupos. Praticamente todas as mães avaliadas seguiam amamentando seus filhos até o 6M. Em outro estudo realizado por nosso grupo, também não houve diferença estatística no consumo de calorias, macronutrientes e ácidos graxos durante a gestação, avaliado retrospectivamente, através de um questionário de frequência alimentar (BERNARDI, 2013).

### **8.2 Método utilizado para avaliar os hormônios**

O método utilizado para detectar a LEP no LM parece ser o melhor, conforme comprovado por Karatas e colaboradores (KARATAS et al., 2011). A quantidade de gordura presente no LM interfere na quantificação do hormônio, por isso deve ser realizada a sua separação. Há outras formas de avaliar a concentração no LM, mas a exclusão da gordura anteriormente à análise parece ser a melhor opção (EILERS et al., 2011).

### **8.3 Índice de Massa Corporal materno**

Metade da amostra ganhou peso acima do recomendado, especialmente no grupo HAS que também apresenta as maiores médias de idade. A média de IMC do

parto das mães do grupo FIG ficam no limiar ou abaixo do adequado nas idades gestacionais de 37 a 40 semanas (ATALAH et al., 1997). As mães tabagistas, apesar de a literatura descrevê-las como tendo baixo ganho de peso gestacional ou serem mais magras, neste estudo, não se apresentaram desta forma. São mães que, mais da metade, apresentam IMC adequado antes da gravidez, no entanto acima de 50% delas ganham peso acima do recomendado, sem gerar um ambiente de restrição para o feto.

No entanto, devemos ressaltar que durante o período gestacional a LEP aumenta de acordo com a idade materna e ganho de peso gestacional e decai após o parto (BUTTE et al., 1997; FRANCO-SENA et al., 2010; VAHAMIKO; ISOLAURI; LAITINEN, 2013). Existe, também, uma relação entre os baixos níveis de LEP na gestação e maior chance de desenvolvimento de crianças pequenas para idade gestacional, demonstrando que há uma correspondência na concentração sérica da mãe e o ganho de peso do feto (BIELICKI et al., 2004). Além disso, nas crianças nascidas pré-termo observa-se menor concentração de LEP, inclusive no LM, indicando do mesmo modo essa associação (BRONSKY et al., 2006).

Entretanto, as crianças FIG do presente estudo, são todas nascidas a termo e nós não avaliamos as concentrações séricas dos hormônios. Contudo, o ganho de peso durante a gestação apresentou-se inadequadamente num percentual elevado nesse grupo. E, apesar disso, não encontramos diferença em nenhum dos hormônios no leite do PP demonstrando que, mesmo as mães do grupo FIG, se mostraram semelhantes às outras, nesse aspecto, independente de serem diferentes quanto ao IMC em todas as entrevistas. Todavia, a média de IMC 1M é muito semelhante ao IMC<sub>pg</sub> no grupo FIG. O grupo DM também tem médias de IMC 1M semelhante ao IMC<sub>pg</sub>, no entanto, são médias consideradas com diagnóstico de excesso de peso, diferentemente do FIG. Como a concentração sérica de LEP e de Insulina é proporcional ao tecido adiposo presente,

esse IMC similar das duas aferições pode ter ocasionado esse declínio acentuado na concentração do LM no grupo FIG.

Dessa forma, ao haver correlação da concentração dos hormônios no leite com o IMC materno, sendo o ganho de peso gestacional importante na determinação do IMC, e tendo o LM um papel importante na saúde pós-natal devido à função biológica que esses hormônios desempenham, a concentração destes se torna relevante. Infere-se então, que, no caso das gestações de FIG, o ambiente intrauterino promove de alguma forma, em uma gestação a termo, quantidades suficientes de hormônios no colostro importantes para o crescimento precoce, possivelmente pelo aumento de peso e, por consequência, acréscimo do IMC.

#### **8.4 Concentração dos hormônios no Leite Materno**

A concentração dos hormônios diminuiu conforme a maturação do LM, principalmente no grupo FIG. Nós observamos que, assim como outros estudos, a concentração dos hormônios diminui ao longo do aleitamento materno (EILERS et al., 2011; ILCOL et al., 2006; LEY et al., 2012; MARTIN et al., 2006), diferente do observado por Doneray et al (DONERAY et al., 2009), e pode ser detectado após um ano de lactação (BRONSKY et al., 2011). A presença destes no leite materno é importante, pois eles têm atividade, ou podem ser absorvidos pela mucosa intestinal por receptores, sem serem clivados, nesse período de aleitamento (SANCHEZ et al., 2005). Ou seja, a fonte desses hormônios a partir da oferta pela mãe através do LM ativam as vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento do sistema gastrointestinal da criança (ATTIG et al., 2013). São importantes, também, para a regulação do metabolismo, pois participam da sinalização do núcleo arqueado do hipotálamo

passando a atuar sobre o controle da saciedade e do apetite (DE GRAAF et al., 2004; SAVINO; FISSORE; et al., 2009).

A ADIPO não diferiu nem entre os grupos e nem do PP para 1M. Observou-se aumento na concentração desse hormônio para o grupo DM, enquanto no PP a maior concentração foi encontrada no grupo HAS, apesar de não haver diferença estatística. Dündar e colaboradores mostraram que a ADIPO do colostro não se correlacionou com o peso da criança, assim como outros autores (BRONSKY et al., 2006; CESUR et al., 2012; DUNDAR et al., 2010; WEYERMANN et al., 2006). Outros relatos corroboram nossos achados quanto à concentração desse hormônio durante o período de lactação (BRONSKY et al., 2011; LEY et al., 2012; MARTIN et al., 2006). Somado a isso, parece ser o hormônio em maior concentração quando comparado aos demais (SAVINO et al., 2012).

A Insulina é o hormônio menos estudado atualmente no LM. Ela é sensibilizada tanto pela LEP quanto pela ADIPO. No presente estudo, a Insulina se correlacionou à LEP em ambas as entrevistas, enquanto a ADIPO apenas no PP. Assim, como os outros hormônios estudados a insulina também é transmitida para a criança através do LM (NEWBURG et al., 2010; SANCHEZ et al., 2005), independente da presença e do tipo de Diabetes (WHITMORE et al., 2012). Assim como verificado por Ley e colaboradores, nosso estudo também observou que a concentração de insulina diminui ao longo da lactação (LEY et al., 2012). Fields e colaboradores constataram que maiores concentrações de insulina no LM foram associadas com menor peso do bebê e massa magra (FIELDS; DEMERATH, 2012).

### 8.5 Peso dos lactentes

O peso das crianças foi diferente entre os grupos, especialmente ao nascimento com diferenças específicas ao longo do primeiro mês, particularmente no grupo FIG. Vários estudos têm comprovado a relação de hormônios, em especial a LEP, com o ganho de peso das crianças avaliadas (SAVINO et al., 2008). Nesse estudo, a LEP e a Insulina do 1M parecem se correlacionar com o ganho de peso no 1º mês. Estudo recente mostrou que a frequência e a duração do aleitamento materno se correlacionaram positivamente com a concentração de proteínas (KHAN et al., 2013). Assim, supõe-se que as concentrações hormonais também possam ser influenciadas pelos mesmos fatores externos.

A menor exposição tanto à LEP quanto à Insulina durante o período de aleitamento parecem estar associadas ao peso da criança, inclusive com maior massa gorda (DONERAY et al., 2009; FIELDS; DEMERATH, 2012; MIRALLES et al., 2006; PICO; OLIVER; et al., 2007). Butte et al, explicaram a diminuição da LEP pela redução da Insulina em 20% demonstrando a relação entre estes hormônios e que parecem ter efeitos centrais semelhantes suscitando que haja modulação entre eles (BUTTE et al., 1997). Além disso, estes hormônios têm reflexos importantes na saúde dos recém-nascidos, principalmente no que diz respeito à composição corporal e o peso desses indivíduos (DONERAY et al., 2009; FIELDS; DEMERATH, 2012; MIRALLES et al., 2006; PICO; OLIVER; et al., 2007; PICO; SANCHEZ; et al., 2007). Quantidades insuficientes de LEP durante o período da lactação parecem gerar menor proteção contra a obesidade e processos metabólicos (DONERAY et al., 2009; MIRALLES et al., 2006; PICO; OLIVER; et al., 2007).

Nós não encontramos diferença nem entre os grupos e nem entre as entrevistas nos níveis de ADIPO. Entretanto, a sua concentração no LM aparenta ter influência

maior no ganho de peso no segundo ano de vida, sendo a exposição a altas doses na lactação a responsável nesse período posterior (BRUNNER et al., 2014; WOO et al., 2012), o que vai de encontro ao observado por Woo et al (WOO et al., 2009). Weyermann e colaboradores constataram que a exposição a elevados níveis de ADIPO no LM pode ser um fator de risco para obesidade em crianças maiores (WEYERMANN et al., 2007). Klünder-Klünder e colaboradores, também mencionaram uma relação inversamente proporcional entre a ADIPO e componentes da Síndrome Metabólica, indicando-o como um biomarcador (WOO et al., 2009) para o risco de desenvolvimento desta (KLUNDER-KLUNDER et al., 2013), também utilizado e considerado na vida adulta (VON FRANKENBERG et al., 2014).

O rápido ganho de peso, tanto precoce como na infância pode ser um fator de risco para a obesidade na vida adulta (EKELUND et al., 2006). Além disso, tem sido associado ao aumento do risco de sobrepeso aos 4 anos de idade, independente de possíveis fatores de confusão (DENNISON et al., 2006) e outros desfechos desfavoráveis (BARKER et al., 2002; COUPE et al., 2012; KAIJSER et al., 2009; ONG et al., 2002; PUTZKER et al., 2014). Embora o *catch-up* precoce pareça ser benéfico, o Consenso Latino-Americano para crianças nascidas PIG recomenda que essas crianças não devam ser estimuladas a ganhar peso rápido demais ou excessivamente, em um esforço para contornar o desenvolvimento de distúrbios metabólicos (BOGUSZEWSKI et al., 2011).

Nossa hipótese é baseada nessas alterações hormonais acima descritas (BIELICKI et al., 2004; SCHUELER et al., 2013). Com a presença de menor quantidade de LEP pelo LM a saciedade da criança PIG fica prejudicada. Além disso, menos quantidade de insulina pode reduzir a captação de glicose para as células permitindo maior quantidade circulante, o que pode interferir no armazenamento desta



(LIMESAND et al., 2007; PUTZKER et al., 2014; WALLACE et al., 2007). Então, essas quantidades inferiores de LEP e insulina pelo LM faria com que as crianças do grupo FIG ascendessem quanto ao peso a ponto de se assemelhar aos outros grupos a partir do primeiro mês de vida.

### **8.6 Pontos Fortes**

Esse estudo é uma coorte temática que acompanha várias características maternas que hoje são prevalentes na população. Nela, verifica-se a influência do ambiente intrauterino na saúde da criança e de questões que permeiam a vida pós-natal precoce. Ao que se sabe é a primeira a fazer esse tipo de abordagem. Além disso, parece ser o primeiro estudo, a nosso conhecimento, a quantificar hormônios no leite materno logo após o nascimento e de vários grupos ao mesmo tempo para tentar buscar uma explicação da interferência desses ambientes intrauterinos nos níveis hormonais. Estes podem repercutir na saúde pós-natal da criança em um período tão importante para o desenvolvimento infantil e com reflexos no decorrer da vida, em especial as alterações no leite de mães de crianças FIG.

Assim, o maior achado é a identificação precoce de alterações no LM, de mais de um hormônio que, porventura, afetem o metabolismo de crianças FIG. Para comprovar essa hipótese outros estudos, incluindo outros hormônios, se fazem necessários.

### **8.7 Limitações**

Algumas limitações incluem o horário de coleta do LM, já que não foi controlado, ou estar ou não em jejum. Na medida em que havia pesquisadores disponíveis e mães que se encaixassem nos critérios de inclusão procedia-se a coleta do

LM no PP, assim como a entrevista de 1M era marcada de acordo com a disponibilidade da mãe.

No entanto, acredita-se que isso não tenha interferido na concentração dos hormônios no LM ou, pelo menos, não alterariam os resultados, pois um estudo de Whitmore e colaboradores, (WHITMORE et al., 2012), que comparou amostras de LM coletadas durante 24h de mães com DM tipo 1, 2 e controles, não encontrou diferença nos níveis de insulina independente da hora da coleta. Para a LEP o que se sabe é que não há diferença na concentração desse hormônio antes ou depois da criança ter mamado (SCHUELER et al., 2013; UCAR et al., 2000). Possivelmente, para ADIPO possa ser da mesma forma, mas não há estudos que comprovem essa não alteração.

O número amostral pequeno de alguns grupos pode ter dissolvido os resultados a ponto de não encontrarmos diferença nesses grupos em específico. Com o prosseguimento da pesquisa haverá possibilidade de analisar mais amostras e, assim, reestudá-las. Além disso, os grupos são homogêneos entre si, independentemente de uma condição patológica pré-existente.

## 9. CONCLUSÕES

A queda na concentração de LEP e Insulina do LM de mães de PIG, mediada pela redução do seu IMC, resultou em *catch up* precoce nas crianças desse grupo, o que demonstra uma adaptação para sua sobrevivência.

## 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O LM tem importância na vida precoce dos recém-nascidos ao oferecer elementos bioativos à criança. O ganho de peso inadequado durante a gestação não gera um ambiente adverso apenas para o feto como também na vida pós-natal. O baixo peso adquirido durante a gestação faz com que as mulheres reduzam mais seu peso depois do parto e, também, os hormônios importantes para a saciedade da criança, presentes no leite materno, sofrem com essas alterações. Assim, enfatiza-se a importância de um pré-natal adequado à gestante abordando essas questões e posteriormente no puerpério para a saúde de ambos, mãe e criança.

Nossos resultados levam a crer que haja uma alteração importante no leite de mães de crianças PIG provocando modificações nos mecanismos de controle e na composição corporal desses indivíduos que repercutem ao longo da vida. Dessa forma, sugere-se a relevante importância dessas adipocinas num período precoce do desenvolvimento, já que a concentração de LEP e Insulina no LM de mães de crianças com PIG é inferior e pode explicar o *catch up* no primeiro mês de vida. No entanto, o pequeno número amostral de alguns grupos como, DM e HAS, pode ter dissolvido os resultados.

As famílias aqui estudadas são de baixa classe social, com escolaridade parecida e vivendo num ambiente semelhante, demonstrando que o fato de passar por determinadas circunstâncias durante o período fetal irá refletir na evolução extra útero. O baixo peso ao nascer, com diversas consequências já relatadas, também aparece aqui como fator que irá repercutir no perfil de saúde da criança. Assim, nossos achados reiteram a teoria de que ambientes intrauterinos adversos podem gerar consequências pós-natais, inclusive afetando a qualidade hormonal do leite materno.

## REFERÊNCIAS

IOM – Institute of Medicine. In: RASMUSSEN, K. M. e YAKTINE, A. L. (Ed.). **Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines**. Washington (DC), 2009. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). ISBN 9780309131131.

AL MAMUN, A. et al. Association between gestational weight gain and postpartum diabetes: evidence from a community based large cohort study. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e75679, 2013.

ANKUMAH, N. A. et al. Risk of adverse pregnancy outcomes in women with mild chronic hypertension before 20 weeks of gestation. **Obstet Gynecol**, v. 123, n. 5, p. 966-72, May 2014.

ATALAH, E. et al. [Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women]. **Rev Med Chil**, v. 125, n. 12, p. 1429-36, Dec 1997.

ATTIG, L. et al. Postnatal leptin promotes organ maturation and development in IUGR piglets. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64616, 2013.

AYRES, C. et al. Exposure to maternal smoking during fetal life affects food preferences in adulthood independent of the effects of intrauterine growth restriction. **J Dev Orig Health Dis**, v. 2, n. 3, p. 162-7, Jun 2011.

BARKER, D. J. et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **Int J Epidemiol**, v. 31, n. 6, p. 1235-9, Dec 2002.

BENER, A.; SALEH, N. M.; AL-HAMAQ, A. Prevalence of gestational diabetes and associated maternal and neonatal complications in a fast-developing community: global comparisons. **Int J Womens Health**, v. 3, p. 367-73, 2011.

BERGEN, H. T. Exposure to smoke during development: fetal programming of adult disease. **Tob Induc Dis**, v. 3, n. 2, p. 5-16, 2006.

BERNARDI, J. R. et al. Impact of Perinatal Different Intrauterine Environments on Child Growth and Development in the First Six Months of Life--IVAPSA Birth Cohort: rationale, design, and methods. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 12, p. 25, 2012.

BERNARDI, Juliana Rombaldi. **A influência de ácidos graxos poliinsaturados em aspectos metabólicos e de crescimento intrauterino: estudo translacional**. 153f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

BEYERLEIN, A. et al. Is low birth weight in the causal pathway of the association between maternal smoking in pregnancy and higher BMI in the offspring? **Eur J Epidemiol**, v. 26, n. 5, p. 413-20, May 2011.

BIELICKI, J.; HUCH, R.; VON MANDACH, U. Time-course of leptin levels in term and preterm human milk. **Eur J Endocrinol**, v. 151, n. 2, p. 271-6, Aug 2004.

BILANO, V. L. et al. Risk factors of pre-eclampsia/eclampsia and its adverse outcomes in low- and middle-income countries: a WHO secondary analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91198, 2014.

BOGUSZEWSKI, M. C. et al. Latin American consensus: children born small for gestational age. **BMC Pediatr**, v. 11, p. 66, 2011.

BRONSKY, J. et al. Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: proteins newly identified in human breast milk. **Clin Chem**, v. 52, n. 9, p. 1763-70, Sep 2006.

BRONSKY, J. et al. Adiponectin, AFABP, and leptin in human breast milk during 12 months of lactation. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 52, n. 4, p. 474-7, Apr 2011.

BRUNNER, S. et al. Breast milk leptin and adiponectin in relation to infant body composition up to 2 years. **Pediatr Obes**, Apr 14 2014.

BUTTE, N. F.; HOPKINSON, J. M.; NICOLSON, M. A. Leptin in human reproduction: serum leptin levels in pregnant and lactating women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 2, p. 585-9, Feb 1997.

CASABIELL, X. et al. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 12, p. 4270-3, Dec 1997.

CESUR, G. et al. The relationship between ghrelin and adiponectin levels in breast milk and infant serum and growth of infants during early postnatal life. **J Physiol Sci**, v. 62, n. 3, p. 185-90, May 2012.

COUPE, B. et al. The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 297, n. 3, p. R813-24, Sep 2009.

COUPE, B. et al. Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30616, 2012.

D'SOUZA A, M. et al. Leptin deficiency in rats results in hyperinsulinemia and impaired glucose homeostasis. **Endocrinology**, v. 155, n. 4, p. 1268-79, Apr 2014.

DA SILVA, C. H. et al. Secular trend of very low birth weight rate in Porto Alegre, Southern Brazil. **J Biosoc Sci**, v. 42, n. 2, p. 243-53, Mar 2010.

DABELEA, D. et al. Association of intrauterine exposure to maternal diabetes and obesity with type 2 diabetes in youth: the SEARCH Case-Control Study. **Diabetes Care**, v. 31, n. 7, p. 1422-6, Jul 2008.

DE GRAAF, C. et al. Biomarkers of satiation and satiety. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 6, p. 946-61, Jun 2004.

DENNISON, B. A. et al. Rapid infant weight gain predicts childhood overweight. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 3, p. 491-9, Mar 2006.

DODE, M. A.; SANTOS, I. S.; GONZALEZ, D. A. Anthropometry from birth to 24 months among offspring of women with gestational diabetes: 2004 Pelotas Birth Cohort. **J Dev Orig Health Dis**, v. 2, n. 3, p. 144-51, Jun 2011.

DONERAY, H.; ORBAK, Z.; YILDIZ, L. The relationship between breast milk leptin and neonatal weight gain. **Acta Paediatr**, v. 98, n. 4, p. 643-7, Apr 2009.

DUNDAR, N. O. et al. Longitudinal investigation of the relationship between breast milk leptin levels and growth in breast-fed infants. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 18, n. 2, p. 181-7, Feb 2005.

DUNDAR, N. O. et al. Ghrelin and adiponectin levels in colostrum, cord blood and maternal serum. **Pediatr Int**, v. 52, n. 4, p. 622-5, Aug 2010.

EIDEM, I. et al. Perinatal and infant mortality in term and preterm births among women with type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 54, n. 11, p. 2771-8, Nov 2011.

EILERS, E. et al. Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants. **Early Hum Dev**, v. 87, n. 6, p. 415-9, Jun 2011.

EKELUND, U. et al. Upward weight percentile crossing in infancy and early childhood independently predicts fat mass in young adults: the Stockholm Weight Development Study (SWEDES). **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 2, p. 324-30, Feb 2006.

ERIKSSON, J. G. et al. Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. **Diabetologia**, v. 45, n. 3, p. 342-8, Mar 2002.

FABRI, C. E. et al. Maternal smoking during pregnancy and primary headache in school-aged children: a cohort study. **Cephalalgia**, v. 32, n. 4, p. 317-27, Dec 2011.

F. SAVINO et al. ADVANCES ON HUMAN MILK HORMONES AND PROTECTION AGAINST OBESITY. **Cellular & Molecular Biology**, v. 59, 2013.

FERRAZZANI, S. et al. Neonatal outcome in hypertensive disorders of pregnancy. **Early Hum Dev**, v. 87, n. 6, p. 445-9, Jun 2011.

FIELDS, D. A.; DEMERATH, E. W. Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF-alpha in human breast milk with infant growth and body composition. **Pediatr Obes**, v. 7, n. 4, p. 304-12, Aug 2012.

FRANCO-SENA, A. B. et al. Low leptin concentration in the first gestational trimester is associated with being born small for gestational age: prospective study in Rio de Janeiro, Brazil. **Neonatology**, v. 97, n. 4, p. 291-8, Jun 2010.

GAILLARD, R. et al. Risk factors and outcomes of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 5, p. 1046-55, May 2013.

GREG R. ALEXANDER et al. A United States National Reference for Fetal Growth. **Obstetric Gynecology**, v. 87, n. 2, 1996.

GRUNEWALD, M. et al. Excessive Weight Gain during Full Breast-Feeding. **Ann Nutr Metab**, v. 64, n. 3-4, p. 271-5, 2014.

GRUSLIN, A.; LEMYRE, B. Pre-eclampsia: fetal assessment and neonatal outcomes. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 25, n. 4, p. 491-507, Aug 2011.

GUPTA, M. et al. Breast feeding and insulin levels in low birth weight neonates: a randomized study. **Indian J Pediatr**, v. 77, n. 5, p. 509-13, May 2010.

HATSU, I. E.; MCDOUGALD, D. M.; ANDERSON, A. K. Effect of infant feeding on maternal body composition. **Int Breastfeed J**, v. 3, p. 18, 2008.

HEAMAN, M. et al. Risk factors for preterm birth and small-for-gestational-age births among Canadian women. **Paediatr Perinat Epidemiol**, v. 27, n. 1, p. 54-61, Jan 2013.

HEARD, A. R. et al. Hypertension during pregnancy in South Australia, part 1: pregnancy outcomes. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 44, n. 5, p. 404-9, Oct 2004.

IAMS, J. D. Small for gestational age (SGA) and fetal growth restriction (FGR). **Am J Obstet Gynecol**, v. 202, n. 6, p. 513, Jun 2010.

IKEDA, N. et al. Effects of breastfeeding on the risk factors for metabolic syndrome in preterm infants. **J Dev Orig Health Dis**, v. 5, n. 6, p. 459-64, Dec 2014.

ILCOL, Y. O.; HIZLI, Z. B.; OZKAN, T. Leptin concentration in breast milk and its relationship to duration of lactation and hormonal status. **Int Breastfeed J**, v. 1, p. 21, 2006.

INGVARSSON, R. F. et al. The effects of smoking in pregnancy on factors influencing fetal growth. **Acta Paediatr**, v. 96, n. 3, p. 383-6, Mar 2007.

INO, T. Maternal smoking during pregnancy and offspring obesity: meta-analysis. **Pediatr Int**, v. 52, n. 1, p. 94-9, Feb 2010.

JAQUET, D. et al. Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, n. 4, p. 1243-6, Apr 1998.

JAQUET, D. et al. High serum leptin concentrations during catch-up growth of children born with intrauterine growth retardation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 6, p. 1949-53, Jun 1999.



KAIJSER, M. et al. Perinatal risk factors for diabetes in later life. **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 523-6, Mar 2009.

KARATAS, Z. et al. Breastmilk ghrelin, leptin, and fat levels changing foremilk to hindmilk: is that important for self-control of feeding? **Eur J Pediatr**, v. 170, n. 10, p. 1273-80, Oct 2011.

KHAN, S. et al. Variation in fat, lactose, and protein composition in breast milk over 24 hours: associations with infant feeding patterns. **J Hum Lact**, v. 29, n. 1, p. 81-9, Feb 2013.

KLUNDER-KLUNDER, M. et al. Adiponectin in eutrophic and obese children as a biomarker to predict metabolic syndrome and each of its components. **BMC Public Health**, v. 13, p. 88, 2013.

KOLETZKO, B. et al. Early nutrition programming of long-term health. **Proc Nutr Soc**, v. 71, n. 3, p. 371-8, Aug 2012.

KON, I. Y. et al. The Study of Breast Milk IGF-1, Leptin, Ghrelin and Adiponectin Levels as Possible Reasons of High Weight Gain in Breast-Fed Infants. **Ann Nutr Metab**, v. 65, n. 4, p. 317-323, Nov 14 2014.

KOSHY, G.; DELPISHEH, A.; BRABIN, B. J. Childhood obesity and parental smoking as risk factors for childhood ADHD in Liverpool children. **Atten Defic Hyperact Disord**, v. 3, n. 1, p. 21-8, Mar 2011a.

\_\_\_\_\_. Dose response association of pregnancy cigarette smoke exposure, childhood stature, overweight and obesity. **Eur J Public Health**, v. 21, n. 3, p. 286-91, Jun 2011b.

KRAMER, M. S. et al. Feeding effects on growth during infancy. **J Pediatr**, v. 145, n. 5, p. 600-5, Nov 2004.

KULIE, T. et al. Obesity and women's health: an evidence-based review. **J Am Board Fam Med**, v. 24, n. 1, p. 75-85, Jan-Feb 2011.

LAMB, M. M. et al. Early-life predictors of higher body mass index in healthy children. **Ann Nutr Metab**, v. 56, n. 1, p. 16-22, 2010.

LAWLOR, D. A. et al. Cardiovascular biomarkers and vascular function during childhood in the offspring of mothers with hypertensive disorders of pregnancy: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. **Eur Heart J**, v. 33, n. 3, p. 335-45, Feb 2012.

LEY, S. H. et al. Associations of prenatal metabolic abnormalities with insulin and adiponectin concentrations in human milk. **Am J Clin Nutr**, v. 95, n. 4, p. 867-74, Apr 2012.

LEY, S. H. et al. Impact of maternal metabolic abnormalities in pregnancy on human milk and subsequent infant metabolic development: methodology and design. **BMC Public Health**, v. 10, p. 590, 2010.

LI, N. et al. Maternal prepregnancy body mass index and gestational weight gain on pregnancy outcomes. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82310, 2013.

LIMA, J. A. et al. Prevalence of and risk factors for wheezing in the first year of life. **J Bras Pneumol**, v. 36, n. 5, p. 525-31, Sep-Oct 2010.

LIMESAND, S. W. et al. Increased insulin sensitivity and maintenance of glucose utilization rates in fetal sheep with placental insufficiency and intrauterine growth restriction. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 6, p. E1716-25, Dec 2007.

LOHAUGEN, G. C. et al. Small for gestational age and intrauterine growth restriction decreases cognitive function in young adults. **J Pediatr**, v. 163, n. 2, p. 447-53, Aug 2013.

LONNERDAL, B. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. **Am J Clin Nutr**, v. 99, n. 3, p. 712S-7S, Mar 2014.

MAMUN, A. A. et al. Associations of excess weight gain during pregnancy with long-term maternal overweight and obesity: evidence from 21 y postpartum follow-up. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 5, p. 1336-41, May 2010.

MAPLE-BROWN, L. et al. Maternal pregravid weight is the primary determinant of serum leptin and its metabolic associations in pregnancy, irrespective of gestational glucose tolerance status. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 11, p. 4148-55, Nov 2012.

MARTIN, L. J. et al. Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 5, p. 1106-11, May 2006.

MARTINEZ-MESA, J. et al. Life course association of maternal smoking during pregnancy and offspring's height: data from the 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort. **J Adolesc Health**, v. 51, n. 6 Suppl, p. S53-7, Dec 2012.

MATIJASEVICH, A. et al. Maternal smoking during pregnancy and offspring growth in childhood: 1993 and 2004 Pelotas cohort studies. **Arch Dis Child**, v. 96, n. 6, p. 519-25, Jun 2011.

MAYER, C.; JOSEPH, K. S. Fetal growth: a review of terms, concepts and issues relevant to obstetrics. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 41, n. 2, p. 136-45, Feb 2013.

MIRALLES, O. et al. A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 8, p. 1371-7, Aug 2006.

MONASTA, L. et al. Early-life determinants of overweight and obesity: a review of systematic reviews. **Obes Rev**, v. 11, n. 10, p. 695-708, Oct 2010.

MONGELLI, M.; GARDOSI, J. Longitudinal study of fetal growth in subgroups of a low-risk population. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 6, n. 5, p. 340-4, Nov 1995.

- MORAES, A. B. et al. [Trends in the proportion of low birth weight from 1994 to 2004 in Rio Grande do Sul State, Brazil: a multilevel analysis]. **Cad Saude Publica**, v. 27, n. 2, p. 229-40, Feb 2011.
- MORAES, A. B. et al. Risk factors for low birth weight in Rio Grande do Sul State, Brazil: classical and multilevel analysis. **Cad Saude Publica**, v. 28, n. 12, p. 2293-305, Dec 2012.
- NEWBURG, D. S.; WOO, J. G.; MORROW, A. L. Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. **J Pediatr**, v. 156, n. 2 Suppl, p. S41-6, Feb 2010.
- NOHR, E. A. et al. Combined associations of prepregnancy body mass index and gestational weight gain with the outcome of pregnancy. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 6, p. 1750-9, Jun 2008.
- OKEN, E.; LEVITAN, E. B.; GILLMAN, M. W. Maternal smoking during pregnancy and child overweight: systematic review and meta-analysis. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, n. 2, p. 201-10, Feb 2008.
- ONG, K. K. et al. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. **BMJ**, v. 320, n. 7240, p. 967-71, Apr 8 2000.
- ONG, K. K. et al. Size at birth and early childhood growth in relation to maternal smoking, parity and infant breast-feeding: longitudinal birth cohort study and analysis. **Pediatr Res**, v. 52, n. 6, p. 863-7, Dec 2002.
- OZKAN, B. et al. Effect of smoking on neonatal and maternal serum and breast milk leptin levels. **Endocr Res**, v. 31, n. 3, p. 177-83, 2005.
- PAVIC, I. et al. Influence of passive smoking on functional abilities in children. **Int J Environ Health Res**, v. 22, n. 4, p. 355-61, 2012.
- PETTITT, D. J. et al. Association between maternal diabetes in utero and age at offspring's diagnosis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 31, n. 11, p. 2126-30, Nov 2008.
- PICO, C. et al. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. **Int J Obes (Lond)**, v. 31, n. 8, p. 1199-209, Aug 2007.
- PICO, C. et al. Role of leptin present in maternal milk in the control of energy balance during the post-natal period. **Genes Nutr**, v. 2, n. 1, p. 139-41, Oct 2007.
- PLAGEMANN, A. et al. Long-term impact of neonatal breast-feeding on body weight and glucose tolerance in children of diabetic mothers. **Diabetes Care**, v. 25, n. 1, p. 16-22, Jan 2002.
- PUTZKER, S. et al. Insulin resistance in young adults born small for gestational age (SGA). **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 27, n. 3-4, p. 253-9, Mar 2014.

SANCHEZ, J. et al. Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. **Endocrinology**, v. 146, n. 6, p. 2575-82, Jun 2005.

SAVINO, F. et al. Advances on human milk hormones and protection against obesity. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 59, n. 1, p. 89-98, 2013.

SAVINO, F. et al. Can hormones contained in mothers' milk account for the beneficial effect of breast-feeding on obesity in children? **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 71, n. 6, p. 757-65, Dec 2009.

SAVINO, F.; LIGUORI, S. A. Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin. **Clin Nutr**, v. 27, n. 1, p. 42-7, Feb 2008.

SAVINO, F. et al. High serum leptin levels in infancy can potentially predict obesity in childhood, especially in formula-fed infants. **Acta Paediatr**, v. 102, n. 10, p. e455-9, Oct 2013.

SAVINO, F. et al. Breast milk hormones and their protective effect on obesity. **Int J Pediatr Endocrinol**, v. 2009, p. 327505, 2009.

SAVINO, F. et al. Looking for a relation between serum leptin concentration and body composition parameters in healthy term infants in the first 6 months of life. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 46, n. 3, p. 348-51, Mar 2008.

SAVINO, F. et al. Breast milk hormones and regulation of glucose homeostasis. **Int J Pediatr**, v. 2011, p. 803985, 2011.

SAVINO, F. et al. Adiponectin in breast milk: relation to serum adiponectin concentration in lactating mothers and their infants. **Acta Paediatr**, v. 101, n. 10, p. 1058-62, Oct 2012.

SCHUELER, J. et al. Presence and dynamics of leptin, GLP-1, and PYY in human breast milk at early postpartum. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 7, p. 1451-8, Jul 2013.

SCHUSTER, S. et al. Leptin in maternal serum and breast milk: association with infants' body weight gain in a longitudinal study over 6 months of lactation. **Pediatr Res**, v. 70, n. 6, p. 633-7, Dec 2011.

SCHWARZ, E. B. et al. Duration of lactation and risk factors for maternal cardiovascular disease. **Obstet Gynecol**, v. 113, n. 5, p. 974-82, May 2009.

SHEHADEH, N.; SUKHOTNIK, I.; SHAMIR, R. Gastrointestinal tract as a target organ for orally administered insulin. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 43, n. 3, p. 276-81, Sep 2006.

SILVA, A. A. et al. Prevalence of non-communicable diseases in Brazilian children: follow-up at school age of two Brazilian birth cohorts of the 1990's. **BMC Public Health**, v. 11, p. 486, 2011.

SILVEIRA, P. P. et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, n. 6, p. 494-504, Nov-Dec 2007.

TEDESCO, R. P. et al. Estimation of preterm birth rate, associated factors and maternal morbidity from a demographic and health survey in Brazil. **Matern Child Health J**, v. 17, n. 9, p. 1638-47, Nov 2013.

UCAR, B. et al. Breast milk leptin concentrations in initial and terminal milk samples: relationships to maternal and infant plasma leptin concentrations, adiposity, serum glucose, insulin, lipid and lipoprotein levels. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 13, n. 2, p. 149-56, Feb 2000.

UYSAL, F. K. et al. Breast milk leptin: its relationship to maternal and infant adiposity. **Clin Nutr**, v. 21, n. 2, p. 157-60, Apr 2002.

VAHAMIKO, S.; ISOLAURI, E.; LAITINEN, K. Weight status and dietary intake determine serum leptin concentrations in pregnant and lactating women and their infants. **Br J Nutr**, v. 110, n. 6, p. 1098-106, Sep 28 2013.

VAHDANINIA, M.; TAVAFIAN, S. S.; MONTAZERI, A. Correlates of low birth weight in term pregnancies: a retrospective study from Iran. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 8, p. 12, 2008.

VEENING, M. A.; VAN WEISSENBRUCH, M. M.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Glucose tolerance, insulin sensitivity, and insulin secretion in children born small for gestational age. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 10, p. 4657-61, Oct 2002.

VELOSO, H. J. et al. Secular trends in the rate of low birth weight in Brazilian State Capitals in the period 1996 to 2010. **Cad Saude Publica**, v. 29, n. 1, p. 91-101, Jan 2013.

VERKAUSKIENE, R. et al. Impact of fetal growth restriction on body composition and hormonal status at birth in infants of small and appropriate weight for gestational age. **Eur J Endocrinol**, v. 157, n. 5, p. 605-12, Nov 2007.

VON FRANKENBERG, A. D. et al. Major components of metabolic syndrome and adiponectin levels: a cross-sectional study. **Diabetol Metab Syndr**, v. 6, n. 1, p. 26, 2014.

VUGUIN, P. M. et al. Shared effects of genetic and intrauterine and perinatal environment on the development of metabolic syndrome. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63021, 2013.

WALLACE, J. M. et al. Sensitivity to metabolic signals in late-gestation growth-restricted fetuses from rapidly growing adolescent sheep. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 5, p. E1233-41, Nov 2007.

WEYERMANN, M. et al. Adiponectin and leptin in maternal serum, cord blood, and breast milk. **Clin Chem**, v. 52, n. 11, p. 2095-102, Nov 2006.

WEYERMANN, M.; BRENNER, H.; ROTHENBACHER, D. Adipokines in human milk and risk of overweight in early childhood: a prospective cohort study. **Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 722-9, Nov 2007.

WHITEHOUSE, A. J. et al. Do hypertensive diseases of pregnancy disrupt neurocognitive development in offspring? **Paediatr Perinat Epidemiol**, v. 26, n. 2, p. 101-8, Mar 2012.

WHITMORE, T. J. et al. Analysis of insulin in human breast milk in mothers with type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Int J Endocrinol**, v. 2012, p. 296368, 2012.

WIDEROE, M. et al. Does maternal smoking during pregnancy cause childhood overweight? **Paediatr Perinat Epidemiol**, v. 17, n. 2, p. 171-9, Apr 2003.

WOO, J. G. et al. Human milk adiponectin is associated with infant growth in two independent cohorts. **Breastfeed Med**, v. 4, n. 2, p. 101-9, Jun 2009.

WOO, J. G. et al. Human milk adiponectin affects infant weight trajectory during the second year of life. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 54, n. 4, p. 532-9, Apr 2012.

WROTNIAK, B. H. et al. Gestational weight gain and risk of overweight in the offspring at age 7 y in a multicenter, multiethnic cohort study. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 6, p. 1818-24, Jun 2008.

XAVERIUS, P. et al. Very low birth weight and perinatal periods of risk: disparities in St. Louis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 547234, 2014.

XAVERIUS, P. K. et al. Predictors of size for gestational age in St. Louis City and County. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 515827, 2014.

YACH, D. The origins, development, effects, and future of the WHO Framework Convention on Tobacco Control: a personal perspective. **Lancet**, v. 383, n. 9930, p. 1771-9, May 17 2014.

YE, C. et al. The 2011 survey on hypertensive disorders of pregnancy (HDP) in China: prevalence, risk factors, complications, pregnancy and perinatal outcomes. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100180, 2014.

ZAMBONATO, A. M. et al. [Risk factors for small-for-gestational age births among infants in Brazil]. **Rev Saude Publica**, v. 38, n. 1, p. 24-9, Feb 2004.

ZANARDO, V. et al. Effect of maternal smoking on breast milk interleukin-1alpha, beta-endorphin, and leptin concentrations and leptin concentrations. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 10, p. 1410-3, Oct 2005.

ZHANG, J. et al. Defining normal and abnormal fetal growth: promises and challenges. **Am J Obstet Gynecol**, v. 202, n. 6, p. 522-8, Jun 2010.

## 11. ARTIGOS

### 11.1 Artigo submetido ao *European Journal of Nutrition*:

---

#### **EJON: Submission Confirmation for Influence of intrauterine environment on hormone patterns in breast milk: the IVAPSA cohort study**

1 mensagem

---

**Editorial Office (EJON)** <em@editorialmanager.com>

6 de fevereiro de 2015 15:08

Responder a: "Editorial Office (EJON)" <eurjnutr@gmail.com>

Para: Marina Nunes <marinanunesnutri@gmail.com>

Dear Dr Marina Nunes,

Your submission entitled "Influence of intrauterine environment on hormone patterns in breast milk: the IVAPSA cohort study" has been received by journal European Journal of Nutrition

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is <http://ejon.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,  
Springer Journals Editorial Office  
European Journal of Nutrition

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oafunding](http://www.springer.com/oafunding).

Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

**Title: Influence of intrauterine environment on hormone patterns in breast milk: the IVAPSA cohort study.**

**ABSTRACT**

**Purpose:** Breast milk (BM) can influence the pattern of somatic development throughout bioactive components. To evaluate the influence of different intrauterine environments on hormone concentrations in colostrum and mature BM and its relation to infant weight up to age 6 months.

**Methods:** Prospective controlled study of term mother–neonate pairs from Porto Alegre, Brazil. A convenience sample was recruited 24 to 48 h after birth and split across five groups according to maternal clinical background: diabetes (DM), hypertension (HTN), smoking (SMS), mothers of small-for-gestational-age (SGA) infants, and controls (CTL). Colostrum was collected at 24 h postpartum (PP), and mature milk, 1 month (1M) later. BM leptin (LEP), adiponectin (ADIPO), and insulin levels were measured by ELISA. Interviews were conducted at PP, 7 and 15 days, and 1, 3, and 6 months, and mother and infant weight and height measured at all-time points.

**Results:** Hormone levels decreased during milk maturation. In the SGA group, LEP and insulin levels exhibited the greatest reduction from colostrum ( $p=0.050$ ) to mature BM ( $p<0.01$ ), reaching the lowest LEP levels of the sample ( $p<0.05$ ). Birth weight from SGA infants was statistically different from that of all other groups. At age 3 months, the mean weight of SGA infants was similar to that of other groups, indicating early catch-up. LEP ( $r=-0.295$ ;  $p=0.03$ ) and insulin ( $r=0.262$ ;  $p=0.047$ ) levels at 1M were correlated with infant weight gain at 1M.

**Conclusions:** This study demonstrates that early changes in BM hormone levels are related to catch-up growth at 1 month of life in SGA newborns.

**Keywords:** Breast milk, leptin, insulin, adiponectin, SGA, infant weight.



## INTRODUCTION

Breast milk (BM) can influence the pattern of somatic development throughout bioactive components [1,2]. Leptin (LEP), adiponectin (ADIPO), and insulin play important roles in energy balance regulation, food intake, and body composition [3,2,4,5,1]. Hormone concentrations in BM vary widely. A correlation exists between hormone levels in various organs and tissues, including blood, umbilical cord, and milk [6,7]. The action of these hormones has been studied for their role in the regulation of energy homeostasis [8], reflecting on long-term child health [9]. BM composition can be influenced by maternal clinical background [10,11]. Relationships have been demonstrated between maternal body mass index (BMI) and BM hormone concentrations [12,11,13-16] and between maternal BMI and serum leptin concentrations in breastfed infants [17].

In mothers with diabetes, insulin concentrations in BM were described by Whitmore et al (30), who found no differences over 24 h or by type of diabetes. Breastfeeding quality can also be modified by smoking, which induces variations in the concentration of some cytokines in BM [18-20]; however, no such changes were observed for leptin or other hormones [18,21]. No studies have assessed the concentration of these hormones in the BM of hypertensive mothers.

Studies have also described changes in BM composition according to gestational age [22,14] and birth weight [23]. However, to our knowledge, no observational studies have sought to verify the influence of different intrauterine environments on BM hormone concentrations and their potential relationship with infant weight in early life. Therefore, the present investigation was designed to evaluate the impact of different intrauterine environments on hormone concentrations in BM and

whether these concentrations are associated with weight gain from birth to age 6 months.

## **SUBJECTS and METHODS**

This is a prospective controlled study of full-term singleton neonates and their mothers from Porto Alegre, Brazil. Mother–child pairs were recruited 24 to 48 h postpartum and followed until 6 months of age. The sample was split into five groups according to pregnancy outcome and maternal clinical background: (I) diabetes (DM) – type 1, type 2, or gestational; (II) hypertension (HTN) – chronic, pre-eclampsia, or eclampsia; (III) smoking (SMS) – mothers who smoked at any time during pregnancy; (IV) small for gestational age (SGA) – birth weight below 5th percentile [24]; and (V) control (CTL) – none of the above characteristics. Exclusion criteria for all groups were preterm delivery (< 37 gestational weeks), HIV-positive status, and neonates from twin gestations, presenting with malformations at birth, or requiring hospitalization.

Follow-up consisted of six waves: on the first day of life (PP), at 7 (7D) and 15 (15D) days, and at 1 (1M), 3 (3M), and 6 months (6M). During interviews, birth, prenatal, social, economic, family, and health data were investigated, using a structured questionnaire developed by the investigators. Anthropometric measurements were obtained and biological materials (BM and saliva containing oral cells) were collected. Additional information about the study protocol has been published elsewhere [25].

Weight and height (length for infants) were measured during all interviews. Maternal and child measurements were obtained using a portable stadiometer (AlturaExata<sup>®</sup>) and scale (Marte<sup>®</sup>). Infant weight data was imported into the Anthro 3.2.2 software (WHO) for calculation of z-scores according to age and based on the 2006 WHO growth standards.

BM samples were collected into sterile flasks by manual milking at PP and 1M and then fractionated into labeled 1.5-mL tubes for storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. LEP, ADIPO, and insulin were quantified in duplicate using commercially available ELISA kits (Millipore<sup>®</sup>), according to the manufacturer's instructions. Before analysis, milk samples were thawed and centrifuged at 15,000 rpm at  $4^{\circ}\text{C}$  to isolate fat, divided into three aliquots, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until hormone quantification.

Statistical analyses were performed in PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc.). Descriptive analyses were performed according to the parametric or nonparametric distribution of data, as identified by the Kolmogorov–Smirnov test. The chi-square test was used to verify sample homogeneity, as was the Kruskal–Wallis test for continuous data. The Wilcoxon test was used for paired nonparametric data (BM hormone concentrations), and difference between groups assessed by means of the Kruskal–Wallis test with the Games–Howell post-hoc test. Analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc test was used to compare maternal BMI between groups. Spearman coefficients were used to assess potential correlations between BM hormone levels and child weight gain. A significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) and 95% confidence intervals were considered. Catch-up was characterized by a difference of  $\geq 0.67$  in weight z-scores in relation to the birth weight [26].

The procedures followed were in accordance with the ethical standards of Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Ethics Committee with judgment number 11-0097 and by the Grupo Hospitalar Conceição Ethics Committee with judgment number 11-027. All participants gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study has been omitted.

## RESULTS

Overall, 74 mother–child pairs were distributed across the five groups (12 DM, 10 HTN, 19 SMS, 12 SGA, and 21 CTL). There were no significant differences in socioeconomic, maternal, or neonatal variables among the groups, as shown in Table 1. Mothers of SGA infants exhibited lower BMI values at all three time points of measurement.

LEP and insulin concentrations in BM from mothers of SGA infants declined significantly from PP to 1M ( $p=0.05$  and  $p<0.012$ ), leading to the lowest LEP concentration among all groups at 1M ( $p<0.01$ ). There was no difference in ADIPO concentration among groups during the period of analysis (Table 2). Catch-up growth was observed only in the SGA group, as shown in Figure 1. Both LEP and insulin correlated modestly with infant weight gain at 1M (Table 3).

## DISCUSSION

To the best of our knowledge, this was the first study to investigate the adipokine content of BM in mothers with different intrauterine environments. We were able to demonstrate that, at birth, BM hormones were similar in all groups and their concentrations decreased as colostrum transitioned to mature milk. This led to a rebound in postnatal child health at a crucial moment for development, which can have repercussions throughout the life course.

Lower pre-gestational BMI and caloric restriction during pregnancy have been associated with intrauterine growth restriction [27]. Furthermore, other studies have shown a negative correlation between maternal BMI and serum and BM hormone concentrations [13-16]. In our cohort, mothers of SGA infants exhibited lower BMI

values before pregnancy and 1 month after delivery than mothers in other groups; however, changes in hormone concentrations only were detected at 1M.

Changes in BM hormone composition vary widely [28,29]. In accordance with other studies [11,22,30], we detected a significant reduction in LEP and insulin levels during the first month of breastfeeding. A recent study showed frequency and duration of breastfeeding to correlate positively with protein concentration [31]; thus, we hypothesize that hormonal concentrations can also be influenced by the same external factors. Leptin levels in BM do not seem to change before or after suckling [32,1].

In this sample, we demonstrated correlations of LEP and insulin with weight gain at 1M, independently of socioeconomic covariates. Low exposure to LEP and insulin during the lactation period may be associated with infant weight, including higher fat mass [12,33,29,16]; just as higher insulin concentrations have been associated with lower infant weight and lean mass [12]. BM hormone signaling pathways are involved in the development of the child's gastrointestinal system [34,35] and can act in the arcuate nucleus of the hypothalamus, affecting satiety and appetite control [36,5] and thus influencing postnatal growth. Rapid weight gain in both infancy and early childhood is a risk factor for adult adiposity and obesity [37]. In addition, rapid infant weight gain has been associated with increased risk of being overweight at 4 years of age, independently of potential confounders [38] and other unfavorable outcomes [39-43]. Although early catch-up appears to be beneficial to the child, the Latin American SGA Consensus Guidelines recommend that children born SGA should not be allowed to gain weight too rapidly or excessively, in an effort to circumvent the development of metabolic disturbances [44]. Low circulating insulin concentrations may reduce glucose uptake into cells and allow higher amounts of circulating glucose, which can interfere

with glucose storage [45,46,39]. This hormonal derangement may have led SGA children to experience weight gain.

The strengths of our study are twofold: 1) the completeness of maternal and neonatal data collected; and 2) its comparison of the impact of different intrauterine environments on hormone concentrations in BM in a homogeneous sample and using the same methodology.

Some limitations also warrant mention. We did not control for time of collection of BM samples or for fasting status. Furthermore, BM samples at the PP time point were collected according to the availability of investigators and subjects that met the inclusion criteria.

In conclusion, our results suggest that significant changes occur in hormone concentrations in BM from mothers of SGA newborns after birth. These changes can lead to a peculiar metabolic pattern in infants and facilitate early catch-up growth.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank all the other researchers from the IVAPSA Cohort Study. We also thank the participant families for their time and patience.

**REFERENCES**

1. Schueler J, Alexander B, Hart AM, Austin K, Larson-Meyer DE (2013) Presence and dynamics of leptin, GLP-1, and PYY in human breast milk at early postpartum. *Obesity* 21 (7):1451-1458. doi:10.1002/oby.20345
2. Gupta M, Zaheer, Jora R, Kaul V, Gupta R (2010) Breast feeding and insulin levels in low birth weight neonates: a randomized study. *Indian journal of pediatrics* 77 (5):509-513. doi:10.1007/s12098-010-0065-6
3. Schuster S, Hechler C, Gebauer C, Kiess W, Kratzsch J (2011) Leptin in maternal serum and breast milk: association with infants' body weight gain in a longitudinal study over 6 months of lactation. *Pediatric research* 70 (6):633-637. doi:10.1203/PDR.0b013e31823214ea
4. Savino F, Benetti S, Liguori SA, Sorrenti M, Cordero Di Montezemolo L (2013) Advances on human milk hormones and protection against obesity. *Cellular and molecular biology* 59 (1):89-98
5. Savino F, Fissore MF, Liguori SA, Oggero R (2009) Can hormones contained in mothers' milk account for the beneficial effect of breast-feeding on obesity in children? *Clinical endocrinology* 71 (6):757-765. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03585.x
6. Weyermann M, Beermann C, Brenner H, Rothenbacher D (2006) Adiponectin and leptin in maternal serum, cord blood, and breast milk. *Clinical chemistry* 52 (11):2095-2102. doi:10.1373/clinchem.2006.071019
7. Dundar NO, Dundar B, Cesur G, Yilmaz N, Sutcu R, Ozguner F (2010) Ghrelin and adiponectin levels in colostrum, cord blood and maternal serum. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* 52 (4):622-625. doi:10.1111/j.1442-200X.2010.03100.x
8. Savino F, Liguori SA, Sorrenti M, Fissore MF, Oggero R (2011) Breast milk hormones and regulation of glucose homeostasis. *International journal of pediatrics* 2011:803985. doi:10.1155/2011/803985
9. Brunner S, Schmid D, Zang K, Much D, Knoeferl B, Kratzsch J, Amann-Gassner U, Bader BL, Hauner H (2014) Breast milk leptin and adiponectin in relation to infant body composition up to 2 years. *Pediatric obesity*. doi:10.1111/j.2047-6310.2014.222.x
10. Ley SH, O'Connor DL, Retnakaran R, Hamilton JK, Sermer M, Zinman B, Hanley AJ (2010) Impact of maternal metabolic abnormalities in pregnancy on human milk and

subsequent infant metabolic development: methodology and design. *BMC public health* 10:590. doi:10.1186/1471-2458-10-590

11. Ley SH, Hanley AJ, Sermer M, Zinman B, O'Connor DL (2012) Associations of prenatal metabolic abnormalities with insulin and adiponectin concentrations in human milk. *The American journal of clinical nutrition* 95 (4):867-874. doi:10.3945/ajcn.111.028431

12. Fields DA, Demerath EW (2012) Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF-alpha in human breast milk with infant growth and body composition. *Pediatric obesity* 7 (4):304-312. doi:10.1111/j.2047-6310.2012.00059.x

13. Butte NF, Hopkinson JM, Nicolson MA (1997) Leptin in human reproduction: serum leptin levels in pregnant and lactating women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82 (2):585-589. doi:10.1210/jcem.82.2.3731

14. Eilers E, Ziska T, Harder T, Plagemann A, Obladen M, Loui A (2011) Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants. *Early human development* 87 (6):415-419. doi:10.1016/j.earlhumdev.2011.03.004

15. Maple-Brown L, Ye C, Hanley AJ, Connelly PW, Sermer M, Zinman B, Retnakaran R (2012) Maternal pregravid weight is the primary determinant of serum leptin and its metabolic associations in pregnancy, irrespective of gestational glucose tolerance status. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97 (11):4148-4155. doi:10.1210/jc.2012-2290

16. Miralles O, Sanchez J, Palou A, Pico C (2006) A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. *Obesity* 14 (8):1371-1377. doi:10.1038/oby.2006.155

17. Savino F, Liguori SA, Oggero R, Silvestro L, Miniero R (2006) Maternal BMI and serum leptin concentration of infants in the first year of life. *Acta paediatrica* 95 (4):414-418. doi:10.1080/08035250500440428

18. Zanardo V, Nicolussi S, Cavallin S, Trevisanuto D, Barbato A, Faggian D, Favaro F, Plebani M (2005) Effect of maternal smoking on breast milk interleukin-1alpha, beta-endorphin, and leptin concentrations and leptin concentrations. *Environmental health perspectives* 113 (10):1410-1413

19. Etem Piskin I, Nur Karavar H, Arasli M, Ermis B (2012) Effect of maternal smoking on colostrum and breast milk cytokines. *European cytokine network* 23 (4):187-190. doi:10.1684/ecn.2013.0324



20. Szlagatys-Sidorkiewicz A, Wos E, Aleksandrowicz E, Luczak G, Zagierski M, Martysiak-Zurowska D, Marek K, Kaminska B (2013) Cytokine profile of mature milk from smoking and nonsmoking mothers. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 56 (4):382-384. doi:10.1097/MPG.0b013e318275f95c
21. Ozkan B, Ermis B, Tastekin A, Doneray H, Yildirim A, Ors R (2005) Effect of smoking on neonatal and maternal serum and breast milk leptin levels. *Endocrine research* 31 (3):177-183
22. Bielicki J, Huch R, von Mandach U (2004) Time-course of leptin levels in term and preterm human milk. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 151 (2):271-276
23. Dundar NO, Anal O, Dundar B, Ozkan H, Caliskan S, Buyukgebiz A (2005) Longitudinal investigation of the relationship between breast milk leptin levels and growth in breast-fed infants. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 18 (2):181-187
24. GREG R. ALEXANDER, JOHN H. HIMES, RAJNI B. KAUFMAN, JOANNE MOR, KOGAN M (1996) A United States National Reference for Fetal Growth. *Obstetric Gynecology* 87 (2)
25. Bernardi JR, Ferreira CF, Nunes M, da Silva CH, Bosa VL, Silveira PP, Goldani MZ (2012) Impact of Perinatal Different Intrauterine Environments on Child Growth and Development in the First Six Months of Life--IVAPSA Birth Cohort: rationale, design, and methods. *BMC pregnancy and childbirth* 12:25. doi:10.1186/1471-2393-12-25
26. Ong KK, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB (2000) Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *Bmj* 320 (7240):967-971
27. Vahdaninia M, Tavafian SS, Montazeri A (2008) Correlates of low birth weight in term pregnancies: a retrospective study from Iran. *BMC pregnancy and childbirth* 8:12. doi:10.1186/1471-2393-8-12
28. Ozarda Y, Gunes Y, Tuncer GO (2012) The concentration of adiponectin in breast milk is related to maternal hormonal and inflammatory status during 6 months of lactation. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 50 (5):911-917. doi:10.1515/cclm-2011-0724

29. Doneray H, Orbak Z, Yildiz L (2009) The relationship between breast milk leptin and neonatal weight gain. *Acta paediatrica* 98 (4):643-647. doi:10.1111/j.1651-2227.2008.01192.x
30. Ilcol YO, Hizli ZB, Ozkan T (2006) Leptin concentration in breast milk and its relationship to duration of lactation and hormonal status. *International breastfeeding journal* 1:21. doi:10.1186/1746-4358-1-21
31. Khan S, Hepworth AR, Prime DK, Lai CT, Trengove NJ, Hartmann PE (2013) Variation in fat, lactose, and protein composition in breast milk over 24 hours: associations with infant feeding patterns. *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association* 29 (1):81-89. doi:10.1177/0890334412448841
32. Ucar B, Kirel B, Bor O, Kilic FS, Dogruel N, Aydogdu SD, Tekin N (2000) Breast milk leptin concentrations in initial and terminal milk samples: relationships to maternal and infant plasma leptin concentrations, adiposity, serum glucose, insulin, lipid and lipoprotein levels. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 13 (2):149-156
33. Pico C, Oliver P, Sanchez J, Miralles O, Caimari A, Priego T, Palou A (2007) The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *International journal of obesity* 31 (8):1199-1209. doi:10.1038/sj.ijo.0803585
34. Attig L, Brisard D, Larcher T, Mickiewicz M, Guilloteau P, Boukthir S, Niamba CN, Gertler A, Djiane J, Monniaux D, Abdennebi-Najar L (2013) Postnatal leptin promotes organ maturation and development in IUGR piglets. *PloS one* 8 (5):e64616. doi:10.1371/journal.pone.0064616
35. Shehadeh N, Sukhotnik I, Shamir R (2006) Gastrointestinal tract as a target organ for orally administered insulin. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 43 (3):276-281. doi:10.1097/01.mpg.0000226377.03247.fb
36. de Graaf C, Blom WA, Smeets PA, Stafleu A, Hendriks HF (2004) Biomarkers of satiation and satiety. *The American journal of clinical nutrition* 79 (6):946-961
37. Ekelund U, Ong K, Linne Y, Neovius M, Brage S, Dunger DB, Wareham NJ, Rossner S (2006) Upward weight percentile crossing in infancy and early childhood independently predicts fat mass in young adults: the Stockholm Weight Development Study (SWEDES). *The American journal of clinical nutrition* 83 (2):324-330
38. Dennison BA, Edmunds LS, Stratton HH, Pruzek RM (2006) Rapid infant weight gain predicts childhood overweight. *Obesity* 14 (3):491-499. doi:10.1038/oby.2006.64

39. Putzker S, Bechtold-Dalla Pozza S, Kugler K, Schwarz HP, Bonfig W (2014) Insulin resistance in young adults born small for gestational age (SGA). *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 27 (3-4):253-259. doi:10.1515/jpem-2013-0292
40. Coupe B, Grit I, Hulin P, Randuineau G, Parnet P (2012) Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis. *PloS one* 7 (1):e30616. doi:10.1371/journal.pone.0030616
41. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C (2002) Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *International journal of epidemiology* 31 (6):1235-1239
42. Ong KK, Preece MA, Emmett PM, Ahmed ML, Dunger DB, Team AS (2002) Size at birth and early childhood growth in relation to maternal smoking, parity and infant breast-feeding: longitudinal birth cohort study and analysis. *Pediatric research* 52 (6):863-867. doi:10.1203/00006450-200212000-00009
43. Kaijser M, Bonamy AK, Akre O, Cnattingius S, Granath F, Norman M, Ekblom A (2009) Perinatal risk factors for diabetes in later life. *Diabetes* 58 (3):523-526. doi:10.2337/db08-0558
44. Boguszewski MC, Mericq V, Bergada I, Damiani D, Belgorosky A, Gunczler P, Ortiz T, Llano M, Domene HM, Calzada-Leon R, Blanco A, Barrientos M, Procel P, Lanes R, Jaramillo O (2011) Latin American consensus: children born small for gestational age. *BMC pediatrics* 11:66. doi:10.1186/1471-2431-11-66
45. Limesand SW, Rozance PJ, Smith D, Hay WW, Jr. (2007) Increased insulin sensitivity and maintenance of glucose utilization rates in fetal sheep with placental insufficiency and intrauterine growth restriction. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 293 (6):E1716-1725. doi:10.1152/ajpendo.00459.2007
46. Wallace JM, Milne JS, Aitken RP, Hay WW, Jr. (2007) Sensitivity to metabolic signals in late-gestation growth-restricted fetuses from rapidly growing adolescent sheep. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 293 (5):E1233-1241. doi:10.1152/ajpendo.00294.2007

**Table 1.** Socioeconomic characteristic, birth-related variables and maternal BMI in each group. IVAPSA Cohort, Porto Alegre, Brazil, 2014.

	<b>DM</b>	<b>HTN</b>	<b>SMS</b>	<b>SGA</b>	<b>CTL</b>	<b>p</b>
	<b>(12)</b>	<b>(10)</b>	<b>(19)</b>	<b>(12)</b>	<b>(21)</b>	
<b>Skin color, n (%)</b>						0.258
White	6 (50.0)	7 (70.0)	11 (57.9)	3 (25.0)	12 (57.1)	
<b>Marital status, n (%)</b>						0.851
With partner	11 (91.7)	8 (80.0)	16 (84.2)	10 (83.3)	16 (76.2)	
<b>Educational attainment, n (%)</b>						0.276
≤ 8 years	2 (16.7)	4 (40.0)	8 (44.4)	4 (33.3)	10 (52.6)	
9–11 years	10 (83.3)	5 (50.0)	8 (44.4)	8 (66.7)	9 (47.4)	
≥ 12 years	0 (0)	1 (10.0)	2 (11.1)	0 (0)	0 (0)	
<b>Socioeconomic class, n (%)*</b>						0.373
B	2 (18.2)	5 (50.0)	4 (21.1)	3 (25.0)	7 (33.3)	
C	9 (81.8)	4 (40.0)	14 (73.7)	7 (58.3)	10 (47.6)	
D	0 (0)	1 (10.0)	1 (5.3)	2 (16.7)	4 (19.0)	
<b>Age, years (SD)</b>	26.64 (5.75)	29.11 (9.02)	26.28 (5.96)	22.48 (5.42)	27.54 (7.49)	0.170
<b>Mode of delivery, n (%)</b>						0.054
Cesarean	5 (41.7)	7 (70.0)	5 (26.3)	2 (16.7)	5 (23.8)	
<b>Infant sex, n (%)</b>						0.615

Female	9 (75.0)	6 (60.0)	10 (52.6)	6 (50.0)	10 (47.6)	
<b>Apgar, 5-min (SD)</b>	9.42 (0.51)	9.5 (0.53)	9.72 (0.46)	9.67 (0.49)	9.52 (0.68)	0.529
<b>Maternal BMI (SD)</b>						
<b>Pre-gestational</b>	27.38 (5.72)**	26.58 (3.59)	23.90 (4.83)	21.09 (3.46)**	25.07 (5.73)	0.026
<b>At delivery</b>	31.86 (6.14)**	32.80 (3.72)**	30.24 (5.30)**	24.66 (2.77)**	30.95 (5.05)**	0.001
<b>1 month postpartum</b>	28.26 (6.42)	30.47 (2.79)**	26.62 (4.61)	22.32 (2.30)**	29.70 (5.57)**	0.006

There were no statistically significant differences across groups in socioeconomic characteristics or birth-related variables ( $p > 0.05$  for chi-square test [categorical data] and Kruskal–Wallis test [continuous data]). \*Socioeconomic class assigned as per the Brazilian Economic Classification Criterion. \*\*Maternal BMI data:  $p < 0.05$  (ANOVA with Tukey’s post-hoc). DM: Diabetes Mellitus; HTN: Hypertension; SMS: Smoking; SGA: Small for gestational age; CTL: Control

**Table 2.** Leptin, adiponectin, and insulin concentrations in colostrum (PP) and mature breast milk (1M) in each group. IVAPSA Cohort, Porto Alegre, Brazil, 2014

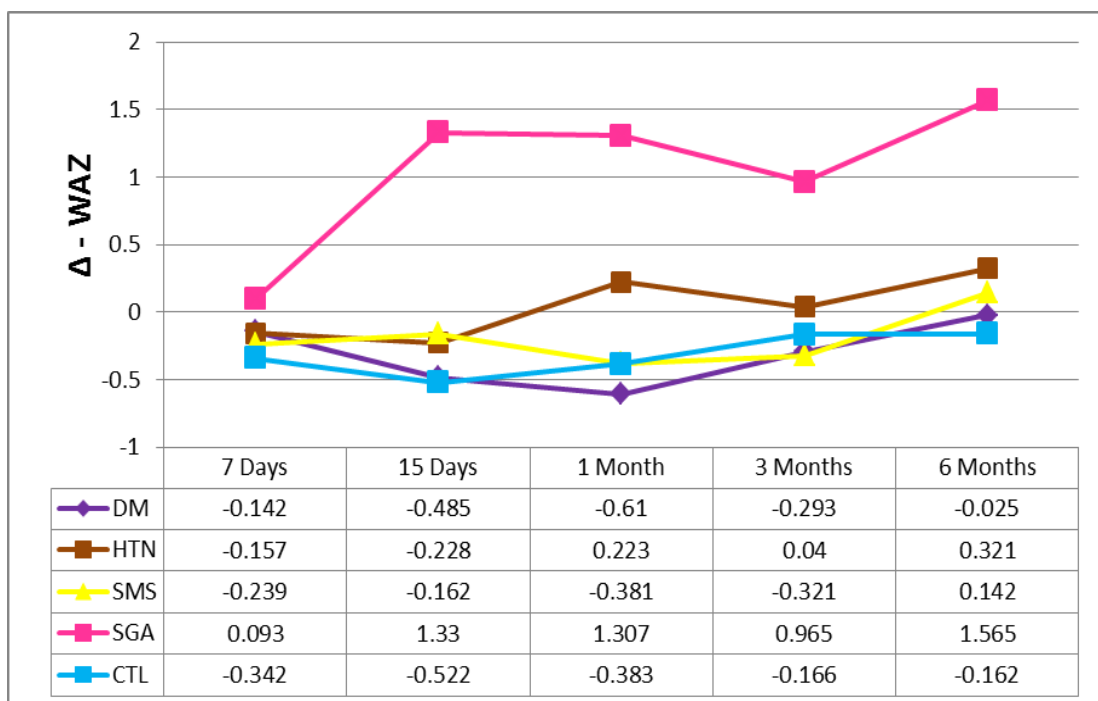
	<b>DM</b>	<b>HTN</b>	<b>SMS</b>	<b>SGA</b>	<b>CTL</b>	<b>P</b>
	Median (n)	Median (n)	Median (n)	Median (n)	Median (n)	
<b>Leptin, PP</b> (ng/mL)	0.668 (7)	0.603 (7)	0.599 (15)	0.641 (10)	0.813 (17)	0.715
<b>Leptin, 1M</b> (ng/mL)	0.460 (7)	0.503 (7)	0.544 (15)	0.377 (10)***	0.715 (16)***	0.026**
<b>p</b>	1.000	0.465	0.753	0.050*	0.234	
<b>Adiponectin, PP</b> (ng/mL)	10.230 (7)	18.260 (7)	13.110 (17)	14.370 (10)	8.790 (18)	0.105
<b>Adiponectin, 1M</b> (ng/mL)	12.430 (7)	14.710 (7)	10.190 (17)	9.990 (10)	9.870 (17)	0.754
<b>P</b>	0.109	0.465	0.112	0.123	0.959	
<b>Insulin, PP</b> (μU/mL)	49.370 (7)	58.580 (7)	46.300 (17)	60.485 (10)	55.035 (18)	1.000
<b>Insulin, 1M</b> (μU/mL)	22.830 (7)	25.620 (7)	22.800 (17)	16.665 (10)	22.030 (18)	0.330
<b>P</b>	0.273	0.144	0.084	0.012*	0.041*	

\*p<0.05, Wilcoxon test for paired data; \*\*p<0.05, Kruskal–Wallis test between groups; \*\*\*p=0.045, Games–Howell post-hoc test. DM: Diabetes Mellitus; HTN: Hypertension; SMS: Smoking; SGA: Small for gestational age; CTL: Control

**Table 3.** Correlation of breast milk hormone concentrations with infant weight gain. IVAPSA Cohort, Porto Alegre, Brazil, 2014.

	n	Correlation coefficient	p
<b>Weight gain at 1 month</b>			
Leptin, PP	47	0.012	0.936
Leptin, 1M	54	-0.295	0.030*
Adiponectin, PP	50	-0.100	0.488
Adiponectin, 1M	57	-0.192	0.153
Insulin, PP	49	-0.091	0.534
Insulin, 1M	58	0.262	0.047*

\*p<0.05, Spearman's test. PP: colostrum; 1M: mature breast milk.

**Fig 1** Differences in Weight-for-Age Z-scores in relation to birth weight in each group. IVAPSA Cohort, Porto Alegre, Brazil, 2014

## **11.2 Breast milk Leptin, Adiponectin and Insulin of Diabetics, Hypertensive, Smokers and mothers of SGA child – IVAPSA cohort**

**Background:** Breast milk is known to contain many bioactive hormones and peptides which could be influenced by maternal Body Mass Index (BMI).

**Objective:** To evaluate the influence of different intrauterine environments on hormones concentration in colostrum and mature breast milk and its relation to maternal BMI.

**Design:** Prospective controlled study of term mother–neonate pairs from Porto Alegre, Brazil. A convenience sample was recruited 24 to 48 h after birth and split across five groups according to maternal clinical background: diabetes (DM), hypertension (HTN), smoking (SMS), mothers of small-for-gestational-age (SGA) infants, and controls (CTL). Colostrum was collected at 24 h postpartum (PP), and mature milk, 1 month (1M) later. BM leptin (LEP), adiponectin (ADIPO), and insulin levels were measured by ELISA. Interviews were conducted at PP, 7 and 15 days, and 1, 3, and 6 months, and mother and infant weight and height measured at all-time points.

**Results:** Hormone levels decreased during milk maturation. In the SGA group, LEP and insulin levels exhibited the greatest reduction from colostrum ( $p=0.050$ ) to mature BM ( $p<0.01$ ), reaching the lowest LEP levels of the sample ( $p<0.05$ ). SGA had low BMI means values in all measurements reflecting in lower LEP and Insulin concentration. Maternal BMI was correlated to LEP and insulin but no with ADIPO.

**Conclusions:** This study demonstrates early changes in breast milk concentration related to maternal BMI.

**Key words:** Breast milk, leptin, insulin, adiponectin, SGA, cohort, maternal BMI.



### ***Introduction***

Breast milk (BM) contains bioactive components that act as mainly biological role to newborn like Leptin (LEP), Adiponectin (ADIPO) and Insulin. These hormones play important roles in energy balance regulation, food intake, and child body composition [1-3]. LEP can be found in human placenta, umbilical cord and in mammary cells [4-6]. ADIPO acts on glucose and lipids metabolism improving insulin sensitization and fatty acids oxidation beyond inhibit hepatic glucose production [7, 8]. Insulin is enable up taking glucose for several tissues after food intake [9]. It seems to interfere on enteral hormones to slowing gastric emptying and promoting satiety sensation [10].

They are proportionally influenced by the body fat depots. ADIPO is down-regulated in obesity resulting in less circulating amounts [11]. It stimulates the food intake and decreases the energy expenditure, an inverse action of LEP and Insulin. BM composition can be influenced by maternal clinical background [12, 13]. Relationships have been demonstrated between maternal body mass index (BMI) and BM hormone concentrations [13-18] and between maternal BMI and serum leptin concentrations in breastfed infants [19].

In mothers with diabetes, insulin concentrations in BM were described by Whitmore et al [20], who found no differences over 24 h or by type of diabetes. Breastfeeding quality can also be modified by smoking, which induces variations in the concentration of some cytokines in BM [21-23]; however, no such changes were observed for leptin or other hormones [21, 24]. No studies have assessed the concentration of these hormones in the BM of hypertensive mothers. Thus, we aimed to evaluate the influence of different intrauterine environments on BM hormones concentration and the relations with maternal BMI.

### ***Methods***

This is a prospective study of full-term singleton neonates and their mothers from Porto Alegre, Brazil. Mother–child pairs were recruited 24 to 48 h postpartum and followed until 6 months of age. The sample was split into five groups according to pregnancy outcome and maternal clinical background: (I) diabetes (DM) – type 1, type 2, or gestational; (II) hypertension (HTN) – chronic, pre-eclampsia, or eclampsia; (III) smoking (SMS) – mothers who smoked at any time during pregnancy; (IV) small for gestational age (SGA) – birth weight below 5th percentile [25]; and (V) control (CTL) – none of the above characteristics. Exclusion criteria for all groups were preterm delivery (< 37 gestational weeks), HIV-positive status, and neonates from twin gestations, presenting with malformations at birth, or requiring hospitalization.

Follow-up consisted of six waves: on the first day of life (PP), at 7 (7D) and 15 (15D) days, and at 1 (1M), 3 (3M), and 6 months (6M). During interviews, birth, prenatal, social, economic, family, and health data were investigated, using a structured questionnaire developed by the investigators. Anthropometric measurements were obtained and biological materials (BM and saliva containing oral cells) were collected. Additional information about the study protocol has been published elsewhere [26].

Maternal measurements (weight and height) were obtained using a portable scale (Marte<sup>®</sup>) and stadiometer (AlturaExata<sup>®</sup>). BMI was calculated using formula:  $\text{Weight} / \text{Height}^2$  (Kg/m<sup>2</sup>) and classified by IOM, 2009 [27].

BM samples were collected into sterile flasks by manual milking at PP and 1M and then fractionated into labeled 1.5-mL tubes for storage at -80°C until analysis. LEP, ADIPO, and insulin were quantified in duplicate using commercially available ELISA kits (Millipore<sup>®</sup>), according to the manufacturer's instructions. Before analysis, milk

samples were thawed and centrifuged at 15,000 rpm at 4°C to isolate fat, divided into three aliquots, and stored at -20°C until hormone quantification.

### ***Ethics***

The procedures followed were in accordance with the ethical standards of Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Ethics Committee with judgment number 11-0097 and by the Grupo Hospitalar Conceição Ethics Committee with judgment number 11-027. All participants gave written informed consent.

### ***Statistics***

Statistical analyses were performed in PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc.). Descriptive analyses were performed according to the parametric or nonparametric distribution of data, as identified by the Kolmogorov–Smirnov test. The chi-square test was used to verify sample homogeneity, as was the Kruskal–Wallis test for continuous data. The Wilcoxon test was used for paired nonparametric data (BM hormone concentrations), and difference between groups assessed by means of the Kruskal–Wallis test with the Games–Howell post-hoc test. Analysis of variance (ANOVA) with Tukey’s post-hoc test was used to compare maternal BMI between groups. Spearman coefficients were used to assess potential correlations between BM hormone levels and maternal BMI. A significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) and 95% confidence intervals were considered.

### ***Results***

Overall, 74 mother–child pairs were distributed across the five groups (12 DM, 10 HTN, 19 SMS, 12 SGA, and 21 CTL). There were no significant differences in

socioeconomic or birth variables among the groups, as shown in **Table 1**. All mothers from DM group were gestational diabetes diagnosed and were treated only with diet. From HTN group, 2 had chronic hypertension, 3 pre-eclampsia and 5 gestational hypertension. Mothers of SGA infants exhibited lower BMI values at all three time points of measurement.

LEP and insulin concentrations in BM from mothers of SGA infants declined significantly from PP to 1M ( $p=0.05$  and  $p<0.012$ ), leading to the lowest LEP concentration among all groups at 1M ( $p<0.01$ ). There was no difference in ADIPO concentration among groups during the period of analysis (Table 2). Gestational weight gain was different among groups ( $p=0.027$ ) shown in Table 3. Considering maternal BMI, SGA mothers presented lower values at all measurements (Table 4). ADIPO had no correlation with maternal BMI while LEP and insulin had it (Table 5).

### *Discussion*

To the best of our knowledge, this was the first study to investigate the adipokine content of BM in mothers with different intrauterine environments. We were able to demonstrate that, at birth, BM hormones were similar in all groups and their concentrations decreased as colostrum transitioned to mature milk. SGA has lower BMI mean ever reflecting on post natal hormones concentration, especially in LEP and Insulin.

Some studies have shown correlation between maternal BMI and serum concentration and BM milk satiety hormones [15-18]. This serum hormones concentration increases with weight gain during gestation and decreases post-partum [15, 28]. About breast milk, these hormone concentrations varies greater and always are correlated with maternal BMI, excepted when described by Uysal, et al [29]. We note,

as another studies, hormones concentration decreases over breastfeeding [13, 16, 30, 31], different from Doneray, et al [32], and could be detected up to 1 year [33]. In our cohort, mothers of SGA infants exhibited lower BMI values before pregnancy and 1 month after delivery than mothers in other groups; however, changes in hormone concentrations only were detected at 1M. As well in this group, mothers gained weight at or below the appropriate threshold at 37-40 gestational ages [34] could had cause marked decline in SGA group.

Changes in BM hormone composition vary widely [32, 35]. In accordance with other studies [13, 30, 36], we detected a significant reduction in LEP and insulin levels during the first month of breastfeeding. A recent study showed frequency and duration of breastfeeding to correlate positively with protein concentration [37]; thus, we hypothesize that hormonal concentrations can also be influenced by the same external factors. Leptin levels in BM do not seem to change before or after suckling [1, 38].

Thus, maternal BMI which is determined also by gestational weight gain is relevant because they had correlation with BM hormone concentration. Low weight acquired during pregnancy makes to woman reduces more weight after delivery, and, consequently, could affect BM hormones. Thereby, our findings reaffirm the theory that adverse intrauterine environment could generate postnatal consequences, including affecting BM hormone quality.

### ***Strengths and limitations***

The strengths of our study are twofold: 1) the completeness of maternal and neonatal data collected; and 2) its comparison of the impact of different intrauterine environments on hormone concentrations in BM in a homogeneous sample and using the same methodology.

Some limitations also warrant mention. We did not control for time of collection of BM samples or for fasting status. Furthermore, BM samples at the PP time point were collected according to the availability of investigators and subjects that met the inclusion criteria.

In conclusion, our results suggest significant changes occur in hormone concentrations in BM from mothers of SGA newborns after birth. Maternal BMI is related to these changes.

### **References**

1. Schueler J, Alexander B, Hart AM, Austin K, Larson-Meyer DE: Presence and dynamics of leptin, GLP-1, and PYY in human breast milk at early postpartum. *Obesity (Silver Spring)* 2013, 21:1451-1458.
2. Gupta M, Zaheer, Jora R, Kaul V, Gupta R: Breast feeding and insulin levels in low birth weight neonates: a randomized study. *Indian J Pediatr* 2010, 77:509-513.
3. Schuster S, Hechler C, Gebauer C, Kiess W, Kratzsch J: Leptin in maternal serum and breast milk: association with infants' body weight gain in a longitudinal study over 6 months of lactation. *Pediatr Res* 2011, 70:633-637.
4. Jaquet D, Leger J, Levy-Marchal C, Oury JF, Czernichow P: Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:1243-1246.
5. Weyermann M, Beermann C, Brenner H, Rothenbacher D: Adiponectin and leptin in maternal serum, cord blood, and breast milk. *Clin Chem* 2006, 52:2095-2102.
6. Dundar NO, Dundar B, Cesur G, Yilmaz N, Sutcu R, Ozguner F: Ghrelin and adiponectin levels in colostrum, cord blood and maternal serum. *Pediatr Int* 2010, 52:622-625.
7. Newburg DS, Woo JG, Morrow AL: Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. *J Pediatr* 2010, 156:S41-46.
8. Bronsky J, Karpisek M, Bronska E, Pechova M, Jancikova B, Kotolova H, Stejskal D, Prusa R, Nevoral J: Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: proteins newly identified in human breast milk. *Clin Chem* 2006, 52:1763-1770.
9. de Graaf C, Blom WA, Smeets PA, Stafleu A, Hendriks HF: Biomarkers of satiation and satiety. *Am J Clin Nutr* 2004, 79:946-961.
10. Shehadeh N, Sukhotnik I, Shamir R: Gastrointestinal tract as a target organ for orally administered insulin. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006, 43:276-281.
11. Klunder-Klunder M, Flores-Huerta S, Garcia-Macedo R, Peralta-Romero J, Cruz M: Adiponectin in eutrophic and obese children as a biomarker to predict metabolic syndrome and each of its components. *BMC Public Health* 2013, 13:88.
12. Ley SH, O'Connor DL, Retnakaran R, Hamilton JK, Sermer M, Zinman B, Hanley AJ: Impact of maternal metabolic abnormalities in pregnancy on human milk

and subsequent infant metabolic development: methodology and design. *BMC Public Health* 2010, 10:590.

13. Ley SH, Hanley AJ, Sermer M, Zinman B, O'Connor DL: Associations of prenatal metabolic abnormalities with insulin and adiponectin concentrations in human milk. *Am J Clin Nutr* 2012, 95:867-874.
14. Fields DA, Demerath EW: Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF-alpha in human breast milk with infant growth and body composition. *Pediatr Obes* 2012, 7:304-312.
15. Butte NF, Hopkinson JM, Nicolson MA: Leptin in human reproduction: serum leptin levels in pregnant and lactating women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82:585-589.
16. Eilers E, Ziska T, Harder T, Plagemann A, Obladen M, Loui A: Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants. *Early Hum Dev* 2011, 87:415-419.
17. Maple-Brown L, Ye C, Hanley AJ, Connelly PW, Sermer M, Zinman B, Retnakaran R: Maternal pregravid weight is the primary determinant of serum leptin and its metabolic associations in pregnancy, irrespective of gestational glucose tolerance status. *J Clin Endocrinol Metab* 2012, 97:4148-4155.
18. Miralles O, Sanchez J, Palou A, Pico C: A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. *Obesity (Silver Spring)* 2006, 14:1371-1377.
19. Savino F, Liguori SA, Oggero R, Silvestro L, Miniero R: Maternal BMI and serum leptin concentration of infants in the first year of life. *Acta Paediatr* 2006, 95:414-418.
20. Whitmore TJ, Trengove NJ, Graham DF, Hartmann PE: Analysis of insulin in human breast milk in mothers with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Int J Endocrinol* 2012, 2012:296368.
21. Zanardo V, Nicolussi S, Cavallin S, Trevisanuto D, Barbato A, Faggian D, Favaro F, Plebani M: Effect of maternal smoking on breast milk interleukin-1alpha, beta-endorphin, and leptin concentrations and leptin concentrations. *Environ Health Perspect* 2005, 113:1410-1413.
22. Etem Piskin I, Nur Karavar H, Arasli M, Ermis B: Effect of maternal smoking on colostrum and breast milk cytokines. *Eur Cytokine Netw* 2012, 23:187-190.



23. Szlagatys-Sidorkiewicz A, Wos E, Aleksandrowicz E, Luczak G, Zagierski M, Martysiak-Zurowska D, Marek K, Kaminska B: Cytokine profile of mature milk from smoking and nonsmoking mothers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013, 56:382-384.
24. Ozkan B, Ermis B, Tastekin A, Doneray H, Yildirim A, Ors R: Effect of smoking on neonatal and maternal serum and breast milk leptin levels. *Endocr Res* 2005, 31:177-183.
25. Greg R. ALEXANDER, John H. HIMES, Rajni B. KAUFMAN, Joanne MOR, KOGAN M: A United States National Reference for Fetal Growth. *Obstetric Gynecology* 1996, 87.
26. Bernardi JR, Ferreira CF, Nunes M, da Silva CH, Bosa VL, Silveira PP, Goldani MZ: Impact of Perinatal Different Intrauterine Environments on Child Growth and Development in the First Six Months of Life--IVAPSA Birth Cohort: rationale, design, and methods. *BMC Pregnancy Childbirth* 2012, 12:25.
27. In *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines*. Edited by Rasmussen KM, Yaktine AL. Washington (DC)2009: *The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health*].
28. Vahamiko S, Isolauri E, Laitinen K: Weight status and dietary intake determine serum leptin concentrations in pregnant and lactating women and their infants. *Br J Nutr* 2013, 110:1098-1106.
29. Uysal FK, Onal EE, Aral YZ, Adam B, Dilmen U, Ardicolu Y: Breast milk leptin: its relationship to maternal and infant adiposity. *Clin Nutr* 2002, 21:157-160.
30. Ilcol YO, Hizli ZB, Ozkan T: Leptin concentration in breast milk and its relationship to duration of lactation and hormonal status. *Int Breastfeed J* 2006, 1:21.
31. Martin LJ, Woo JG, Geraghty SR, Altaye M, Davidson BS, Banach W, Dolan LM, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL: Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. *Am J Clin Nutr* 2006, 83:1106-1111.
32. Doneray H, Orbak Z, Yildiz L: The relationship between breast milk leptin and neonatal weight gain. *Acta Paediatr* 2009, 98:643-647.
33. Bronsky J, Mitrova K, Karpisek M, Mazoch J, Durilova M, Fisarkova B, Stechova K, Prusa R, Nevoral J: Adiponectin, AFABP, and leptin in human breast milk during 12 months of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011, 52:474-477.
34. Atalah E, Castillo C, Castro R, Aldea A: [Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women]. *Rev Med Chil* 1997, 125:1429-1436.

35. Ozarda Y, Gunes Y, Tuncer GO: The concentration of adiponectin in breast milk is related to maternal hormonal and inflammatory status during 6 months of lactation. *Clin Chem Lab Med* 2012, 50:911-917.
36. Bielicki J, Huch R, von Mandach U: Time-course of leptin levels in term and preterm human milk. *Eur J Endocrinol* 2004, 151:271-276.
37. Khan S, Hepworth AR, Prime DK, Lai CT, Trengove NJ, Hartmann PE: Variation in fat, lactose, and protein composition in breast milk over 24 hours: associations with infant feeding patterns. *J Hum Lact* 2013, 29:81-89.
38. Ucar B, Kirel B, Bor O, Kilic FS, Dogruel N, Aydogdu SD, Tekin N: Breast milk leptin concentrations in initial and terminal milk samples: relationships to maternal and infant plasma leptin concentrations, adiposity, serum glucose, insulin, lipid and lipoprotein levels. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000, 13:149-156.

**Table 1.** Socioeconomic characteristic, prenatal and birth data according to groups. IVAPSA Cohort, Porto Alegre, Brazil, 2015.

	<b>DM</b>	<b>HTN</b>	<b>SMS</b>	<b>SGA</b>	<b>CTL</b>
	<b>(12)</b>	<b>(10)</b>	<b>(19)</b>	<b>(12)</b>	<b>(21)</b>
<b>Race, n (%)</b>					
White	6 (50.0)	7 (70.0)	11 (57.9)	3 (25.0)	12 (57.1)
<b>Marital situation, n (%)</b>					
With a partner	11 (91.7)	8 (80.0)	16 (84.2)	10 (83.3)	16 (76.2)
<b>Level Education, n (%)</b>					
≤ 8 years	2 (16.7)	4 (40.0)	8 (44.4)	4 (33.3)	10 (52.6)
9 < 11 years	10 (83.3)	6 (60.0)	10 (65.6)	8 (66.7)	9 (47.4)
<b>Brazilian Social Class, n (%)</b>					
B	2 (18.2)	5 (50.0)	4 (21.1)	3 (25.0)	7 (33.3)
C	9 (81.8)	4 (40.0)	14 (73.7)	7 (58.3)	10 (47.6)
D	0 (0)	1 (10.0)	1 (5.3)	2 (16.7)	4 (19.0)
<b>Age, x±SD</b>	26.64 (5.75)	29.11 (9.02)	26.28 (5.96)	22.48 (5.42)	27.54 (7.49)
<b>Pre-pregnancy BMI, n (%)</b>					
Low BMI (<18.5Kg/m <sup>2</sup> )	0 (0)	0 (0)	2 (11.1)	2 (18.2)	0 (0)
Adequate (≥18.5 ≤ 24.9 Kg/m <sup>2</sup> )	4 (36.4)	3 (30.0)	10 (55.6)	8 (72.7)	10 (58.8)
Overweight (>24.9 ≤ 29.9 Kg/m <sup>2</sup> )	4 (36.4)	5 (50.0)	3 (16.7)	1 (9.1)	6 (35.3)
Obesity (>29.9 Kg/m <sup>2</sup> )	3 (27.3)	2 (20.0)	3 (16.7)	0 (0)	1 (5.9)
<b>Mode of delivery, n (%)</b>					
Vaginal	7 (58.3)	3 (30.0)	14 (73.7)	10 (83.3)	16 (76.2)

*There were no statistically significant differences across groups in socioeconomic characteristics or birth-related variables ( $p > 0.05$  for chi-square test [categorical data] and Kruskal–Wallis test [continuous data]).*

*\*Socioeconomic class assigned as per the Brazilian Economic Classification Criterion. DM: Diabetes Mellitus; HTN: Hypertension; SMS: Smoking; SGA: Small for gestational age; CTL: Control*

**Table 2.** Breast Milk leptin, adiponectin and insulin concentration at colostrum (PP) and mature milk (1M) according to groups. IVAPSA Cohort, Porto Alegre, Brazil, 2015.

	<b>DM</b>	<b>HTN</b>	<b>SMS</b>	<b>SGA</b>	<b>CTL</b>	<b>p</b>
	md (n)	md (n)	md (n)	md (n)	md (n)	
<b>Leptin PP, ng/mL</b>	0.668 (7)	0.603 (7)	0.599 (15)	0.641 (10)	0.813 (17)	0.715
<b>Leptin 1M, ng/mL</b>	0.460 (7)	0.503 (7)	0.544 (15)	0.377 (10)***	0.715 (16)***	0.026**
<b>p</b>	1.000	0.465	0.753	0.050*	0.234	
<b>Adiponectin PP, ng/mL</b>	10.230 (7)	18.260 (7)	13.110 (17)	14.370 (10)	8.790 (18)	0.105
<b>Adiponectin 1M, ng/mL</b>	12.430 (7)	14.710 (7)	10.190 (17)	9.990 (10)	9.870 (17)	0.754
<b>p</b>	0.109	0.465	0.112	0.123	0.959	
<b>Insulin PP, <math>\mu</math>U/mL</b>	49.370 (7)	58.580 (7)	46.300 (17)	60.485 (10)	55.035 (18)	1.000
<b>Insulin 1M, <math>\mu</math>U/mL</b>	22.830 (7)	25.620 (7)	22.800 (17)	16.665 (10)	22.030 (18)	0.330
<b>p</b>	0.273	0.144	0.084	0.012*	0.041*	

\*p<0.05, Wilcoxon test for paired data; \*\*p<0.05, Kruskal–Wallis test between groups; \*\*\*p=0.045, Games–Howell post-hoc test. md: median; DM: Diabetes Mellitus; HTN: Hypertension; SMS: Smoking; SGA: Small for gestational age; CTL: Control

**Table 3.** Adequacy of gestational weight gain according to IOM, 2009. IVAPSA Cohort, Porto Alegre, Brazil, 2015.

	<b>DM</b>	<b>HTN</b>	<b>SMS</b>	<b>SGA</b>	<b>CTL</b>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Low</b>	1 (10.0)	0 (0)	3 (15.8)	7 (58.3)	4 (21.1)
<b>Adequate</b>	3 (30.0)	2 (20.0)	5 (26.3)	4 (33.3)	5 (26.3)
<b>Over</b>	6 (60.0)	8 (80.0)	11 (57.9)	1 (8.3)	10 (52.6)

\* $p=0.027$  Qui-square test

**Table 4.** Pre-pregnancy BMI and BMI up to 6 months postpartum according to group. IVAPSA Cohort, Porto Alegre, Brazil, 2015.

<b>BMI Kg/m<sup>2</sup></b>	<b>DM</b>		<b>HTN</b>		<b>SMS</b>		<b>SGA</b>		<b>CTL</b>		<b>p</b>
	<b>n</b>	<b>(x<sub>±</sub>SD)</b>	<b>n</b>	<b>(x<sub>±</sub>SD)</b>	<b>n</b>	<b>(x<sub>±</sub>SD)</b>	<b>n</b>	<b>(x<sub>±</sub>SD)</b>	<b>n</b>	<b>(x<sub>±</sub>SD)</b>	
<b>Pre Gestational</b>	11	27.38 (5.72)***	10	26.58 (3.59)	19	23.90 (4.83)	12	21.09 (3.46)***	19	25.07 (5.73)	0.026**
<b>1 Month</b>	9	28.26 (6.42)	7	30.47 (2.79)***	19	26.62 (4.61)	10	22.32 (2.30)***	18	29.70 (5.57)*	0.006**
<b>p</b>		0.079		0.019*		<0.001*		0.265		<0.001*	

\* $p<0.05$ , T test for paired data; \*\* $p<0.05$ , ANOVA test between groups; \*\*\* $p=0.045$ , Tukey post-hoc test. DM: Diabetes Mellitus; HTN: Hypertension; SMS: Smoking; SGA: Small for gestational age; CTL: Control.

**Table 5.** Correlation of breast milk hormones with maternal BMI. IVAPSA Cohort, Porto Alegre, Brazil, 2015.

	<b>n</b>	<b>Correlation Coefficient</b>	<b>p</b>
<b>PG BMI</b>			
LEPTIN PP	54	0.344	0.011*
LEPTIN 1M	52	0.737	<0.001*
ADIPONECTIN PP	57	-0.063	0.644
ADIPONECTIN 1M	55	0.046	0.740
INSULIN PP	57	0.107	0.428
INSULIN 1M	56	0.362	0.006*
<b>BMI 1M</b>			
LEPTIN PP	47	0.348	0.017*
LEPTIN 1M	54	0.782	<0.001*
ADIPONECTIN PP	50	-0.222	0.121
ADIPONECTIN 1M	57	-0.016	0.908
INSULIN PP	49	0.070	0.634
INSULIN 1M	58	0.432	0.001*

\*p<0.05, Spearman's test. PP: colostrum; 1M: mature breast milk.

## 12. APÊNDICES

## 12.1 QUESTIONÁRIO PÓS-PARTO (PP)



PÓS-PARTO

"IVAPSA"

Identificação:
Prontuário mãe:
Prontuário criança:

Nome do Hospital: _____	NUHOSPITAL _____
Data da entrevista: ___/___/___	GDE ___/___/___
Entrevistador(a): _____	ENTREV _____
<b>A1) Nome da mãe:</b> _____	
Endereço: _____ _____ ( ) casa ( ) apartamento	
Referência / Como chegar: _____	
Têm planos para se mudar? Se sim, informações do novo endereço _____	
Telefone fixo: ( ) _____	
Outros telefones para contato: ( ) _____	
Unidade de Saúde (Pré-natal): _____	
Linha de ônibus: _____	
E-mail: _____	
<b>DADOS PARA CONHECIMENTO DOS GRUPOS DE ESTUDO:</b>	
( 1 ) Diabetes ( 2 ) Hipertensão ( 3 ) Tabagismo ( 4 ) RCIU idiopático ( 5 ) Controle	
<b>DADOS GERAIS DA MÃE</b>	
<b>A2) Qual é sua data de nascimento?</b> ___/___/___	PNA SC ___/___/___
<b>A3) Cor ou raça da mãe?</b> Declarada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena Observada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena	CORMAED _____ CORMAEO _____
<b>A4) Cor ou raça do pai?</b> Declarada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena Observada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena (8) NSA (9) IGN	CORPAID _____ CORPAIO _____
<b>A5) Qual é a idade do pai da criança?</b> _____ anos completos (777) Não sabe	PIDADE _____
<b>A6) Quantas pessoas moram na sua casa, incluindo a mãe e criança?</b> _____	PPRESS _____
<b>A7) Dessas, quantas pessoas são adultas?</b> _____	PPESSA _____
<b>A8) Quantos irmãos você tem ou teve?</b> _____	PIRMA _____
<b>A9) Qual a sua situação conjugal atual?</b> (1) Casada ou mora com companheiro (3) Viúva (2) Solteira, sem companheiro ou separada (4) Divorciada	PCONJU _____
<b>A10) Qual a idade de sua menarca (primeira menstruação)?</b> _____ anos	PMENAR _____
<b>A11) Você já engravidou antes? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A38.</b> (0) Não (1) Sim	PFILHOS _____
<b>SE SIM:</b>	
<b>A12) Número de filhos (incluindo o atual)?</b> _____ (88) NSA	PANFIL _____
<b>A13) Número de gestações?</b> _____ (88) NSA	PANGES _____
<b>A14) Número de filhos que não nasceram (abortos)?</b> _____ (88) NSA	PAABORT _____
<b>A15) Algum filho é doente?</b> (0) Não (1) Sim (88) NSA	PAND _____
<b>A16) Se a resposta anterior for positiva, qual a doença?</b> _____ (88) NSA	PANDQ _____
<b>DADOS DO FILHO ANTERIOR:</b>	
<b>A17) Sexo?</b> (0) Feminino (1) Masculino	FSEX1 _____
<b>A18) Data de nascimento?</b> ___/___/___ (88) NSA	FNA SC1 ___/___/___
<b>A19) Peso ao nascimento?</b> _____ gramas (88) NSA	FAPN1 _____ g
<b>A20) Comprimento ao nascimento?</b> _____ cm (88) NSA	FACN1 _____ cm
<b>A21) Com quantas semanas de gravidez a criança nasceu?</b> _____ (88) NSA	FAM1 _____ semanas
<b>A22) Amamentou seu filho?</b> (0) Não (1) Sim (88) NSA	FAM1 _____
<b>A23) SE SIM, por quanto tempo?</b> _____ meses (88) NSA	AMT1 _____
<b>DADOS DO OUTRO FILHO:</b>	
<b>A24) Sexo?</b> (0) Feminino (1) Masculino	FSEX2 _____
<b>A25) Data de nascimento?</b> ___/___/___ (88) NSA	FNA SC2 ___/___/___

A26) Peso ao nascimento? _____ gramas	(88) NSA	FAPN2 _____ g
A27) Comprimento ao nascimento? _____ cm	(88) NSA	FACN2 _____ cm
A28) Com quantas semanas de gravidez a criança nasceu? _____	(88) NSA	FAM2 _____ semanas
A29) Amamentou seu filho? (0) Não (1) Sim	(88) NSA	FAM2 _____
A30) SE SIM, por quanto tempo? _____ meses	(88) NSA	AMT2 _____
<b>DADOS DO OUTRO FILHO:</b>		
A31) Sexo? (0) Feminino (1) Masculino		FSEX3 _____
A32) Data de nascimento? ___ / ___ / ___	(88) NSA	FNA3C3 ___ / ___ / ___
A33) Peso ao nascimento? _____ gramas	(88) NSA	FAPN3 _____ g
A34) Comprimento ao nascimento? _____ cm	(88) NSA	FACN3 _____ cm
A35) Com quantas semanas de gravidez a criança nasceu? _____	(88) NSA	FAM3 _____ semanas
A36) Amamentou seu filho? (0) Não (1) Sim	(88) NSA	FAM3 _____
A37) SE SIM, por quanto tempo? _____ meses	(88) NSA	AMT3 _____
A38) Você tem religião? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A40. (0) Não (1) Sim		RELIG _____
SE SIM:		
A39) Qual é a sua religião? _____	(88) NSA	RELIGQ _____
A40) Até que ano da escola você estudou? Série? ____ Grau? ____		
		PESCOL1 _____ PESCOL2 _____
A41) Você sabe ler e escrever? (0) Não (1) Sim		PLER _____
A42) Qual é a sua profissão? _____		PPROF _____
A43) Qual é a sua ocupação? _____		POCUP _____
A44) Você trabalha com carteira assinada atualmente? (0) Não (1) Sim		PCART _____
A45) Até que ano da escola o pai do(a) seu(sua) filho(a) estudou? Série? ____ Grau? ____	(77) Não sabe	PA\$COL1 _____ PA\$COL2 _____
A46) Qual é a profissão do pai do(a) seu(ua) filho(a)? _____	(7) Não sabe	PAPROF _____
A47) Qual é a ocupação do pai do(a) seu(ua) filho(a)? _____	(7) Não sabe	PAOCUP _____
A48) Ele trabalha com carteira assinada atualmente? (0) Não (1) Sim (2) Está afastado (7) Não sabe		PACART _____
A49) No mes passado, quanto ganharam as pessoas que moram na sua casa? (incluir renda de trabalho, benefícios ou aposentadoria)		
Renda: Pessoa 1: R\$ _____ por mês Pessoa 2: R\$ _____ por mês Pessoa 3: R\$ _____ por mês Pessoa 4: R\$ _____ por mês Pessoa 5: R\$ _____ por mês TOTAL: _____ (77) Não sabe	Benefícios: Pessoa 1: R\$ _____ por mês Pessoa 2: R\$ _____ por mês Pessoa 3: R\$ _____ por mês Pessoa 4: R\$ _____ por mês Pessoa 5: R\$ _____ por mês TOTAL: _____ (77) Não sabe	RDRTOTAL _____ RDBTOTAL _____
A50) Você recebeu indicação para tomar algum SUPLEMENTO de vitamina ou mineral durante a gestação? (exemplos: sulfato ferroso, ácido fólico) SE NÃO ou NÃO SABE PULE PARA QUESTÃO A57. (0) Não (1) Sim		SUPL _____
SE SIM: outro suplemento não		
A51) Qual o suplemento? - Ferro (0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA - Ácido Fólico (0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA - Outros, qual(is): _____ (0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA		SUPLF _____ SUPLA _____ SUPLO _____ SUPLQ _____
A52) Quando iniciou o uso? - Ferro (0) Prévio, desde quando? _____ (1) Na gravidez (2) No pós-parto (7) Não sabe (8) NSA - Ácido Fólico (0) Prévio, desde quando? _____ (1) Na gravidez (2) No pós-parto (7) Não sabe (8) NSA - Outro (0) Prévio, desde quando? _____ (1) Na gravidez (2) No pós-parto (7) Não sabe (8) NSA		SUPLFI _____ SUPLFP _____ SUPLAI _____ SUPLAP _____ SUPLOI _____ SUPLOP _____



A53) Se iniciou durante a gestação, com quantas semanas gestacionais?			SUPLFIG _____ semanas
- Ferro _____ semanas	(77) Não sabe	(88) NSA	SUPLAIG _____ semanas
- Ácido Fólico _____ semanas	(77) Não sabe	(88) NSA	SUPLIOIG _____ semanas
- Outro _____ semanas	(77) Não sabe	(88) NSA	
A54) Quando terminou o uso, com quantas semanas gestacionais?			SUPLFTG _____ semanas
- Ferro _____ semanas	(66) Não parou na gestação	(77) Não sabe	(88) NSA
- Ácido Fólico _____ semanas	(66) Não parou na gestação	(77) Não sabe	(88) NSA
- Outro _____ semanas	(66) Não parou na gestação	(77) Não sabe	(88) NSA
A55) A suplementação teve interrupção de uso? (0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA			SUPLI _____
SE SIM:			
A56) Quanto tempo de interrupção? _____ semanas (77) Não sabe (88) NSA			SUPLIT _____ semanas
A57) Esta utilizando algum suplemento atualmente? (0) Não (1) Sim Qual? _____ vezes por dia: _____			SUPLPP _____ SUPLPPQ _____ SUPLPPV _____
A58) Você utilizou algum MEDICAMENTO durante a gestação? (0) Não (1) Sim SE NÃO ou NÃO SABE, PULE PARA QUESTÃO A62.			MEDG _____
SE SIM:			
A59) Nome?	A60) Motivo?	A61) Início do uso?	MEDGQ1 _____
Med 1 _____	Med 1 _____	Med 1 _____	MEDGM1 _____
Med 2 _____	Med 2 _____	Med 2 _____	MEDGT1 _____
Med 3 _____	Med 3 _____	Med 3 _____	MEDGQ2 _____
Med 4 _____	Med 4 _____	Med 4 _____	MEDGM2 _____
Med 5 _____	Med 5 _____	Med 5 _____	MEDGT2 _____
(88) NSA	(88) NSA	(em meses) (88) NSA	MEDGQ3 _____
			MEDGM3 _____
			MEDGT3 _____
A62) Você utiliza atualmente algum MEDICAMENTO? (0) Não (1) Sim SE NÃO ou NÃO SABE, PULE PARA QUESTÃO A68.			MED _____
SE SIM:			
A63) Nome?	A64) Motivo?	A65) Tempo uso?	MEDAQ1 _____
Med 1 _____	Med 1 _____	Med 1 _____	MEDAM1 _____
Med 2 _____	Med 2 _____	Med 2 _____	MEDAT1 _____
Med 3 _____	Med 3 _____	Med 3 _____	MEDAQ2 _____
Med 4 _____	Med 4 _____	Med 4 _____	MEDAM2 _____
Med 5 _____	Med 5 _____	Med 5 _____	MEDAT2 _____
(88) NSA		(em dias)	MEDAQ3 _____
			MEDAM3 _____
			MEDAT3 _____
A66) Você teve infecção urinária na gestação? (0) Não (1) Sim			GIU _____
A67) Você teve outras doenças na gestação? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A68. (0) Não (1) Sim			GDO _____
SE SIM:			
A68) Qual(is) doença(s)? _____ (88) NSA			GDOQ _____
A69) Você foi hospitalizada na gestação? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A72. (0) Não (1) Sim			GHOSP _____
SE SIM:			
A70) Quantos dias? _____ (88) NSA			GHOSPD _____ dias
A71) Por qual(is) motivo(s)? _____ (88) NSA			GHOSPM _____
A72) Como você recebeu e a notícia da sua gravidez?			RECMAE _____
A73) Como o pai da criança recebeu a notícia da sua gravidez?			RECPAI _____
A74) Sua gestação foi planejada? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A75. (0) Não (1) Sim			PLAN _____

<b>SE SIM:</b>		
Intenção ou objetivo de engravidar:	(0) Não (1) Sim (8) NSA	PLAN1 _____
Cessaç�o de m�todo anticoncepcional:	(0) N�o (1) Sim (8) NSA	PLAN2 _____
Concord�ncia do parceiro:	(0) N�o (1) Sim (8) NSA	PLAN3 _____
Momento adequado com rela�o a estilo/est�gio de vida:	(0) N�o (1) Sim (8) NSA	PLAN4 _____
A75) Sua gesta�o foi por concep�o assistida (artificial)? (0) N�o (1) Sim SE N�O PULE PARA QUEST�O A77.		PCA \$ _____
<b>SE SIM:</b>		
A76) Qual foi o m�todo? (0) Insemina�o Intra-Uterina (1) Fertiliza�o in vitro (8) NSA		PCA SM _____
A77) Voce ja fumou ou fuma cigarros de tabaco? SE N�O PULE PARA QUEST�O A85. (0) N�o, nunca fumou (1) Sim, j� fumou (2) Sim, fuma atualmente		TAB _____
<b>SE JA FUMOU OU FUMA:</b>		
A78) Por quanto tempo fumou ou fuma? _____ meses (88) NSA		TABT _____ meses
A79) Quantos cigarros voce fumava ou fuma por dia? _____ cigarros (88) NSA		TABQ _____ cigarros
A80) Se parou de fumar, quanto tempo antes de engravidar? _____ meses (88) NSA		TABP _____ meses
A81) Usa ou usou na gesta�o medica�oes especificas para parar de fumar? (0) N�o (1) Sim		TABM _____
<b>SE SIM:</b>		
A82) Qual(is) tipo(s) de tratamento(s)? (0) Medica�o via oral (1) Goma de mascar (2) Adesivo (3) Outro (8) NSA		TABMQ _____
A83) Se iniciou durante a gesta�o, com quantas semanas? _____ semanas (88) NSA		TABMI _____ semanas
<b>SE TEVE OUTROS FILHOS:</b>		
A84) Fumou na gesta�o anterior? (0) N�o (1) Sim (88) NSA		TABGA _____
A85) Ha alguem que fuma na sua casa (exceto a mae)? (0) N�o (1) Sim SE N�O PULE PARA QUEST�O A87.		TABC _____
<b>SE SIM:</b>		
A86) Quantas pessoas em sua casa atualmente fumam (exceto a mae)? N�mero de pessoas _____ (88) NSA		TABCP _____
A87) Sua mae fumou na sua gesta�o? (0) N�o (1) Sim (7) N�o sabe		TABMG _____
<b>DADOS DA ALIMENTA�O DA M�E</b>		
A88) Voce ja recebeu alguma orienta�o de como se alimentar? (0) N�o (1) Sim SE N�O PULE PARA A QUEST�O A81.		PORI _____
<b>SE SIM:</b>		
A89) Essa orienta�o ocorreu: (1) Antes de engravidar (2) Durante a gesta�o (3) op�oes 1 e 2 (8) NSA		PORIM _____
A90) De quem recebeu a orienta�o? _____ (8) NSA		PORIQ _____
<b>DADOS GERAIS DA CRIAN�A</b>		
A91) A crian�a ja tem nome? SE N�O PULE PARA A QUEST�O A83. (0) N�o (1) Sim		CRNOME _____
<b>SE SIM:</b>		
A92) Qual o nome da crian�a? _____ (88) NSA		NOME CR _____
A93) Sexo? (0) Feminino (1) Masculino		CSEX _____
A94) Data de nascimento? _____ / _____ / _____		CRDN ____ / ____ / ____
A95) N�mero da Declara�o de Nascido Vivo (DN)? _____		NUDN _____
A96) Peso ao nascer? _____ gramas		PESOCR _____ g
A97) Comprimento ao nascer? _____ cm		COMPCR _____ cm
A98) Perimetro cef�lico? _____ cm		PCCR _____ cm
A99) Apgar1? _____		APGAR1 _____
A100) Apgar5? _____		APGAR5 _____
A101) Tipo de parto? (1) Cesarea (2) Vaginal (3) Forceps		CTPART _____

A102) Leve meconio (prontuario)? (0) Não (1) Sim (6) Não tem no prontuario	MECO _____
A103) Hora que a criança nasceu? _____	HRNA SC _____
A104) A criança mamou no primeiro dia de vida? (0) Não (1) Sim	MAMOD1 _____
<b>SE NÃO MAMOU NO PEITO:</b>	
A105) O que recebeu? (0) Solução glicosada via oral (1) Soro glicosado endovenoso (2) Fórmula 1º Semestre (3) Outro, qual? _____ (7) Não sabe (8) NSA	MAMO _____ MAMOQ _____
A106) Quantos minutos após nascer a criança mamou no peito pela primeira vez? _____ minutos (5555) mamou após 1º dia (8888) NSA	HRMAMO _____
A107) Peso de nascimento da mãe? _____ gramas (7777) Não sabe	PNM _____ g
A108) Qual era seu peso antes de engravidar? _____ kg (7777) Não sabe	PE\$OAG _____ kg
A109) Qual foi seu peso no final do 1º trimestre? _____ kg (7777) Não sabe	PE\$O1T _____ kg
A110) Qual foi seu peso no final do 2º trimestre? _____ kg (7777) Não sabe	PE\$O2T _____ kg
A111) Qual era o peso antes do parto? _____ kg (7777) Não sabe	PE\$OAP _____ kg
A112) Qual era a altura antes do parto? _____ cm (7777) Não sabe	A\$LTAP _____ cm
A113) Data da última menstruação? ____/____/____ (66) Não tem na carteirinha	DUM ____/____/____
A114) Ecografias: peso e comprimento fetal aproximado (prontuario) 1º Peso: _____ gramas 2º Peso: _____ 3º Peso: _____ 1º Comprimento: _____ cm 2º Compr.: _____ cm 3º Compr.: _____ cm Data Eco 1º TRI: ____/____/____ Data Eco 2º TRI: ____/____/____ Data Eco 3º TRI: ____/____/____ 1º IG: _____ 2º IG: _____ 3º IG: _____  (8) NSA (8) NSA (8) NSA	ECOP1 _____ g ECOC1 _____ cm ECOD1 ____/____/____ ECOIG1 _____ ECOP2 _____ g ECOC2 _____ cm ECOD2 ____/____/____ ECOIG2 _____ ECOP3 _____ g ECOC3 _____ cm ECOD3 ____/____/____ ECOIG3 _____
A115) Peso da placenta (prontuario)? _____ gramas (66) Não tem esse dado	PE\$OPL _____ g
A116) Data da primeira consulta do pre-natal? ____/____/____ IG: _____ (66) Não tem na carteirinha	PCPN ____/____/____ PCPNIG _____
A117) Data da última consulta do pre-natal? ____/____/____ IG: _____ (66) Não tem na carteirinha	UCPN ____/____/____ UCPNIG _____
A118) Numero de consultas pre-natais? _____ (66) Não tem na carteirinha	NCPN _____
A119) Primeiro nível de PAS e PAD aferido em consulta pre-natal? _____ mmHg x _____ mmHg (66) Não tem na carteirinha Data: ____/____/____ IG: _____	PPA SPN _____ PPADPN _____ DPPA ____/____/____ IGPPA _____
A120) Ultimo nível de PAS e PAD aferido em consulta pre-natal? _____ mmHg x _____ mmHg (66) Não tem na carteirinha Data: ____/____/____ IG: _____	UPA SPN _____ UPADPN _____ DUPA ____/____/____ IGUPA _____
<b>EXAMES LABORATORIAIS DA MÃE</b>	
A121) Ultimos exames laboratoriais (prontuario e carteira da gestante)? Colocar 66 se não tem dado Tipo sanguíneo da mãe _____ Fator Rh _____ Hematócrito _____ % Hemoglobina _____ g/dl Eritrócito _____ milhões/ul Leucócitos Totais _____ Plaquetas _____ ul Tempo de Tromboplastina Parcial _____ s Tempo de Protrombina _____ s RNI _____ VDRL _____ (0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo HBSAg _____ (0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo Toxoplasmose IgM _____ (0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo	SABO _____ FRH _____ HEMT _____ HEMG _____ ERIT _____ LEUT _____ PLAQ _____ TTP _____ TP _____ RNI _____ VDRL _____ VHB _____ TOXOM _____

Toxoplasmose IgG _____	(0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo	TOXOG _____
Rubéola _____	(0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo	RUB _____
Citomegalovirose _____	(0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo	CMV _____
Glicose em jejum _____ mg/dl do primeiro trimestre		GLI1 _____
Glicose em jejum _____ mg/dl do segundo trimestre		GLI2 _____
Glicose em jejum _____ mg/dl do terceiro trimestre		GLI3 _____
TTG 75g (jejum) _____ mg/dl		TTG1 _____
TTG (2h após) _____ mg/dl		TTG2 _____
Colesterol HDL _____ mg/dl		HDL _____
Colesterol LDL _____ mg/dl		LDL _____
Triglicerídeos _____ mg/dl		TRIG _____
Colesterol Total _____ mg/dl		COLT _____
Aspartato-aminotransferase (TGO) _____ U/L		TGO _____
Transaminase glutâmica pirúvica (TGP) _____ U/L		TGP _____
Bilirrubina Total _____ mg/dl		BILIT _____
Ferritina _____ ng/ml		FERR _____
Acido Fólico _____ ng/dl		ACFO _____
T4 _____ mcg/100ml		T4 _____
TSH _____ microUI/ml		TSH _____
Creatinina _____ mg/dl		CREA _____
Ureia _____ mg/dl		UREIA _____
Exame qualitativo de urina _____	(0) Não realizou (1) Realizou	EQU _____
Urocultura _____	(0) Negativa (1) Positivo	URO _____
Parasitológico de fezes _____	(0) Negativo (1) Positivo	ECF _____
Citopatológico - Colo do Útero _____	(0) Negativo (1) Positivo	CP _____
Hemoglobina glicada _____		HBGLIC _____
<b>QUESTIONÁRIOS ESPECÍFICOS – GRUPOS</b>		
<b>DOENÇA HIPERTENSIVA</b>		
<b>B1) Qual a classificação de sua hipertensão (prontuário)?</b>		HIP _____
(1) Pré-eclâmpsia (2) Hipertensão crônica (3) Eclâmpsia (4) Pré-eclâmpsia superposta à HC (5) Hipertensão gestacional (8) NSA		
<b>SE DIAGNOSTICO DE HIPERTENSAO CRONICA (HC):</b>		
B2) Quando teve o diagnóstico? _____ anos	(88) NSA	HIPDC _____ anos
<b>SE POSSUI HIPERTENSAO GESTACIONAL, PRE-ECLAMPسيا OU ECLAMPسيا</b>		
B3) Com quantas semanas gestacionais a HAS foi diagnosticada? _____ semanas	(88) NSA	HIP _____ semanas
B4) Maior nível de PAS na internação? _____ mmHg Data: ____/____/____		PAS PASD ____/____/____
B5) Maior nível de PAD na internação? _____ mmHg Data: ____/____/____		PAD PADD ____/____/____
<b>B6) Usou medicações específicas para a hipertensão na gestação?</b> (0) Não (1) Sim <b>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO B10.</b>		HIPM _____
<b>SE SIM:</b>		
B7) Qual(is)? _____	(88) NSA	HIPMG _____
B8) Se iniciou durante a gestação, com quantas semanas? _____ semanas	(88) NSA	HIPMI _____ semanas
B9) Se parou durante a gestação, com quantas semanas? _____ semanas	(88) NSA	HIPMP _____ semanas
<b>SE TEVE OUTROS FILHOS:</b>		
B10) Teve hipertensão na gestação anterior? <b>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO B13.</b> (0) Não (1) Sim		(8) NSA HIPAN _____
<b>SE SIM:</b>		
B11) Qual era a classificação de sua hipertensão? (1) Pré-eclâmpsia (2) Pré-eclâmpsia superposta à HC (3) Eclâmpsia (4) Hipertensão crônica-HC (5) Hipertensão gestacional (8) NSA		HIPANQ _____
B12) Qual(is) a(s) medicação(ões) que utilizava? _____	(88) NSA	HIPANM _____

B13) Possui historico familiar de hipertensao? SE NAO PULE PARA QUESTAO B15. (0) Não (1) Sim (7) Não sabe	HIPHF _____
SE SIM:	
B14) Qual o parentesco? (1) Mãe (2) Pai (3) Irmãos (4) Irmã (5) Avós Maternos (6) Avós Paternos (7) Primos (8) Tios (88) NSA	HIPHFQ _____
B15) Sua mae teve hipertensao na sua gestação? (0) Não (1) Sim (7) Não sabe	HIPMM _____
<b>DIABETES</b>	
D1) Qual a classificação de sua diabetes (prontuario)? (1) DM1 (2) DM2 (3) Diabetes Gestacional (DMG)	DMCL _____
SE DIAGNOSTICO DE DM1 ou DM2:	
D2) Quando teve o diagnostico? _____ anos (88) NSA	DMD _____ anos
SE POSSUI DIABETES GESTACIONAL (DMG):	
D3) Com quantas semanas gestacionais a DMG foi diagnosticada? _____ semanas (88) NSA	DMGDG _____
SE TEVE OUTROS FILHOS:	
D4) Em gestações anteriores alguma vez voce apresentou diabetes? (0) Não (1) Sim (8) NSA	DMGANT _____
SE SIM:	
D5) Em quantas gestações? _____ (88) NSA	DMGANTQ _____
D6) A diabetes persistiu apos o parto? (0) Não (1) Sim (8) NSA	DMGANTP _____
SE SIM:	
D7) A diabetes persistiu por quanto tempo? _____ meses (555) Nunca mais normalizou (888) NSA	DMGANTPT _____
D8) Que tipo de tratamento foi indicado para o diabetes nesta gestação? (0) nenhum tratamento (1) dieta (2) atividade física (3) insulina (4) hipoglicemiante oral (5) Outros: _____	DMTRAT _____ DMTRATO _____
SE HIPOGLICEMIANTE OU INSULINA:	
D9) Qual(is) medicação(ões)? _____ (88) NSA	DMTRATQ _____
D10) Dose(s) _____ (88) NSA	DMTRATD _____
D11) Voce seguiu o tratamento recomendado? (0) Não (2) Às vezes (1) Sim, durante toda a gestação desde o momento do diagnóstico	DMTRATR _____
SE NAO OU AS VEZES:	
D12) Por qual(is) motivo(s)? _____ (88) NSA	DMTRATRM _____
D13) Quantas vezes, nesta gestação, voce foi internada para controle glicemico? Número de vezes: _____	DMCCI _____
SE FOI INTERNADA:	
D14) Por quanto tempo? _____ (88) NSA	DMCCP _____ dias
D15) Durante a gestação voce fazia controle da sua glicemia? (0) Não (1) Sim	DMCG _____
SE SIM:	
D16) Qual o método que utilizava no controle da sua glicemia? (1) Fita-teste (2) Exame Laboratorial (3) Ambas (8) NSA	DMCGM _____
D17) Com que frequencia monitorava sua glicemia? (88) NSA	DMCGMF _____ semana
D18) Voce possui historico familiar de diabetes? (0) Não (1) Sim (7) Não sabe	DMHF _____
SE SIM:	
D19) Qual o parentesco? (1) Mãe (2) Pai (3) Irmãos (4) Irmã (5) Avós Maternos (6) Avós Paternos (7) Primos (8) Tios (88) NSA	DMPAR _____

## CONDIÇÕES DE HABITAÇÃO

A118) De qual material a maioria das paredes de sua moradia é constituída? (0) Tijolo (1) Tábua (madeira) ou taipa (2) Concreto ou cimento (3) Outro Qual? _____	MATPAR _____
A119) De qual material a maioria do piso de sua moradia é constituído? (0) Cerâmica ou cimento (1) Tábua (madeira) (2) Terra ou barro (3) Carpete (4) Outro Qual? _____	MATPISO _____
A120) Na sua casa tem manchas de umidade na parede ou no teto? (0) Não (1) Sim	MOFO _____
A121) De onde vem a água usada na sua habitação? (0) Canalização interna (1) Ponto de água externo (2) Outro Qual? _____	AGUAHAB _____
A122) Na sua casa tem encanação para esgoto? (0) Não (1) Sim	ESGHAB _____
A123) Onde está situado o banheiro que é utilizado por você e pelas pessoas da sua casa? (0) Dentro de casa (1) Fora de casa	BANHAB _____
<b>COLETA DE MATERIAIS</b>	
A124) Conseguiu realizar a coleta de saliva da mãe? (0) Não, motivo? _____ (1) Sim	SALVM _____
A125) Conseguiu realizar a coleta de leite? (0) Não, motivo? _____ (1) Sim	LEITEM _____
A126) Conseguiu realizar a coleta de saliva da criança? (0) Não, motivo? _____ (1) Sim	SALVC _____

### Critério de Classificação Econômica Brasil ABIPEME (ABEP, 2010)

Abaixo, marcar um X sobre o número de itens de cada eletrodoméstico existente na casa em que a gestante mora:

Posses de Itens:

Itens	Não tem	Quantidade de Itens			
		1	2	3	4
Televisão em cores	0	1	2	3	4
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	4	5	6	7
Automóvel (carro ou moto)	0	4	7	9	9
Empregada mensalista	0	3	4	4	4
Máquina de lavar	0	2	2	2	2
Videocassete/DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	4	4	4	4
Freezer*	0	2	2	2	2

\*Aparelho independente ou parte da geladeira duplex

Grau de instrução do chefe da família:

Nomenclatura antiga	Nomenclatura atual	Pontos	Pontuação Mínima: 0  Pontuação Máxima: 46
Analfabeto/Primário Incompleto	Analfabeto/até 3ª série fundamental	0	
Primário completo/Ginásial Incompleto	4ª série fundamental	1	
Ginásial completo/Colegial Incompleto	Fundamental completo	2	
Colegial completo/Superior Incompleto	Médio completo	4	
Superior completo	Superior completo	8	

#### AGENDAMENTO:

Próxima entrevista: 7 dias de vida da criança

Dia: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Horário: \_\_\_\_\_

Local: Domicílio

## 12.2 QUESTIONÁRIO 1 MÊS (1M)



1 MÊS  
"IVAPSA"

Identificação:

SEGUIMENTO	
Data da entrevista: ___/___/___	1GDE ___/___/___
Entrevistador (a): _____	1ENTREV ___
Nome mãe/ bebê: _____	
Endereço: _____ _____ ( ) casa ( ) apartamento	
Referência/Como chegar _____	
Têm planos para se mudar? Se sim, informações do novo endereço _____	
Telefone fixo: ( ) _____	
Outros telefones para contato: ( ) _____	
Linhas de ônibus: _____	
E-mail: _____	
DADOS GERAIS SOBRE A CRIANÇA E A FAMÍLIA	
E1) Idade do bebê em dias? _____	1IDADCR ___
E2) Seu filho vai a creche? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO E5.</i> (0) Não (1) Sim	1CRECHE ___
<i>SE SIM:</i>	
E3) Em qual turno? (1) turno integral (2) meio turno (8) NSA	1CRECHET ___
E4) Desde quando? _____ dias (88) NSA	1CRECHEI ___
E5) Na maior parte do tempo quem cuida do seu filho? (1) a própria mãe (2) avós (3) Pai/ companheiro (4) outra pessoa, qual? _____	1QMCUID 1QMCUIDQ ___
E6) Seu filho fez o teste do pezinho? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO E8.</i> (0) Não (1) Sim	1TSTPE ___
<i>SE SIM:</i>	
E7) Ele teve que repetir o teste? (0) Não (1) Sim, Qual o motivo? _____ (8) NSA	1TSTPER 1TSTPERM ___
E8) Resultados do teste do Pezinho: Fenilcetonúria (1) Positivo (2) Negativo Anemia falciforme (1) Positivo (2) Negativo Hipotireoidismo (1) Positivo (2) Negativo (8) NSA Fibrose cística (1) Positivo (2) Negativo Outros _____ (1) Positivo (2) Negativo	1FENIL 1ANEFAT ___ 1HIPOT 1FIBRCIS ___ 1OUTRO 1OUTROQ ___
E9) Seu filho tem ou teve alguma doença? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO E11.</i> (0) Não (1) Sim (2) Em investigação	1CDOEN ___
<i>SE SIM:</i>	
E10) Qual? (Respiratória, Alergica, Cardíaca, Renal, Intestinal, Neurológica) _____ _____ _____ (88) NSA	1CDOENQ ___
E11) Seu filho sofreu alguma queda ou acidente desde a última entrevista? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO E14.</i> (0) Não (1) Sim	1QUEDA ___
<i>SE SIM:</i>	
E12) Qual (is) acidente (s)? _____ (88) NSA	1QUEDAAC ___
E13) Foi levado ao médico? (0) Não (1) Sim (88) NSA	1QUEDAMD ___
E14) Seu filho recebeu algum medicamento desde a última entrevista? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO E17.</i> (0) Não (1) Sim	1CMED ___
<i>SE SIM:</i>	



E15) Nome Med 1 _____ Med 2 _____ Med 3 _____ Med 4 _____ Med 5 _____ (88) NSA	E16) Motivo Med 1 _____ Med 2 _____ Med 3 _____ Med 4 _____ Med 5 _____ (88) NSA	1CMEDQ1 ____ 1CMEDM1 ____ 1CMEDQ2 ____ 1CMEDM2 ____ 1CMEDQ3 ____ 1CMEDM3 ____ 1CMEDQ4 ____ 1CMEDM4 ____ 1CMEDQ5 ____ 1CMEDM5 ____
E17) Seu filho foi internado desde a ultima entrevista? <i>SE NAO PULE PARA QUESTAO E20.</i> (0) Não (1) Sim		1CINTER ____
<b>SE SIM:</b>		
E18) Vezes que foi internado? _____	(88) NSA	1CINTERV ____
E19) Motivo(s) da internação(ões)? _____	(88) NSA	1CINTERM ____
E20) Seu filho usa ou usou bico desde a ultima entrevista? <i>SE NAO PULE PARA QUESTAO E23.</i> (0) Não (1) Sim (2) Já usou		1CBICO ____
<b>SE SIM ou JA USOU:</b>		
E21) Quando iniciou o uso? _____ dias	(88) NSA	1CBICOI ____
E22) Tempo de uso? _____ dias	(88) NSA	1CBICOT ____
E23) Voce tem o costume de ler, contar historias para o seu filho? (0) Não (1) Sim		1LER ____
E24) Voce faz a higiene bucal do seu filho? (0) Não (1) Sim		1HIGBC ____
E25) Voce fuma atualmente? <i>SE NAO PULE PARA QUESTAO E27.</i> (0) Não (1) Sim		1MFUMA ____
<b>SE SIM:</b>		
E26) Quantos cigarros por dia? _____	(88) NSA	1MFUMAQ ____
E27) Ha alguem que fuma na sua casa? (exceto a mae) <i>SE NAO PULE PARA QUESTAO E29.</i> (0) Não (1) Sim		1FUMOC\$ ____
<b>SE SIM:</b>		
E28) Quantas pessoas fumam em sua casa atualmente? _____	(88) NSA	1FUMOC\$Q ____
<b>ALIMENTAÇÃO DA CRIANÇA</b>		
E29) O seu bebe mama no peito? <i>SE SIM PULE PARA QUESTAO E32.</i> (0) Não (1) Sim		1MAMAP ____
<b>SE NAO:</b>		
E30) Por que? _____	(88) NSA	1MAMAPN ____
E31) Quando parou de amamentar? _____ dias	(88) NSA	1QPAMA ____
E32) Tem horarios certos para mamar (leite materno, formula ou leite de vaca)? (0) Não. Dou quando ele(a) quer/pede (1) Sim		1HCMAMA ____
E33) Quantas vezes mama durante o dia, ou no caso de formula, quantas vezes ao dia está recebendo? _____ vezes Leite Materno _____ vezes Fórmula infantil _____ vezes Leite de vaca		1MAMAQD __ wd
E34) Quantas vezes mama durante a noite ou no caso de formula, quantas vezes durante a noite está recebendo? _____ vezes Leite Materno _____ vezes Fórmula infantil _____ vezes Leite de vaca		1MAMAQN __ wd
E35) O seu bebe recebe ou recebeu agua pura? <i>SE NAO PULE PARA QUESTAO E42.</i> (0) Não (1) Sim		1AGUA ____
<b>SE SIM:</b>		
E36) Que tipo de agua e utilizada? (1) DMAE (2) Poço (3) Mineral (4) Sistema (5) Filtrada/ Fervida (6) Outro, qual? _____	(88) NSA	1AGUAT ____
E37) Quando introduziu? _____ dias de vida do bebe.	(88) NSA	1QDAG ____
E38) Qual volume (ml) por dia recebe ou recebeu agua? _____	(88) NSA	1AGUAVZ ____
E39) Qual o motivo da introdução? _____	(88) NSA	1AGUAM ____
E40) SE PAROU, quando? _____ dias de vida do bebe.	(88) NSA	1QPAG ____

E41) Alguem recomendou? (1) ela própria decidiu (3) o companheiro (2) a avó (4) algum profissional da saúde (5) outros/especificar _____ (88) NSA	1RECAG 1RECAE _____
E42) O seu bebe recebe ou recebeu chá? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTAO E48.</i> (0) Não (1) Sim	1CHA _____
<b>SE SIM:</b>	
E43) Quando introduziu? _____ dias de vida do bebe. (88) NSA	1QDCH _____
E44) Qual volume (ml) por dia recebe ou recebeu chá? _____ (88) NSA	1CHAVZ _____
E45) Qual o motivo da introdução? _____ (88) NSA	1CHAM _____
E46) <i>SE PAROU</i> , quando? _____ dias de vida do bebe. (88) NSA	1QPCH _____
E47) Alguem recomendou? (1) ela própria decidiu (3) o companheiro (2) a avó (4) algum profissional da saúde (5) outros/especificar _____ (88) NSA	1RECCH 1RECCHÓ _____
E48) O seu bebe recebe ou recebeu suco? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTAO E55.</i> (0) Não (1) Sim	1SUCO _____
<b>SE SIM:</b>	
E49) Quando introduziu? _____ dias de vida do bebe. (88) NSA	1QDSC _____
E50) Qual volume (ml) por dia recebe ou recebeu suco? _____ (88) NSA	1SUCOVZ _____
E51) Qual o tipo de suco oferecido? 1. Natural (0) Não (1) Sim 2. Concentrado – garrafa ou polpa (0) Não (1) Sim 3. Diluido – caixinha (0) Não (1) Sim 4. Artificial – pó/xarope (0) Não (1) Sim (88) NSA	1TSUCO1 _____ 1TSUCO2 _____ 1TSUCO3 _____ 1TSUCO4 _____
E52) Qual o motivo da introdução? _____ (88) NSA	1SUCOM _____
E53) <i>SE PAROU</i> , quando? _____ dias de vida do bebe. (88) NSA	1QPSC _____
E54) Alguem recomendou? (1) ela própria decidiu (3) o companheiro (2) a avó (4) algum profissional da saúde (5) outros/especificar _____ (88) NSA	1RECSC 1RECSCE _____
E55) O seu bebe recebe ou recebeu refrigerante? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTAO E61.</i> (0) Não (1) Sim	1REFR _____
<b>SE SIM:</b>	
E56) Quando introduziu? _____ dias de vida do bebe. (88) NSA	1QDREF _____
E57) Qual volume (ml) por dia recebe ou recebeu o refrigerante? _____ (88) NSA	1REFML _____
E58) Qual o motivo da introdução? _____ (88) NSA	1REFRM _____
E59) <i>SE PAROU</i> , quando? _____ dias de vida do bebe. (88) NSA	1REFP _____
E60) Alguem recomendou? (1) ela própria decidiu (3) o companheiro (2) a avó (4) algum profissional da saúde (5) outros/especificar _____ (88) NSA	1QPREF _____
E61) O seu bebe recebe ou recebeu outro leite, que nao seja o leite materno? <i>SE NÃO PULE PARA QUESTAO E73.</i> (0) Não (1) Sim	1LNM _____
<b>SE SIM:</b>	
E62) Quando introduziu? _____ dias de vida do bebe. (88) NSA	1QDLT _____
E63) Qual volume (ml) por dia recebe ou recebeu leite? _____ (88) NSA	1LEITEVZ _____
E64) Qual o motivo da introdução? _____ (88) NSA	1LEITEM _____
E65) Alguem recomendou? (1) ela própria decidiu (2) a avó (3) o companheiro (4) algum profissional da saúde (5) outros/especificar _____ (88) NSA	1RECLT 1RECLTE _____
E66) Qual o tipo de leite oferecido? 1. Leite de seguimento – NAN, Nestogeno, Milupa, Aptamil. (0) Não (1) Sim 2. Leite em pó integral – Ninho, Glória, Elegê. (0) Não (1) Sim 3. Leite de vaca (caixinha ou saquinho). (0) Não (1) Sim 4. Leites especiais – Alfarré, Sobee, NAN Soy, Aptamil Soja, SoyMilk. (0) Não (1) Sim 5. Outro tipo de leite. Qual? _____ (8) NSA	1LEITE1 _____ 1LEITE2 _____ 1LEITE3 _____ 1LEITE4 _____ 1LEITE5 _____ 1LEITEQ _____

E67) Algum outro produto é adicionado ao leite? (0) Não (1) Sim	1LTENG ___
<b>SE SIM:</b>	
E68) Quais produtos são utilizados para engrossar, diluir, enriquecer ou adoçar o leite? 1. Cereais não enriquecidos (aveia, amido de milho) (0) Não (1) Sim 2. Cereais enriquecidos (Mucilon, Arrozinha, Farinha Láctea) (0) Não (1) Sim 3. Açúcar (0) Não (1) Sim 4. Achocolatado (0) Não (1) Sim 5. Óleo (0) Não (1) Sim 6. Água (0) Não (1) Sim 7. Outro tipo de produto. Qual? _____ (8) NSA	1FARIN1 ___ 1FARIN2 ___ 1ACU3 ___ 1ACHO4 ___ 1OLEO5 ___ 1AGUA6 ___ 1OUTRQ ___
E69) Qual o motivo da introdução? _____ (88) NSA	1FARINM ___
E70) Quando introduziu? _____ dias de vida do bebê. (88) NSA	1QDLTG ___
E71) Alguém recomendou? (1) ela própria decidiu (4) algum profissional da saúde (2) a avó (5) outros/especificar _____ (8) NSA (3) o companheiro (7) Não sabe	1RECLTG ___ 1RECLTGE ___
E72) Quem na maioria das vezes dá o leite para o bebê? (1) mãe (2) avó materna (3) companheiro (8) NSA (4) Outros/ especificar _____ (7) Não sabe	1LTGMDA ___ 1LTGMDAE ___
E73) Seu bebê usa mamadeira (qualquer líquido)? (0) Não (1) Sim	1MAMAD ___
E74) Seu bebê come outros alimentos (sólidos)? SE NÃO PULE PARA A QUESTÃO E90. (0) Não (1) Sim	1OALIM ___
<b>SE SIM</b>	
E75) Seu bebê tem horários certos para se alimentar? (0) Não (1) Sim (88) NSA	1HORAC ___
E76) O que você faz se a criança recusa algumas refeições? (1) oferece a mesma comida mais tarde (2) espera o horário da próxima refeição (3) substitui por leite materno (4) substitui por mamadeira (5) substitui por outro alimento/especificar _____ (88) NSA	1RECU\$A1 ___
E77) Como você oferece os alimentos para o bebê? 1. Liquidificados (0) Não (1) Sim 2. Passados na peneira (0) Não (1) Sim 3. Raspados (0) Não (1) Sim (88) NSA 4. Amassados com o garfo (0) Não (1) Sim 5. Picados em pequenos pedaços (0) Não (1) Sim 6. Consistência da família (0) Não (1) Sim	1ALPREP1 ___ 1ALPREP2 ___ 1ALPREP3 ___ 1ALPREP4 ___ 1ALPREP5 ___ 1ALPREP6 ___
E78) A quantidade de sal que você usa na comida do bebê é? (1) igual a da sua família (3) maior que a da sua família (2) menor que a da sua família (4) Nada (88) NSA	1\$AL ___
E79) Quem alimenta o bebê na maioria das vezes? (1) mãe (4) funcionária da creche (2) pai/ companheiro (5) outra pessoa/ especificar _____ (88) NSA (3) avós (7) Não sabe	1ALIBB ___ 1ALIBBE ___
E80) Deixa ele levar o alimento à boca por si próprio? (0) Não (1) Sim (88) NSA	1COMES ___
E81) Costuma interagir (conversar, dar atenção...) com a criança? (0) Não (1) Sim (88) NSA	1INTERAG ___
E82) Precisa estimulá-lo (conversar, oferecer o alimento várias vezes) a comer? (0) Não (1) Sim (88) NSA	1ESTIM ___
E83) Insiste (força) quando ele não quer comer (briga, dá castigo...)? (0) Não (1) Sim (88) NSA	1FORCM ___
E84) Oferece recompensas (doces, outros alimentos, brinquedos...)? (0) Não (1) Sim (88) NSA	1RECOMP ___
E85) A comida do bebê é preparada separadamente? (1) sempre (2) às vezes (3) raramente (4) nunca (88) NSA	1COMSE ___

E86) A comida do bebe e preparado na hora em que ele vai se alimentar? (1) sempre (2) às vezes (3) raramente (4) nunca (88) NSA	1COMHR ____
E87) Voce aproveita o resto de leite (ou LM) ou a comida que sobrou no copo, mamadeira ou prato para oferecer mais tarde para o bebê? (0) Não (1) Sim (88) NSA	1APRES ____
E88) Onde voce guarda os alimentos e/ou leite do bebe que sobram ou sao preparados com antecedência? (0) Não guarda (1) Na geladeira (2) No freezer (3) Em temperatura ambiente (88) NSA	1A SOBR ____
E89) A pessoa que prepara os alimentos e/ou o leite do bebe lava as maos antes do preparo? (0) Não (1) Sim (7) Não sabe (88) NSA	1LAVMP ____
E90) A pessoa que alimenta seu filho(a) lava as maos da criança antes da refeição? (1) Sempre (2) Às vezes (3) Nunca (7) Não sabe (88) NSA	1LAVMR ____
E91) Quando o bebe esta doente, algo muda na alimentação dele? SE NÃO PULE PARA A QUESTÃO E88. (0) Não (1) Sim (2) nunca ficou doente (88) NSA	1DOENT ____
<b>SE SIM:</b>	
E92) Aumenta a frequencia das mamadas? (0) Não (1) Sim (8) NSA	1FREQM ____
E93) Aumenta a oferta de liquidos? (0) Não (1) Sim (8) NSA	1ALIQ ____
E94) Força a criança a comer? (0) Não (1) Sim (8) NSA	1FCOMD
E95) Oferece os alimentos preferidos da criança? (0) Não (1) Sim (8) NSA	1PREFE ____
E96) Oferece os alimentos com maior frequencia? (0) Não (1) Sim (8) NSA	1FREQC ____
E97) Faz restrições alimentares? (0) Não (1) Sim (8) NSA	1RESTR ____
E98) O que muda? (outra, qual?) _____ (88) NSA	1DOENTM ____

#### DADOS GERAIS DA MAE

E99) Depois que voce foi para casa, no posto de saúde ou no consultorio do pediatra, você recebeu alguma orientação/ajuda para amamentar? (0) Não (1) Sim SE NÃO, PULE PARA QUESTÃO E102.	1ORAMUB ____
<b>SE SIM:</b>	
E100) Que tipo (quais) orientação (oes)/ajuda? _____	1ORAMUBT ____
<b>SE NÃO:</b>	
E101) Voce considera (acha) que precisava de ajuda? (0) Não (1) Sim, qual ou para quê? _____	10AUBAJ ____ 10AUBAS ____
E102) Esta utilizando algum suplemento atualmente? (0) Não (1) Sim Qual? _____ vezes por dia: _____	1SUPL ____ 1SUPLPG ____ 1SUPLPD ____
E103) Voce utiliza atualmente algum MEDICAMENTO? (0) Não (1) Sim SE NÃO ou NÃO SABE, PULE PARA QUESTÃO E107.	1MED ____
<b>SE SIM:</b>	
E104) Nome Med 1 _____ Med 2 _____ Med 3 _____ Med 4 _____ Med 5 _____ (88) NSA	E105) Motivo Med 1 _____ Med 2 _____ Med 3 _____ Med 4 _____ Med 5 _____
E106) Tempo do uso Med 1 _____ Med 2 _____ Med 3 _____ Med 4 _____ Med 5 _____ (em dias)	1MEDAQ1 ____ 1MEDAM1 ____ 1MEDAT1 ____ 1MEDAQ2 ____ 1MEDAM2 ____ 1MEDAT2 ____ 1MEDAQ3 ____ 1MEDAM3 ____ 1MEDAT3 ____

O seu filho tomou leite materno até qual idade e quando introduziu os seguintes alimentos?

	Não	< 15 dias	15 dias	1º mês	2º mês
E107) Açúcar adicional (mamadeira, suco ou chá)					
E108) Açoçolatado					
E109) Mel					
E110) Café					
E111) Funchicoria					
E112) Fruta amassada					
E113) Papa salgada/ Sopa					
E114) Sopa industrializada					
E115) Verduras ou legumes					
E116) Leguminosas (ex. feijão, lentilha)					
E117) Comida da família					
E118) Carne (gado, frango, porco, peixe)					
E119) Miúdos (ex. figado, moela)					
E120) Ovo					
E121) Embutidos (ex. presunto, salsicha, mortadela, salsichão, salame)					
E122) Bolacha recheada ou wafer					
E123) Bolacha doce (maria ou maisena)					
E124) Danoninho					
E126) Chocolate ou bombom					
E127) Bala ou pirulito					
E128) Salgadinho					
E129) Gelatina / Pudins/ sacolé artificial					
E130) Sorvete / Ficole/ sacole de leite					
E131) Frituras (ex. batata frita, bolinho frito, aipim frito, frango á milanesa)					

DADOS ANTROPOMETRICOS ATUAIS - MAE E CRIANÇA			
E132) Peso da mae + peso do bebe (1ª) _____ Kg (2ª) _____ Kg Média: _____ Kg	1PESOMB _____ kg		
E133) Peso da mae (1ª) _____ Kg (2ª) _____ Kg Média: _____ Kg	1PESOM _____ kg		
E134) Altura da mae (1ª) _____ cm (2ª) _____ cm Média: _____ cm	1ALTM _____ cm		
E135) Peso do bebe (1ª) _____ g (2ª) _____ g Média: _____ g	1PESOCR _____ g		
E136) Circunferencia da cintura da mae (1ª) _____ cm (2ª) _____ cm Média: _____ cm	1CCM _____ cm		
E137) Circunferencia braquial da mae? (1ª) _____ cm (2ª) _____ cm Média: _____ cm	1CBM _____ cm		
E138) Dobra cutanea tricipital da mae (1ª) _____ mm (2ª) _____ mm Média: _____ mm	1DCTM _____ mm		
E139) Dobra cutanea subescapular da mae (1ª) _____ mm (2ª) _____ mm Média: _____ mm	1DCSBM _____ mm		
E140) Comprimento do bebe (1ª) _____ cm (2ª) _____ cm Média: _____ cm	1COMPCR _____ cm		
E141) Perimetro cefalico do bebe (1ª) _____ cm (2ª) _____ cm Média: _____ cm	1PCCR _____ cm		

COLETA DE MATERIAIS	
E142) Conseguiu coletar o leite da mae? (0) Não, motivo? _____ (1) Sim	1LEITE _____ 1LEITEM _____
E143) Conseguiu realizar a avaliação antropometrica da mae? (0) Não, motivo? _____ (1) Sim	1ANTRM _____ 1ANTRMM _____
E144) Conseguiu realizar a avaliação antropometrica da criança? (0) Não, motivo? _____ (1) Sim	1ANTRC _____ 1ANTRCM _____

**AGENDAMENTO:**

Próxima entrevista: 3 meses de vida da criança

Dia: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Horário: \_\_\_\_\_

Local: Domicílio







## 12.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu filho(a) recém nascido \_\_\_\_\_ e você \_\_\_\_\_ estão sendo convidados(as) a participar da pesquisa intitulada **“Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde do Recém-Nascido nos Primeiros Seis Meses de Vida”** que tem como objetivo principal compreender os efeitos de diferentes situações ocorridas durante a gestação que podem interferir sobre o crescimento, o comportamento e o desenvolvimento infantil, assim como a possibilidade de identificar, muito cedo, os fatores que possam trazer prejuízos para a criança e para o adulto no futuro. Dessa forma, os resultados da presente pesquisa trarão benefícios na compreensão no desenvolvimento de doenças assim como sua prevenção relacionadas com problemas de saúde ocorridos durante a gestação e no início da infância, além de acompanhar o crescimento e desenvolvimento do seu filho.

Para alcançar os objetivos desta pesquisa, será realizada uma entrevista logo após o parto, ainda no hospital, e marcaremos mais cinco encontros, que podem variar de 90 a 120 minutos, com você e seu filho ou sua filha que deverão acontecer nos 7 e 15 dias de vida, no primeiro, terceiro e sexto mês. Desses, três encontros serão realizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no Centro de Pesquisa Clínica e dois na sua casa.

Além da consulta, serão realizados, nesses encontros, testes e questionários referentes às condições de vida e saúde, tais como: hábito alimentar e de atividade física; histórico de doenças; condições de moradia; consumo de bebidas, medicações e outras drogas; condições emocionais da mãe após o parto; relação da mãe com o bebê em relação aos seus cuidados, sua confiança ou insegurança; as condições de sono, comportamento e desenvolvimento do bebê. Algumas avaliações ou medidas específicas de risco mínimo e que podem causar algum desconforto serão realizadas nesses encontros, entre os quais:

- Em todos os encontros: medidas de peso, estatura, circunferência da cintura e medida das dobras cutâneas sua e do seu bebê;
- No 6º encontro será realizada uma filmagem de você com seu bebê realizando algumas tarefas que já fazem parte do seu dia-a-dia com a criança, como por exemplo, você alimentando seu filho(a) e ele(a) brincando;
- No 2º, 4º e 5º encontros, caso você esteja amamentando, serão coletadas três pequenas amostras do seu leite (materno) para avaliar a composição nutricional, e uma amostra de sua saliva e do seu bebê para caracterizar genes que podem estar associados à obesidade.

Os seus dados de identificação e do seu filho(a) não serão divulgados, preservando as suas identidades. As demais informações obtidas serão utilizadas somente para essa pesquisa e serão armazenadas durante cinco anos para posterior descarte.

Se, durante algum dos encontros da pesquisa, seu filho apresentar algum problema de saúde agudo, de maior gravidade como febre alta, dificuldade respiratória, desidratação, por exemplo, ou

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

27, 06, 2011  
11/06/11

mesmo se você estiver se sentindo muito cansada, triste ou chorosa, os entrevistadores realizarão uma avaliação. Caracterizada uma situação de emergência, serão encaminhados para avaliação no Serviço de Emergência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Diferentemente, situações que, não necessitem de atendimento de emergência, serão encaminhadas às Unidades Básicas de Saúde de referência, próximo da sua casa.

Alguns questionários poderão lhe causar algum desconforto e se você não quiser responder solicite ao pesquisador. Caso opte por não participar, você e seu filho(a) não sofrerão nenhum prejuízo.

Eu, \_\_\_\_\_ fui informada:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa;

- De que a minha participação e a do meu filho(a), é voluntária e terei a liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo para mim ou para meu filho(a), tanto individual como assistencial;

- Da segurança de que eu e meu (a) filho (a) não seremos identificados, quando da divulgação dos resultados e que essas informações serão utilizadas somente para fins científicos e de ensino;

- De que se existirem gastos decorrentes da participação na pesquisa, como, por exemplo, transporte, eu receberei do orçamento da pesquisa;

- Do acesso às informações sobre o projeto de pesquisa, dúvidas e a forma como ele será conduzido pelo grupo de pesquisadores do Núcleo de Estudos da Criança e do Adolescente (NESCA) ou o pesquisador responsável Marcelo Zubaran Goldani no telefone (51) 3359 8515 ou na Rua Ramiro Barcellos 2350, 11º andar, sala 1131B.

- De que quaisquer dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com Nadine Clausell, Coordenadora do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA pelo telefone (51) 3359 8304, endereço Av. Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar.

Declaro que recebi uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi elaborado em duas vias, das quais uma delas ficará com o pesquisador.

\_\_\_\_\_  
Nome da mãe ou responsável

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

27, 06, 2011

11009776V

## 13. ANEXOS

### 13.1 MANUAL KIT ELISA - LEPTINA

#### HUMAN LEPTIN ELISA KIT 96-Well Plate (Cat. # EZHL-80SK)

#### I. INTENDED USE

This kit is used for the non-radioactive quantification of human leptin in serum, plasma and other biological media. One kit is sufficient to measure 37 unknown samples in duplicate. *For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.*

#### II. PRINCIPLES OF PROCEDURE

This assay is a direct Sandwich ELISA based, sequentially, on: 1) capture of human leptin by a polyclonal rabbit anti-human leptin antibody immobilized on a 96-well microtiter plate, 2) wash away unbound materials, 3) binding of a biotinylated monoclonal antibody to the captured human leptin, 4) wash away unbound materials, 5) binding of streptavidin-horseradish peroxidase to the immobilized biotinylated antibodies, 6) wash away free enzyme conjugates, and 7) quantification of bound streptavidin-horseradish peroxidase with the substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. The enzyme activity is measured spectrophotometrically by the increased absorbency at 450 nm - 590nm after acidification of formed products. Since the increase in absorbency is directly proportional to the amount of captured human leptin in the unknown sample, the latter can be derived by interpolation from a reference curve generated in the same assay with reference standards of known concentrations of human leptin.

#### III. REAGENTS SUPPLIED

Each kit is sufficient to run one 96-well microtiter plate and contains the following reagents:

- A. **Human Leptin ELISA Plate**  
Coated with Rabbit anti-Human Leptin Antibody  
Quantity: 1 plate  
Preparation: Ready to use  
Note: Unused strips should be resealed in the foil pouch with the desiccant provided.
- B. **Adhesive Plate Sealer**  
Quantity: 2 Sheets  
Preparation: Ready to use
- C. **10X HRP Wash Buffer Concentrate**  
10X concentrate of 50 mM Tris Buffered Saline containing Tween 20  
Quantity: Two bottles containing 50 mL each  
Preparation: Dilute 1:10 with deionized water

**III. REAGENTS SUPPLIED (continued)****D. Human Leptin ELISA Standards**

Human Leptin in Assay Buffer: 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 ng/mL

Quantity: 1 mL/vial

Preparation: Ready to use

Note: The standard(s) in this kit have been calibrated to an International Reference standard, NIBSC code # 97/594.

**E. Quality Controls 1 and 2**

Purified Recombinant Human Leptin in QC Buffer

Quantity: 0.5 mL/vial

Preparation: Ready to use

**F. Assay Buffer**

0.05M PBS, pH 7.4, containing 0.025M EDTA, 0.08% Sodium Azide, 1% BSA and 0.05% Triton X-100

Quantity: 10 mL/vial

Preparation: Ready to use

**G. Human Leptin Detection Antibody**

Biotinylated Mouse anti-Human Leptin Antibody

Quantity: 11 mL/vial

Preparation: Ready to use

**H. Enzyme Solution**

Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate in Buffer

Quantity: 12 mL/vial

Preparation: Ready to use

**I. Substrate**

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

Quantity: 12 mL

Preparation: Ready to use

**J. Stop Solution**

0.3M HCL

Quantity: 12 mL/vial

Preparation: Ready to use (Caution: Corrosive Material)

#### IV. STORAGE AND STABILITY

Recommended storage for kit components is 2 - 8°C.

All components are shipped and stored at 2-8°C. Once opened, liquid standards and controls can be stored up to 30 days at 2-8°C. Refer to expiration dates on all reagents prior to use. Do not mix reagents from different kits unless they have the same lot numbers.

#### V. REAGENT PRECAUTIONS

##### A. Hydrochloric Acid

Hydrochloric Acid is corrosive and can cause eye and skin burns. It is harmful if swallowed and can cause respiratory and digestive tract burns. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow or ingest.

##### B. Sodium Azide

Sodium Azide or Proclin has been added to some reagents as a preservative. Although the concentrations are low, Sodium Azide and Proclin may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Dispose of unused contents and waste in accordance with international, federal, state, and local regulations

#### VI. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Pipette with Tips, 10 $\mu$ L-200 $\mu$ L
2. Multi-channel Pipette, 50 $\mu$ L-300 $\mu$ L
3. Buffer and Reagent Reservoirs
4. Vortex Mixer
5. Absorbent Paper or Cloth
6. Deionized Water
7. Microtiter Plate Reader capable of reading absorbency at 450 nm
8. Orbital Microtiter Plate Shaker

#### VII. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

1. To prepare serum, whole blood is directly drawn into a Vacutainer® serum tube that contains no anti-coagulant. Let blood clot at room temperature for 30 minutes.
2. Promptly centrifuge the clotted blood at 2000 to 3000 x.g. for 15 minutes at 4  $\pm$  2°C.
3. Transfer and store serum samples in separate tubes. Date and identify each sample.
4. Use freshly prepared serum or store samples at 2 - 8°C for later use. Avoid multiple (>5) freeze/thaw cycles.
5. To prepare plasma samples, whole blood should be collected into Vacutainer® EDTA-plasma tubes and centrifuged immediately after collection. Observe same precautions in the preparation of serum samples.
6. If heparin is to be used as an anti-coagulant, the effect on the assay outcome at the dose of heparin used should be pre-determined.
7. Avoid using samples with gross hemolysis or lipemia.

## X. ASSAY PROCEDURE II – Human Leptin (Sensitive) Assay

(Sensitivity: 0.195 ng/mL – 25 ng/mL)

### A. Human Leptin (Sensitive) Standard Preparation

Note: The standard curve range recommended for samples with low Leptin levels is 0.195ng/mL to 25ng/mL. By performing 1:1 serial dilutions of the 0.78ng/mL kit standard with Assay Buffer, the 0.39ng/mL and 0.195ng/mL standard points can be created for use in the Leptin Sensitive Assay.

1. Label two tubes 0.39 and 0.195ng/mL. Add 0.2mL Assay Buffer to each of the two tubes. Prepare serial dilutions by adding 0.2 mL of the 0.78 ng/mL standard to the 0.39 ng/mL tube, mix well and transfer 0.2 mL of the 0.39 ng/mL standard to the 0.195 ng/mL tube and mix well.

Note: Do not use a Repeater pipette. Change tip for every dilution. Wet tip with Standard before dispensing. Unused portions of standard should be stored at 2 - 8°C . Avoid multiple freeze/thaw cycles.

Standard Concentration ng/mL	Volume of Assay Buffer to Add	Volume of Standard to Add
0.39	0.2 mL	0.2 mL of 0.78 ng/mL
0.195	0.2 mL	0.2 mL of 0.39 ng/mL

### B. Human Leptin (Sensitive) Quality Control 1 and 2 Preparation

1. Prepare 1:3 dilutions of Quality Control 1 and Quality Control 2 for use in the Human Leptin (Sensitive) assay. Label two tubes QC1 and QC2. Add 0.4mL Assay Buffer to each of the tubes. Add 0.2mL Quality Control 1 to the QC1 tube and mix well. Add 0.2mL Quality Control 2 to the QC2 tube and mix well.

Note: Do not use a Repeater pipette. Change tip for every dilution. Wet tip with Quality Control before dispensing. Unused portions of Quality Control should be stored at 2 - 8°C. Avoid multiple freeze/thaw cycles.

	Volume of Assay Buffer to Add	Volume of Quality Control to Add
QC1	0.4 mL	0.2 mL of Quality Control 1
QC2	0.4 mL	0.2 mL of Quality Control 2

### C. ASSAY PROCEDURE II – Human Leptin (Sensitive) Assay

(Sensitivity: 0.195 ng/mL – 25 ng/mL)

**Pre-warm all reagents to room temperature immediately before setting up the assay.**

1. Dilute the concentrated Wash Buffer 10 fold by adding the entire contents of both bottles of buffer to 900 mL de-ionized or glass distilled water.
2. Remove required number of strips from the Microtiter Assay Plate. Unused strips should be resealed in the foil pouch with the desiccant provided and stored at 2-8°C. Assemble strips in an empty plate holder and add 300  $\mu$ L of diluted Wash Buffer to each well. Incubate at room temperature for 5 minutes. Decant wash buffer and remove the residual amount from all wells by inverting the plate and tapping it smartly onto absorbent towels several times. Do not let wells dry before proceeding to the next step. If an automated machine is used for the assay, follow the manufacturer's instructions for all washing steps described in this protocol.
3. Add 50  $\mu$ L Assay Buffer into all wells.
4. Add in duplicate 50  $\mu$ L Assay Buffer to blank wells. (Refer to Section XI for suggested well orientations.)
5. Add in duplicate 50  $\mu$ L Human Leptin Standards in order of ascending concentration to the appropriate wells. Add in duplicate 50  $\mu$ L QC1 and 50  $\mu$ L QC2 to the appropriate wells. Add sequentially 50  $\mu$ L of samples in duplicate to the remaining wells. **For best results all additions should be completed within one hour.**
6. Cover the plate with plate sealer and incubate at room temperature for 2 hours on an orbital microtiter plate shaker set to rotate at moderate speed, about 400 to 500 rpm.
7. Remove plate sealer and decant solutions from the plate. Tap as before to remove residual solutions in the wells.
8. Wash wells 3 times with diluted Wash Buffer, 300  $\mu$ L per well per wash. Decant and tap after each wash to remove residual buffer.
9. Add 100  $\mu$ L Detection Antibody to each well. Cover the plate with sealer and incubate at room temperature for 30 minutes on the microtiter plate shaker.
10. Remove sealer and decant solution from the plate. Tap as before to remove residual solutions in the wells.
11. Add 100  $\mu$ L Enzyme Solution to each well. Cover plate with sealer and incubate with moderate shaking at room temperature for 30 minutes on the microtiter plate shaker.

C. **Assay Procedure II – Human Leptin (Sensitive) Assay (continued)**

12. Remove sealer, decant solution from the plate, and tap plate to remove the residual fluid.
13. Wash wells 5 times with diluted Wash Buffer, 300  $\mu$ L per well per wash. Decant and tap firmly after each wash to remove residual buffer.
14. Add 100  $\mu$ L of Substrate Solution to each well, cover plate with sealer and shake on the plate shaker for approximately 5-20 minutes. Blue color should be formed in wells of Leptin standards with intensity proportional to increasing concentrations of Leptin.

**NOTE:** Please be aware that the color may develop more quickly or more slowly than the recommended incubation time depending on the localized room temperature. Please visually monitor the color development to optimize the incubation time. One can monitor color development using 370 nm filter, if available on the spectrophotometer. When the absorbance is between 1.2 and 1.8 at 370 nm, the stop solution can be added to terminate the color development.

15. Remove sealer and add 100  $\mu$ L of Stop Solution (**Caution: Corrosive solution**) and shake plate by hand to ensure complete mixing of solution in all wells. The blue color should turn to yellow after acidification. Read absorbance at 450nm and 590nm in a plate reader within 5 minutes and ensure that there are no air bubbles in any well. Record the difference in absorbance units.



## XII. CALCULATIONS

The dose-response curve of this assay fits best to a sigmoidal 5-parameter logistic equation. The results of unknown samples can be calculated with any computer program having a 5-parameter logistic function.

Note: When sample volumes assayed differ from 25  $\mu$ L (In normal assay), an appropriate mathematical adjustment must be made to accommodate for the dilution factor (e.g., if 12.5  $\mu$ L of sample is used, then calculated data must be multiplied by 2).

## XIII. INTERPRETATION

1. The assay should be rejected if one of the two QC's falls outside of 2 standard deviations of the applicable mean. See the supervisor.
2. The limit of sensitivity of this assay is 0.2 ng/mL + 2 SD human leptin (25  $\mu$ L sample size).
3. The appropriate range of this assay is 0.78 to 100 ng/mL human leptin (25  $\mu$ L sample size). Any result greater than 100 ng/mL in a 25  $\mu$ L sample assayed should be diluted and repeated using assay buffer as diluent until it falls within range.

## XIV. NORMAL RANGE

Normal range: Leptin levels are directly correlated with degree of adiposity.

Mean Serum Leptin levels from normal lean individuals (BMI ranges 18-25):

Lean Men	3.8 $\pm$ 1.8 ng/mL
Lean Women	7.4 $\pm$ 3.7 ng/mL

Serum levels are approximately 2.5 times higher in women per unit BMI as compared to men.

## 13.2 MANUAL KIT ELISA – ADIPONECTINA

### HUMAN ADIPONECTIN ELISA KIT 96-Well Plate (Cat. # EZHADP-61K)

#### I. INTENDED USE

This Human Adiponectin (ACRP30) ELISA kit is used for the non-radioactive quantification of Human Adiponectin in serum, plasma, and adipocyte extracts or cell culture media samples. This kit specifically measures native Human Adiponectin and has no cross reactivity to Mouse Adiponectin. One kit is sufficient to measure 38 unknown samples in duplicate.

*This kit is for Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.*

#### II. PRINCIPLES OF PROCEDURE

This assay is a Sandwich ELISA based, sequentially, on: 1) concurrent capture of Human Adiponectin molecules from samples to the wells of a microtiter plate coated with a monoclonal anti-human adiponectin antibodies, and binding of a second biotinylated monoclonal anti-human antibody to the captured molecules, 2) washing of unbound materials from samples, 3) binding of streptavidin-horseradish peroxidase conjugate to the immobilized biotinylated antibodies, 4) washing of excess of free enzyme conjugates, and 5) quantification of immobilized antibody-enzyme conjugates by monitoring horseradish peroxidase activities in the presence of the substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. The enzyme activity is measured spectrophotometrically by the increased absorbance at 450 nm – 590nm after acidification of formed products. Since the increase in absorbance is directly proportional to the amount of captured Human Adiponectin in the unknown sample, the latter can be derived by interpolation from a reference curve generated in the same assay with reference standards of known concentrations of Human Adiponectin.

### III. REAGENTS SUPPLIED

Each kit is sufficient to run one 96-well plate and contains the following reagents:

**A. Human Adiponectin ELISA Plate**

Coated with Mouse anti-Human Adiponectin Antibodies

Quantity: 1 plate

Preparation: Ready to Use

Note: Unused strips should be resealed in the foil pouch with the desiccant provided and stored at 2-8°C.

**B. Adhesive Plate Sealer**

Quantity: 1 sheet

Preparation: Ready to Use

**C. 10X HRP Wash Buffer Concentrate**

10X concentrate of 50 mM Tris Buffered Saline containing Tween-20

Quantity: 2 bottles containing 50 mL each

Preparation: Dilute 1:10 with distilled or deionized water

**D. Human Adiponectin Standard**

Purified Recombinant Human Adiponectin, lyophilized.

Quantity: 1 bottle, 0.5mL/bottle upon hydration

Preparation: Contents Lyophilized. Hydrate thoroughly in distilled or de-ionized water immediately before use. Please refer to the analysis sheet for exact concentration. After hydration dilute with Assay Buffer according to § IX. A.

**E. Human Adiponectin Quality Controls 1 and 2**

One vial each, lyophilized, containing diluted human serum at two different levels of Adiponectin.

Quantity: 0.5mL/bottle upon hydration

Preparation: Contents Lyophilized. Reconstitute each vial with 0.5mL distilled or deionized water

**F. 10X Assay Buffer (Sample Diluent)**

100mM Phosphate buffer, pH 7.5, containing 0.08% Sodium Azide, 1% BSA

Quantity: 50 mL

Preparation: Dilute 1:10 with distilled or deionized water to make 1X Assay Buffer

**Note: Use 1X Assay Buffer to dilute samples (Section VIII, SAMPLE PREPARATION) and Standard Curve (Section IX, STANDARD AND QUALITY CONTROLS PREPARATION)**

**G. Assay Buffer A (Assay Running Buffer)**

0.05M Phosphosaline containing 0.025M EDTA, 0.08% Sodium Azide, 1% BSA

Quantity: 7 mL

Preparation: Ready to Use

### III. REAGENTS SUPPLIED (continued)

#### H. Human Adiponectin Detection Antibody

Pre-titered Biotinylated Mouse anti-Human Adiponectin Antibody

Quantity: 3 mL

Preparation: Ready to Use

#### I. Enzyme Solution

Pre-titered Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate in Buffer

Quantity: 12 mL

Preparation: Ready to Use

#### J. Substrate (Light sensitive, avoid unnecessary exposure to light)

3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine in buffer

Quantity: 12 mL

Preparation: Ready to Use.

#### K. Stop Solution (Caution: Corrosive Solution)

0.3 M HCl

Quantity: 12 mL

Preparation: Ready to Use

### IV. STORAGE AND STABILITY

Recommended storage for kit components is 2-8°C.

All components are shipped and stored at 2-8°C. Reconstituted standards and controls can be frozen for future use, but repeated freeze thaws should be avoided. Refer to expiration dates on all reagents prior to use. Do not mix reagents from different kits unless they have the same lot numbers.

### V. REAGENT PRECAUTIONS

#### A. Sodium Azide

Sodium Azide or Proclin has been added to some reagents as a preservative.

Although the concentrations are low, Sodium Azide and Proclin may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Dispose of unused contents and waste in accordance with international, federal, state, and local regulations

#### B. Hydrochloric Acid

Hydrochloric Acid is corrosive and can cause eye and skin burns. It is harmful if swallowed and can cause respiratory and digestive tract burns. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow or ingest.

## VI. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Pipettes and Pipette Tips: 10  $\mu\text{L}$  - 20  $\mu\text{L}$  or 20  $\mu\text{L}$  - 100  $\mu\text{L}$
2. Multi-Channel Pipettes and Pipette Tips: 5  $\mu\text{L}$  ~ 50  $\mu\text{L}$  and 50  $\mu\text{L}$  ~ 300  $\mu\text{L}$
3. Buffer and Reagent Reservoirs
4. Vortex Mixer
5. Deionized Water
6. Microtiter Plate Reader capable of reading absorbency at 450 nm
7. Orbital Microtiter Plate Shaker
8. Absorbent Paper or Cloth

## VII. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

1. To prepare serum samples, whole blood is directly drawn into a centrifuge tube that contains no anti-coagulant. Let blood clot at room temperature for 30 min.
2. Promptly centrifuge the clotted blood at 2,000 to 3,000 $\times g$  for 15 minutes at  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
3. Transfer and store serum samples in separate tubes. Date and identify each sample.
4. Use freshly prepared serum or aliquot and store samples at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  for later use. For long-term storage, keep at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Avoid freeze/thaw cycles.
5. To prepare plasma samples, whole blood should be collected into centrifuge tubes containing enough  $\text{K}_3\text{EDTA}$  to achieve a final concentration of 1.735 mg/mL and centrifuged immediately after collection. Observe the same precautions in the preparation of serum samples.
6. If heparin is to be used as an anticoagulant, the effect on the assay outcome at the dose of heparin used should be pre-determined.
7. Avoid using samples with gross hemolysis or lipemia.

## VIII. SAMPLE PREPARATION

1. Allow all the reagents to come to room temperature.
2. Dilute serum or plasma samples 1:500 in 1X Assay Buffer (Sample Diluent). Cellular extract and culture media dilutions will vary.
3. Make Dilution A with 10  $\mu\text{L}$  sample to 990  $\mu\text{L}$  of 1X Assay Buffer (Sample Diluent) and mix well.
4. Make Dilution B by adding 100  $\mu\text{L}$  of Dilution A to 400  $\mu\text{L}$  of 1X Assay Buffer (Sample Diluent) and mixing well. Use Dilution B (1:500) for the assay procedure.

## IX. STANDARD AND QUALITY CONTROLS PREPARATION

### A. Human Adiponectin Standard Preparation

1. Use care in opening the lyophilized Standard vial. Using a pipette, reconstitute the Human Adiponectin Standard with 0.5 mL distilled or deionized water. Please refer to the analysis sheet for exact concentration. Invert and mix gently until completely in solution.
2. Label seven tubes 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7. Add Assay Buffer (Sample Diluent) to each of the seven tubes according to the volumes outlined in the chart below. Dilute the reconstituted standard stock according to the chart below. Vortex each tube briefly to ensure complete mixing.

Note: Do not use a Repeater pipette. Change tip for every dilution. Wet tip with Standard before dispensing. Unused portions of reconstituted standard should be stored at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ . Avoid multiple freeze/thaw cycles.

Volume of Deionized Water to Add	Volume of Standard to Add	Standard Concentration ng/mL
0.5 mL	0	X (refer to analysis sheet For exact concentration)

Tube #	Volume of Assay Buffer to Add	Volume of Standard to Add	Standard Concentration (ng/mL)
1	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$ of reconstituted Standard	X/2
2	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$ of Tube 1	X/4
3	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$ of Tube 2	X/8
4	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$ of Tube 3	X/16
5	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$ of Tube 4	X/32
6	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$ of Tube 5	X/64
7	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$ of Tube 6	X/128

### B. Human Adiponectin Quality Control 1 and 2 Preparation

Use care in opening the lyophilized Quality Control vials. Using a pipette, reconstitute each of the Human Adiponectin Quality Control 1 and Quality Control 2 with 0.5 mL distilled or deionized water into the vials. Invert and mix gently, let sit for 5 minutes then mix well.

## X. ASSAY PROCEDURE

Pre-warm all reagents to room temperature prior to setting up the assay.

1. Dilute the 10X Wash Buffer concentrate 10 fold by mixing the entire content of each bottle of Wash Buffer with 450 mL deionized water (dilute both bottles with 900 mL deionized water).
2. Remove the required number of strips from the Microtiter Assay Plate. Unused strips should be resealed in the foil pouch and stored at 2-8°C. Assemble the strips in an empty plate holder and wash each well 3 times with 300  $\mu$ L of diluted Wash Buffer per wash. Decant wash buffer and remove the residual amount from all wells by inverting the plate and tapping it smartly onto absorbent towels several times. Do not let wells dry before proceeding to the next step. If an automated machine is used for the assay, follow the manufacturer's instructions for all washing steps described in this protocol.
3. Add 60  $\mu$ L Assay Buffer A to all wells.
4. Add in duplicate 20  $\mu$ L Assay Buffer A to blank wells.
5. Add in duplicate 20  $\mu$ L Human Adiponectin Standards in the order of ascending concentration to the appropriate wells. Add in duplicate 20  $\mu$ L QC1 and 20  $\mu$ L QC2 to the appropriate wells. Add sequentially 20  $\mu$ L of the unknown samples in duplicate to the remaining wells.
6. Add 20  $\mu$ L Detection Antibody to all wells. For best result all additions should be completed within one hour. Cover the plate with plate sealer and incubate at room temperature for 2 hours on an orbital microtiter plate shaker set to rotate at moderate speed, approximately 400 to 500 rpm.
7. Remove plate sealer and decant solutions from the plate. Tap as before to remove residual solutions in the wells.
8. Wash wells 3 times with diluted Wash Buffer, 300  $\mu$ L per well per wash. Decant and tap firmly after each wash to remove residual buffer.
9. Add 100  $\mu$ L Enzyme Solution to each well. Cover plate with sealer and incubate with moderate shaking at room temperature for 30 minutes on the microtiter plate shaker.
10. Remove sealer, decant solutions from the plate, and tap plate to remove the residual fluid.
11. Wash wells 5 times with diluted Wash Buffer, 300  $\mu$ L per well per wash. Decant and tap firmly after each wash to remove residual buffer.

## X. ASSAY PROCEDURE (continued)

12. Add 100  $\mu\text{L}$  of Substrate Solution to each well, cover plate with sealer and shake on the plate shaker for approximately 5 to 20 minutes. Blue color should be formed in wells of Adiponectin standards with intensity proportional to increasing concentrations of Adiponectin.

**Note:** Please be aware that the color may develop more quickly or more slowly than the recommended incubation time depending on the localized room temperature. Please visually monitor the color development to optimize the incubation time.

13. Remove sealer and add 100  $\mu\text{L}$  Stop Solution [**CAUTION: CORROSIVE SOLUTION**] and shake plate by hand to ensure complete mixing of solution in all wells. The blue color should turn to yellow after acidification. Read absorbance at 450 nm and 590nm in a plate reader within 5 minutes and ensure that there are no air bubbles in any well. Record the difference of absorbance units. The absorbance of highest Adiponectin standard should be approximately 2.2-2.8, or not to exceed the capability of the plate reader used.

## XII. CALCULATIONS

The dose-response curve of this assay fits best to a sigmoidal 4- or 5-parameter logistic equation. The results of unknown samples can be calculated with any computer program having a 4- or 5-parameter logistic function. Final results should be multiplied by a 500 dilution factor.

**Note:** When sample volumes assayed differ from 20  $\mu\text{L}$ , an appropriate mathematical adjustment must be made to accommodate for the dilution factor (e.g., if 10  $\mu\text{L}$  of sample is used, then calculated data must be multiplied by 2). When sample volume assayed is less than 20  $\mu\text{L}$ , compensate the volume deficit with assay buffer (sample diluent).

## XIII. INTERPRETATION

1. The assay will be considered accepted when all Quality Control values fall within the calculated Quality Control Range. If any QC's fall outside the control range, review results with a supervisor.
2. If the difference between duplicate results of a sample is >15% CV, repeat the sample.
3. The limit of sensitivity of this assay is 0.2 ng/mL Human Adiponectin (20  $\mu\text{L}$  sample size).
4. The appropriate range of this assay is 1.58 ng/mL to 100 ng/mL Human Adiponectin (20  $\mu\text{L}$  sample size). Any result greater than 100 ng/mL in a 20  $\mu\text{L}$  sample should be diluted using assay diluent, and the assay repeated until the results fall within range.



## 13.3 MANUAL KIT ELISA - INSULINA

### HUMAN INSULIN ELISA KIT 96-Well Plate (Cat. # EZHI-14K and EZHI-14BK)

#### I. INTENDED USE

This Human Insulin ELISA kit is used for the non-radioactive quantification of human insulin in serum, plasma and other biological media. This kit has no cross reactivity to intact human proinsulin and its major processed intermediate, des(31,32) proinsulin; however there can be crossreactivity with the minor intermediate, des(64,65) proinsulin, in serum. One kit is sufficient to measure 38 unknown samples in duplicate.

*This kit is for Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.*

#### II. PRINCIPLES OF PROCEDURE

This assay is a Sandwich ELISA based, sequentially, on: 1) capture of human insulin molecules from samples to the wells of a microtiter plate coated by a pre-titered amount of monoclonal mouse anti-human insulin antibodies and the binding of a second biotinylated monoclonal mouse anti-human antibody to the captured insulin, 2) wash away of unbound materials from samples, 3) conjugation of horseradish peroxidase to the immobilized biotinylated antibodies, 4) wash away of free enzyme conjugates, and 5) quantification of immobilized antibody-enzyme conjugates by monitoring horseradish peroxidase activities in the presence of the substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. The enzyme activity is measured spectrophotometrically by the increased absorbency at 450 nm after acidification of formed products. Since the increase in absorbency is directly proportional to the amount of captured human insulin in the unknown sample, the latter can be derived by interpolation from a reference curve generated in the same assay with reference standards of known concentrations of human insulin.

#### III. REAGENTS SUPPLIED

Each kit is sufficient to run one 96-well plate and contains the following reagents:

- A. Human Insulin ELISA Plate
  - Coated with Mouse Monoclonal anti-Human Insulin Antibodies
  - Quantity: 1 plate
  - Preparation: Ready to Use
  - Note: Unused strips should be resealed in the foil pouch with the desiccant provided and stored at 2-8°C.
- B. Adhesive Plate Sealer
  - Quantity: 1 sheet
  - Preparation: Ready to Use
- C. 10X HRP Wash Buffer Concentrate
  - 10X concentrate of 50 mM Tris Buffered Saline containing Tween-20
  - Quantity: 50 mL/vial
  - Preparation: Dilute 1:10 with deionized water

- D. ELISA Human Insulin Standards  
Human Insulin in Buffer: 2, 5, 10, 20, 50, 100, and 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$   
Quantity: 0.5mL/bottle  
Preparation: Ready to Use  
Note: The standard(s) in this kit have been calibrated to an International Reference standard, NIBSC code # 86/304.
- E. ELISA Quality Controls 1 and 2  
Purified Recombinant Human Insulin in Assay Buffer  
Quantity: 0.5mL/bottle  
Preparation: Ready to Use
- F. Matrix Solution  
Treated Human Serum  
Quantity: 1 mL/vial  
Preparation: Ready to Use
- G. Assay Buffer  
0.05 M PBS, pH 7.4, containing 0.025 M EDTA, 0.08% Sodium Azide, and 1% BSA  
Quantity: 8 mL/vial  
Preparation: Ready to Use
- H. Human Insulin Detection Antibody  
Pre-titered Biotinylated Monoclonal Mouse anti-Human Insulin Antibody  
Quantity: 3 mL/vial  
Preparation: Ready to Use
- I. Enzyme Solution  
Pre-titered Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate in Buffer  
Quantity: 12 mL/vial  
Preparation: Ready to Use
- J. Substrate (TMB)  
3, 3',5,5'-tetramethylbenzidine in Buffer  
Quantity: 12 mL/vial  
Preparation: Ready to use. Minimize the exposure to light.
- K. ELISA Stop Solution  
0.3 M HCl  
Quantity: 12 mL/vial  
Preparation: Ready to Use  
[Caution: Corrosive Solution]

#### IV. STORAGE AND STABILITY

Recommended storage for kit components is 2-8°C .

All components are shipped and stored at 2-8°C. Once opened, liquid standards and controls can be stored up to 30 days at 2-8°C. Refer to expiration dates on all reagents prior to use. Do not mix reagents from different kits unless they have the same lot numbers.

#### V. REAGENT PRECAUTIONS

##### A. Sodium Azide

Sodium Azide or Proclin has been added to some reagents as a preservative. Although the concentrations are low, Sodium Azide and Proclin may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Dispose of unused contents and waste in accordance with international, federal, state, and local regulations.

##### B. Hydrochloric Acid

Hydrochloric Acid is corrosive and can cause eye and skin burns. It is harmful if swallowed and can cause respiratory and digestive tract burns. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow or ingest.

#### VI. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Pipettes and Pipette Tips: 10 $\mu$ L - 20  $\mu$ L or 20 $\mu$ L - 100  $\mu$ L
2. Multi-Channel Pipettes and Pipette Tips: 5 ~ 50  $\mu$ L and 50 ~ 300  $\mu$ L
3. Buffer and Reagent Reservoirs
4. Vortex Mixer
5. Deionized Water
6. Microtiter Plate Reader capable of reading absorbency at 450 nm
7. Orbital Microtiter Plate Shaker
8. Absorbent Paper or Cloth

#### VII. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

1. To prepare serum samples, whole blood is directly drawn into a Vacutainer® serum tube that contains no anticoagulant. Let blood clot at room temperature for 30 min.
2. Promptly centrifuge the clotted blood at 2,000 to 3,000 x g for 15 minutes at 4  $\pm$  2°C.
3. Transfer and store serum samples in separate tubes. Date and identify each sample.
4. Use freshly prepared serum or store samples in aliquots at  $\leq$  -20°C for later use. Avoid freeze/thaw cycles.
5. To prepare plasma samples, whole blood should be collected into Vacutainer® EDTA-plasma tubes and centrifuged immediately after collection. Observe the same precautions in the preparation of serum samples.

## VII. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE (continued)

6. If heparin is to be used as an anticoagulant, the effect on the assay outcome at the dose of heparin used should be pre-determined.
7. Avoid using samples with gross hemolysis or lipemia.

## VIII. ASSAY PROCEDURE

**Pre-warm all reagents to room temperature immediately before setting up the assay.**

1. Dilute the 10X concentrated HRP Wash Buffer 10 fold by mixing the entire content of buffer with 450 mL deionized or glass distilled water.
2. Remove the required number of strips from the Microtiter Assay Plate. Unused strips should be resealed in the foil pouch and stored at 2-8°C. Assemble the strips in an empty plate holder and fill each well with 300  $\mu$ L of diluted HRP Wash Buffer. Incubate at room temperature for 5 minutes. Decant Wash Buffer and remove the residual amount from all wells by inverting the plate and tapping it smartly onto absorbent towels several times. **Do not let wells dry before proceeding to the next step.** If an automated machine is used for the assay, follow the manufacturer's instructions for all washing steps described in this protocol.
3. Add 20  $\mu$ L Assay Buffer to the NSB (Non-Specific Binding) wells and each of the sample wells (refer to IX for suggested well orientations).
4. If samples to be assayed are serum or plasma, add 20  $\mu$ L Matrix Solution to the NSB, Standard, and Control wells. If samples are free of significant serum matrix components, add 20  $\mu$ L Assay Buffer instead.
5. Add in duplicate 20  $\mu$ L Human Insulin Standards in the order of ascending concentration to the appropriate wells.
7. Add 20  $\mu$ L QC1 and 20  $\mu$ L QC2 to the appropriate wells.
8. Add sequentially 20  $\mu$ L of the unknown samples in duplicate to the remaining wells.
9. Add 20  $\mu$ L Detection Antibody to all wells. **For best result all additions should be completed within 30 minutes.** Cover the plate with plate sealer and incubate at room temperature for 1 hour on an orbital microtiter plate shaker set to rotate at moderate speed (approximately 400 to 500 rpm).
9. Remove plate sealer and decant solutions from the plate. Tap as before to remove residual solutions in the wells.
10. Wash wells 3 times with diluted HRP Wash Buffer, 300  $\mu$ L per well per wash. Decant and tap after each wash to remove residual buffer.

### VIII. ASSAY PROCEDURE (continued)

11. Add 100  $\mu\text{L}$  Enzyme Solution to each well. Cover the plate with sealer and incubate with moderate shaking at room temperature for 30 minutes on the microtiter plate shaker.
12. Remove sealer, decant solutions from the plate, and tap plate to remove the residual fluid.
13. Wash wells 5 times with diluted HRP Wash Buffer, 300  $\mu\text{L}$  per well per wash. Decant and tap after each wash to remove residual buffer.
14. Add 100  $\mu\text{L}$  of Substrate Solution to each well, cover plate with sealer and shake on the plate shaker for approximately 5 to 20 minutes. Blue color should be formed in wells of insulin standards with intensity proportional to increasing concentrations of insulin.

**NOTE:** Please be aware that the color may develop more quickly or more slowly than the recommended incubation time depending on the localized room temperature. Please visually monitor the color development to optimize the incubation time. One can monitor color development using 370 nm filter, if available on the spectrophotometer. When the absorbance is between 1.2 and 1.8 at 370 nm, the stop solution can be added to terminate the color development.

15. Remove sealer and add 100  $\mu\text{L}$  Stop Solution

**[CAUTION: CORROSIVE SOLUTION]** and shake plate by hand to ensure complete mixing of solution in all wells. The blue color should turn to yellow after acidification. Read absorbance at 450 nm in a plate reader within 5 minutes and ensure that there is no air bubbles in any well. The absorbance of highest insulin standard should be approximately 1.8 ~ 2.6.

### X. CALCULATIONS

The dose-response curve of this assay fits best to a sigmoidal 4- or 5-parameter logistic equation. The results of unknown samples can be calculated with any computer program having a 4- or 5-parameter logistic function.

**Note:** When sample volumes assayed differ from 20  $\mu\text{L}$ , an appropriate mathematical adjustment must be made to accommodate for the dilution factor (e.g., if 10  $\mu\text{L}$  of sample is used, then calculated data must be multiplied by 2). When sample volume assayed is less than 20  $\mu\text{L}$ , compensate the volume deficit with either matrix solution or assay buffer, whichever is appropriate.

### XI. INTERPRETATION

1. The run will be considered accepted when all Quality Control values fall within the calculated Quality Control Range, if any QC's fall outside the control range, review results with the supervisor.
2. If the difference between duplicate results of a sample is  $>10\%$  CV, repeat the sample.
3. The limit of sensitivity of this assay is 1  $\mu\text{U/mL}$  human insulin (20  $\mu\text{L}$  sample size).
4. The appropriate range of this assay is 2  $\mu\text{U/mL}$  to 200  $\mu\text{U/mL}$  human insulin (20  $\mu\text{L}$  sample size). Any result greater than 200  $\mu\text{U/mL}$  in a 20  $\mu\text{L}$  sample should be repeated on dilution using either matrix solution or assay buffer as diluent, whichever is appropriate, until the results fall within range.