

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PEDIATRIA

**CONCENTRAÇÃO DE NUCLEOSÍDEOS TOTAIS NO LEITE
HUMANO E AVALIAÇÃO DE SUA VARIAÇÃO COM A
IDADE GESTACIONAL E O ESTÁGIO DA LACTAÇÃO**

SÍLVIA RAQUEL MILMAN MAGDALENO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PEDIATRIA

**CONCENTRAÇÃO DE NUCLEOSÍDEOS TOTAIS NO LEITE
HUMANO E AVALIAÇÃO DE SUA VARIAÇÃO COM A
IDADE GESTACIONAL E O ESTÁGIO DA LACTAÇÃO**

SÍLVIA RAQUEL MILMAN MAGDALENO

A apresentação desta dissertação é exigência do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Weissheimer

Porto Alegre, Brasil

1997

M189c Magdaleno, Sílvia Raquel Milman

Concentração de nucleosídeos totais no leite humano e avaliação de sua variação com a idade gestacional e o estágio da lactação / Sílvia Raquel Milman Magdaleno; orient. Clóvis Weissheimer. – Porto Alegre : UFRGS, 1997.

156 f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria.

1 Nucleosídeos : Leite humano. 2 Nucleosídeos : Idade gestacional. 3 Nucleosídeos : Estágio da lactação. I. Weissheimer, Clóvis. II. Título.

C.D.D: 613.28

C.D.U: 613.287.3

À AMANDA, minha filha, que nasceu durante a realização deste trabalho e me proporcionou a oportunidade da descoberta da maternidade e a imensa satisfação de exercê-la em sua plenitude. Sinto apenas por tê-la privado da minha companhia durante as várias horas dedicadas a esta pesquisa, mas esse sentimento fica amenizado com a esperança de que outras crianças, que não tiveram a sua sorte de terem sido amamentadas ao seio, possam, talvez um dia, ao menos receber mais um dos importantes componentes presentes no leite humano e que ainda não foi incorporado à maioria das fórmulas infantis.

Ao FERNANDO, meu marido, pelo apoio, carinho e companheirismo, compartilhando comigo todos os momentos de ansiedade, mas também de alegrias no decorrer deste trabalho, entendendo minha pouca disponibilidade de tempo e auxiliando, sobretudo, no cuidado de nossa filha.

A TODAS AS CRIANÇAS, seres indefesos, que, ao virem ao mundo, têm o direito de receber o melhor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de manifestar minha gratidão a todas as pessoas que preciosamente colaboraram para a realização deste trabalho. De maneira especial, agradeço:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Clóvis Weissheimer que, além de competente professor, proporcionou-me a oportunidade de trabalhar ao seu lado, oferecendo seu auxílio durante a realização desta pesquisa e entendendo minha ansiedade nas etapas finais do estudo.

Aos meus pais, pelo esforço e sacrifício que sempre fizeram com o intuito de proporcionar-me uma formação de nível superior, assim como pelo incentivo e pelo auxílio no cuidado da Amanda.

Aos Drs. Angel Gil, Juan Romera e Carmen Gómez de León, do *Departamento de Investigación y Desarrollo de Abbott Laboratories SA*, em Granada (Espanha), pela decisiva colaboração para a realização deste estudo, determinando as concentrações dos nucleosídeos totais e frações das amostras de leite humano enviadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, por todo o auxílio prestado nos esclarecimentos bioquímicos a respeito da metodologia empregada para obter os resultados pesquisados, bem como pela oportunidade de manusear o novo aparelho de cromatografia líquida de alta pressão do HCPA.

À Equipe da Amamentação do HCPA, em especial à nutricionista Lilia Farret Refosco e à enfermeira Marion Kohlmann, pelo auxílio no encaminhamento das mães ao Banco de Leite, possibilitando a coleta das amostras.

Às funcionárias Esmeralda Correa e Derli Silva Leal, pelo incansável auxílio na coleta das amostras de leite.

Ao Prof. Dr. Mário Bernardes Wagner, pela fundamental assessoria estatística.

À Profa. Dra. Maria do Horto Motta, por todo o seu empenho na revisão deste trabalho.

À Zuleica Santos, pela inesgotável paciência e dedicação na digitação e formatação dos dados e por todo o apoio recebido.

Aos Profs. Drs. Renato Soibermann Procianoy e Newra Tellechea Rotta, pelo incentivo recebido nas etapas finais do estudo.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas da Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital da Criança Conceição, por todo apoio, compreensão e auxílio nas trocas de plantões, necessárias para possibilitar a realização deste trabalho.

Ao colega Arlênio Pereira da Costa, pela prestimosa colaboração, imprescindível ao bom andamento da pesquisa.

Às colegas Denise Neves Pereira e Queila Esteves de Oliveira, pelo incentivo recebido.

Por fim, e na esperança de não ter esquecido ninguém, gostaria de agradecer às mães que concordaram em participar do trabalho, doando seu leite para o estudo, como também aos recém-nascidos cujas mães doaram o seu leite e que, em última análise, deixaram de receber um pouquinho mais do seu precioso alimento.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - BIOQUÍMICA E METABOLISMO	4
1.2 - NUCLEOTÍDEOS NA DIETA	7
1.3 - SIGNIFICADO BIOLÓGICO DOS NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS	12
1.3.1 - Efeitos sobre o Sistema Imunológico	12
1.3.2 - Efeitos sobre a Flora Intestinal	17
1.3.3 - Efeitos sobre o Desenvolvimento e a Reparação Intestinais	18
1.3.4 - Efeitos sobre Tecidos em Crescimento e em Reparação	20
1.3.5 - Efeitos sobre a Absorção do Ferro	20
1.3.6 - Efeitos sobre o Metabolismo Lipídico	21
1.3.7 - Efeitos Hepáticos	24
1.4 - NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS NO LEITE	25
1.5 - IMPLICAÇÕES PARA A NUTRIÇÃO INFANTIL	36

1.6 - LEITE HUMANO – ESTÁGIOS DA LACTAÇÃO.....	38
2 - JUSTIFICATIVA	42
3 - OBJETIVOS.....	45
3.1 - OBJETIVO GERAL.....	45
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4 - MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 - LOCAL DE REALIZAÇÃO.....	47
4.2 - DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	48
4.3 - CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	48
4.4 - POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	49
4.4.1 - População em Estudo.....	49
4.4.2 - Seleção da Amostra.....	49
4.4.3 - Estimativa do Tamanho da Amostra.....	50
4.4.4 - Critérios de Exclusão.....	50
4.4.5 - Coleta, Armazenamento e Transporte das Amostras.....	51
4.5 - VARIÁVEIS EM ESTUDO.....	52
4.5.1 - Idade Materna.....	53
4.5.2 - Cor.....	53
4.5.3 - Paridade.....	53
4.5.4 - Tipo de Parto.....	53
4.5.5 - Idade Gestacional.....	54
4.5.6 - Uso de Fumo, Álcool e Drogas na Gestação.....	54
4.5.7 - Peso no Início da Gestação.....	55
4.5.8 - Peso no Final da Gestação.....	55
4.5.9 - Altura.....	55
4.5.10 - Índice de Massa Corporal e Grau de Nutrição.....	56
4.5.11 - Ganho Ponderal na Gestação.....	56

SUMÁRIO

4.5.12 - Nível Sócio-Econômico	57
4.5.13 - Estágio da Lactação	58
4.5.14 - Determinação das Concentrações de NSs Livres, NTs Livres, RNA, Aductos e NSsT no Leite Humano	59
4.6 - LOGÍSTICA.....	62
4.7 - RESPONSABILIDADE DO PESSOAL ENVOLVIDO NA PESQUISA	64
4.7.1 - Autora do Trabalho.....	64
4.7.2 - Professor Orientador.....	64
4.7.3 - Professores Colaboradores.....	65
4.7.4 - Nutricionista e Técnica de Nutrição.....	65
4.7.5 - Transporte do Material	66
4.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
5 - RESULTADOS.....	67
5.1 - CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO.....	67
5.1.1 - Características Gerais	67
5.1.2 - Características da População de acordo com a Idade Gestacional	73
5.1.3 - Características da População de acordo com o Estágio da Lactação	76
5.2 - ÍNDICES BIOQUÍMICOS.....	80
5.2.1 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite de Puérperas do HCPA.....	80
5.2.2 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Colostro de Mães de PMTs e de Mães de RNs AT.....	81
5.2.3 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite de Transição de Mães de PMTs e de Mães de RNs AT.....	82
5.2.4 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite Maduro de Mães de PMTs e de Mães de RNs AT.....	84
5.2.5 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite de Mães de PMTs nos Três Estágios da Lactação.....	86

SUMÁRIO

5.2.6 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite de Mães de RNs AT nos Três Estágios da Lactação	89
5.2.7 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite de Puérperas nos Três Estágios da Lactação.....	91
5.3 - PORCENTAGEM DE NSs, NTs, RNA E ADUCTOS EM RELAÇÃO AOS NSsT	96
5.4 - REGRESSÃO LOGÍSTICA.....	98
6 - DISCUSSÃO.....	100
7 - CONCLUSÕES	123
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXOS	144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	- Adenina
ADP	- Adenosina difosfato
AEQ	- Amplitude entre quartis
AMP	- Adenosina monofosfato
AT	- A termo
ATP	- Adenosina trifosfato
C	- Citosina
CDP	- Citidina difosfato
CMP	- Citidina monofosfato
CTP	- Citidina trifosfato
DNA	- Ácido deoxirribonucléico
G	- Guanina
GDP	- Guanosina difosfato
GMP	- Guanosina monofosfato
GTP	- Guanosina trifosfato
HCPA	- Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
HGPRT	- Hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase
Hib	- <i>Haemophilus influenzae</i> do tipo B
HPLC	- Cromatografia líquida de alta pressão
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	- Intervalo de confiança

IDP	- Inosina difosfato
Ig	- Imunoglobulina
IMC	- Índice de massa corporal
IMP	- Inosina monofosfato
ITP	- Inosina trifosfato
kg	- Quilograma
l	- Litro
LH	- Leite humano
m	- Metro
MEC	- Ministério da Educação e Cultura
MonoNT	- Mononucleotídeo
NK	- <i>Natural killer</i>
MNT	- Monofosfato de nucleotídeo
NS	- Nucleosídeo
NSsT	- Nucleosídeos totais
NT	- Nucleotídeo
PMT	- Prematuro
PoliNT	- Polinucleotídeo
PUFA	- Ácido graxo poliinsaturado
RiboNS	- Ribonucleosídeo
RiboNT	- Ribonucleotídeo
RN	- Recém-nascido
RNA	- Ácido ribonucléico
SM	- Salário mínimo
SPSS	- <i>Statistical Package for Social Science</i>
SUS	- Sistema Único de Saúde
T	- Timina
TDP	- Timidina difosfato

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TMP	-	Timidina monofosfato
TNPD	-	Total de nucleosídeos potencialmente disponíveis
TTP	-	Timidina trifosfato
U	-	Uracil
UDP	-	Uridina difosfato
UMP	-	Uridina monofosfato
UTI	-	Unidade de tratamento intensivo
UTP	-	Uridina trifosfato
VLDL	-	Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ausência de nucleotídeos na dieta, aumentando a síntese “de novo”(A). Presença de nucleotídeos na dieta, ativando a rota de “salvamento”(B)	3
Figura 2 - Digestão de nucleoproteínas e ácidos nucléicos e absorção de nucleosídeos no trato gastrointestinal.....	8
Figura 3 - Digestão enzimática resultando em nucleosídeos totais disponíveis para a absorção. RNA polimérico e nucleosídeos provenientes dos aductos são hidrolisados até nucleotídeos pela ação de nucleases e pirofosfatases, respectivamente. Nucleotídeos são hidrolisados até nucleosídeos, a forma mais freqüente de absorção intestinal, pela ação da fosfatase alcalina	60
Figura 4 - Anatomia de um <i>box-whisker plot</i>	68
Figura 5 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no colostro de acordo com a classificação de idade gestacional.....	82
Figura 6 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no leite de transição de acordo com a classificação de idade gestacional.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 7 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no leite maduro de acordo com a classificação de idade gestacional	86
Figura 8 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no leite de mães de prematuros de acordo com o estágio da lactação	88
Figura 9 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no leite de mães de recém-nascidos a termo de acordo com o estágio da lactação	91
Figura 10 - Concentração de nucleosídeos presentes no leite de puérperas de acordo com o estágio da lactação	94
Figura 11 - Concentração de nucleotídeos presentes no leite de puérperas de acordo com o estágio da lactação	94
Figura 12 - Concentração de RNA presente no leite de puérperas de acordo com o estágio da lactação	95
Figura 13 - Concentração de aductos presentes no leite de puérperas de acordo com o estágio da lactação.....	95
Figura 14 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no leite de puérperas de acordo com o estágio da lactação	96
Figura 15 - Porcentagens de nucleosídeos, nucleotídeos, RNA e aductos em relação aos nucleosídeos totais de acordo com o estágio da lactação e nos três estágios em conjunto	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Principais bases, nucleosídeos e nucleotídeos e suas respectivas abreviaturas	5
TABELA 2 - Taxa de ganho ponderal recomendada para mulheres grávidas de acordo com o índice de massa corporal pré-gestacional, para gestações a termo.....	57
TABELA 3 - Características gerais da população com relação a idade, peso inicial na gestação, altura e índice de massa corporal.....	70
TABELA 4 - Características gerais da população com relação a cor, tipo de parto, paridade, fumo na gestação, procedência, grau de nutrição no início da gestação, ganho ponderal na gestação e renda <i>per capita</i>	71
TABELA 5 - Características dos grupos estudados com relação a cor, tipo de parto, paridade, fumo na gestação, procedência, grau de nutrição no início da gestação, ganho ponderal na gestação e renda <i>per capita</i>	75
TABELA 6 - Características dos grupos estudados com relação a cor, tipo de parto, paridade, fumo na gestação, procedência, grau de nutrição	

no início da gestação, ganho ponderal na gestação e renda <i>per capita</i>	79
TABELA 7 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no colostro de mães de PMTs e de mães de RNs AT.....	81
TABELA 8 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de transição de mães de PMTs e de mães de RNs AT.....	83
TABELA 9 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite maduro de mães de PMTs e de mães de RNs AT.....	85
TABELA 10 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de mães de PMTs nos três estágios da lactação	87
TABELA 11 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de mães de RNs AT nos três estágios da lactação.....	89
TABELA 12 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de puérperas nos três estágios da lactação	92
TABELA 13 - Porcentagens de NSs, NTs, RNA e aductos em relação aos NSsT de acordo com cada estágio da lactação e nos três estágios em conjunto	97
TABELA 14 - Regressão logística multivariada sobre a concentração de NSsT no leite humano	99
TABELA 15 - Porcentagens de NSs, NTs, RNA e aductos em relação aos NSsT e comparação com dados de literatura	119

RESUMO

O leite materno é considerado o melhor alimento para o lactente, razão pela qual um maior conhecimento sobre sua composição poderia contribuir para aprimorar o entendimento a respeito da nutrição infantil.

Há muitas diferenças entre a composição do leite humano e a de outras espécies animais, sendo uma delas o conteúdo de nitrogênio não-protéico, do qual fazem parte os ácidos nucleicos, os nucleotídeos e os nucleosídeos, entre outros. Recentemente, a potencial importância desses compostos na dieta, especialmente para os lactentes, tem sido sugerida, principalmente em relação ao metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados e das lipoproteínas plasmáticas, ao sistema imunológico, à diferenciação das células intestinais, à modificação na microflora intestinal e ao aumento da bioavaliabilidade do ferro.

Entretanto existem poucos estudos sobre a quantidade e a composição dos nucleotídeos e nucleosídeos no leite humano. Buscando contribuir com mais dados sobre o assunto, procuramos avaliar a concentração de nucleosídeos totais (disponíveis para absorção intestinal) em amostras de leite de puérperas

RESUMO

do HCPA e verificar sua variação com a idade gestacional e com o estágio da lactação. Investigou-se também se haveria alguma influência da idade da nutriz, do grau de nutrição, da renda *per capita* e do uso de fumo na gestação com relação aos valores encontrados. Com esse objetivo, foram coletadas, no Banco de Leite do HCPA, 141 amostras de leite humano, provenientes de 110 mulheres entre 1 e 30 dias pós-parto, no turno da manhã, no período de 02 de julho de 1996 a 21 de junho de 1997. As amostras foram divididas inicialmente em seis grupos, conforme a idade gestacional (leite de mães de prematuros e de mães de recém-nascidos a termo) e o estágio da lactação (colostró, leite de transição e leite maduro).

A metodologia adotada simulou a digestão *in vivo*. Nucleotídeos poliméricos (RNA), nucleotídeos monoméricos e nucleosídeos provenientes dos aductos foram hidrolisados enzimaticamente para nucleosídeos, a forma mais freqüente de absorção pelo intestino. Nucleosídeos livres e os liberados por intermédio da ação de enzimas foram determinados por cromatografia líquida de alta pressão, fornecendo valores correspondentes aos nucleosídeos totais disponíveis para serem aproveitados.

A concentração de nucleosídeos totais no leite de puérperas do HCPA, independentemente do estágio da lactação, apresentou uma mediana de $33,18 \pm 22,58$ mg/l. Não foi encontrada variação estatisticamente significativa na concentração desses compostos em relação à idade gestacional, o mesmo

RESUMO

ocorrendo em relação à idade das nutrizes, ao grau de nutrição, à renda *per capita* e ao uso de fumo durante a gestação.

Quanto ao estágio da lactação, foi observada diferença estatisticamente significativa na concentração de nucleosídeos totais entre os grupos, com a presença de valores significativamente menores no colostro (28,93 mg/l) do que no leite de transição (36,81 mg/l) e no leite maduro (40,55 mg/l).

Os nucleosídeos totais das amostras de leite humano analisadas tiveram um predomínio de nucleotídeos monoméricos (59,6%), seguidos por nucleosídeos livres (16,3%), aductos (13,9%) e RNA (10,2%).

ABSTRACT

Mother's milk is considered the best food for the infant. Greater knowledge regarding its composition could help improve the understanding of child nutrition.

There are many differences between the composition of human milk and that of other animal species, one of them being the non-protein nitrogen content which includes nucleic acids, nucleotides and nucleosides, among others. Recently, the potential importance of these compounds in diet, especially for infants has been suggested, mainly as to the metabolism of polyunsaturated fatty acids and plasma lipoproteins, the immune system, the differentiation of intestinal cells, changes in intestinal microflora and increased bioavailability of iron.

However, few studies exist on the quantity and composition of the nucleotides and nucleosides in human milk. In an attempt to contribute further data on the subject, we tried to evaluate the concentration of total nucleosides (available for intestinal absorption) in samples of the milk of puerperants at the HCPA and look at its variation according to gestational age and stage of lactation. An investigation was also performed to find out whether any of the

following factors would influence the values found: age of the breastfeeding woman, nutritional status, income, and smoking during pregnancy. In order to do so, 141 samples of human milk, from 110 women between 1 and 30 days post-partum were collected in the morning, at the HCPA Milk Bank, from July 2, 1996 to June 21, 1997. The samples were initially divided into six groups according to gestational age (milk from the mothers of premature babies and mothers of full-term newborns) and stage of lactation (colostrum, transitional milk and mature milk).

The methodology adopted simulated *in vivo* digestion. Polymeric nucleotides (RNA), monomeric nucleotides and nucleosides from the adducts were enzymatically hydrolyzed into nucleosides, the most frequent form of intestinal absorption. Free nucleosides and those released by the action of enzymes were determined by high-pressure liquid chromatography, supplying values corresponding to the total nucleosides available for use.

The concentration of total nucleosides in the milk of puerperants at the HCPA, independent of stage of lactation, presented a median of 33.18 ± 22.58 mg/L. No statistically significant variation was found in the concentration of these compounds as to gestational age, and the same occurred as to age of the breastfeeding mothers, nutritional status, per capita income and smoking during pregnancy.

Concerning stage of lactation, a statistically significant difference was observed in the concentration of total nucleosides among the groups, with the

ABSTRACT

presence of significantly lower values in the colostrum (28.93 mg/L) than in the transitional milk (36.81 mg/L) and in mature milk (40.55 mg/L).

The total nucleosides in the human milk samples analysed presented mainly monomeric nucleotides (59.6%), followed by free nucleosides (16.3%), adducts (13.9%) and RNA (10.2%).

1 - INTRODUÇÃO

As primeiras definições na área da Nutrição empregavam a expressão nutriente essencial para designar as substâncias necessárias para manter a vida e prevenir doenças causadas por sua deficiência. Com a expansão dos conhecimentos sobre os processos metabólicos, esse conceito foi ampliado, passando a englobar até traços de nutrientes. Atualmente, definir termos como nutrientes não-essenciais, semi-essenciais, essenciais e substratos é bastante complexo, sendo discutível uma clara separação entre eles (1).

Estudos recentes sugerem que nucleotídeos (NT) e nucleosídeos (NS) na dieta (purinas e pirimidinas) podem ser “condicionalmente” essenciais para animais recém-nascidos (RN). O rápido crescimento dos tecidos, como o epitélio intestinal e as células linfóides, tem uma demanda aumentada de purinas e pirimidinas (2,3,4).

NTs e NSs são compostos intracelulares de baixo peso molecular, considerados como peças-chave em numerosos processos bioquímicos e que desempenham importantes papéis em funções fisiológicas e biológicas (2, 3).

Para que ocorra proliferação celular, é necessário haver biossíntese de NTs, que pode ser obtida por duas vias. A primeira constitui a via “de novo”, na qual os NTs são sintetizados a partir de aminoácidos precursores, sendo os anéis de átomos de carbono das purinas derivados de glicina, glutamina e aspartato, enquanto os das pirimidinas derivam de carbamoil-fosfato e aspartato. A segunda, a via de “salvamento” (ou de “captura”), utiliza os NSs e as bases nitrogenadas a partir da decomposição de NTs dietéticos, a fim de ressintetizar os ácidos nucleicos (2).

Estudos mostram que alguns tecidos possuem uma capacidade limitada para a síntese “de novo” de NTs purínicos, requerendo um suprimento exógeno dessas substâncias pela via de “salvamento” ou a partir do fígado. Células hepáticas têm a síntese “de novo” especialmente ativa; elas não só produzem grande quantidade de purinas e pirimidinas para seu próprio suprimento como também exportam bases necessárias a outros tecidos com rápido *turnover* (4,5,6). Devido à ausência, no intestino delgado, de uma via biossintética “de novo” de purinas, a fonte real dessas purinas pré-formadas é particularmente importante. O significado dessa falta tem despertado o interesse de pesquisadores sobre o papel potencial dos NTs em geral e dos NTs purínicos, especificamente, como fatores de crescimento potenciais ou nutrientes “condicionalmente” essenciais (2, 5, 6, 7). Na ausência de NTs na dieta, a síntese “de novo” das purinas e pirimidinas é ativada; ao contrário, a adição dessas bases à dieta suprime a síntese “de novo” e ativa a rota de “salvamento”, como mostra a figura 1.

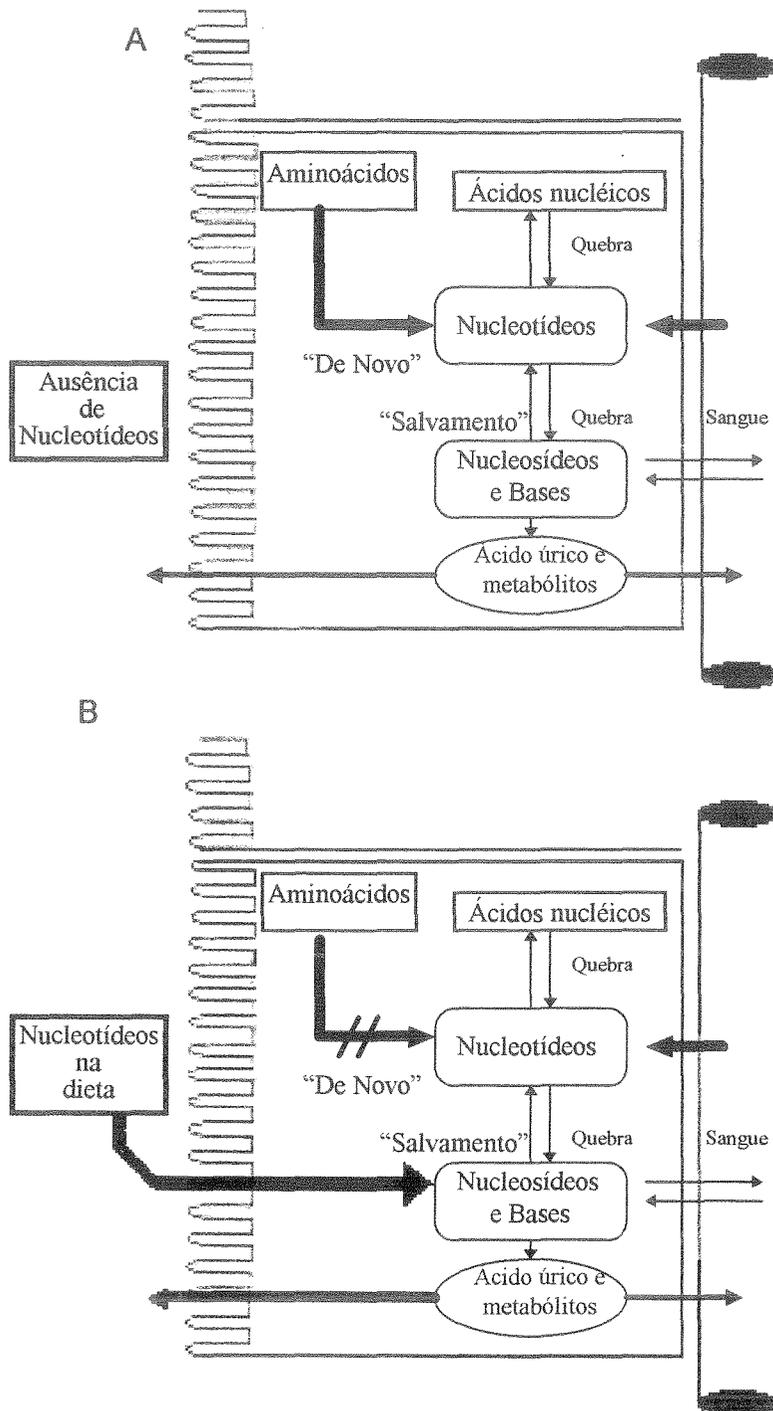


Fig. 1 - Ausência de nucleotídeos na dieta, aumentando a síntese “de novo” (A). Presença de nucleotídeos na dieta, ativando a rota de “salvamento”(B).

Fonte: (4) adaptada

1.1 - BIOQUÍMICA E METABOLISMO

Os NTs contêm três componentes característicos: uma base nitrogenada, uma pentose e um ou mais grupos fosfato. As bases nitrogenadas são derivadas de duas moléculas heterocíclicas, purinas e pirimidinas. As duas principais purinas encontradas em organismos vivos são adenina e guanina, enquanto citosina, timina e uracil são as principais pirimidinas. Bases resultantes do metabolismo de purinas e pirimidinas incluem hipoxantina, xantina, inosina e orotato (2, 4, 8).

NSs e NTs originam-se da substituição nas estruturas de anéis das bases. Um NS é formado pela união de uma pentose com uma base nitrogenada. A pentose pode ser d-ribose, como no ácido ribonucléico (RNA) ou 2-deoxirribose, como no ácido deoxirribonucléico (DNA). Um éster fosfato de um NS é conhecido como NT. As letras A (adenina), G (guanina), C (citosina), T (timina) e U (uracil) designam as bases nitrogenadas. O prefixo d é adicionado se o açúcar no NS é 2-deoxirribose. As letras MP, DP ou TP indicam ésteres mono, di ou trifosfato (9, 10). A tabela 1 mostra, de forma esquemática, as bases, os NSs e os NTs principais e suas respectivas abreviaturas.

TABELA 1
Principais bases, nucleosídeos e nucleotídeos e respectivas abreviaturas

Bases	Nucleosídeos (base+açúcar)	Nucleotídeos (base+açúcar+grupos fosfato)	Abreviaturas
Purinas			
Adenina (A)	Adenosina	Adenosina mono-, di-, trifosfato	AMP, ADP, ATP
Guanina (G)	Guanosina	Guanosina mono-, di-, trifosfato	GMP, GDP, GTP
Hipoxantina	Inosina	Inosina mono-, di-, trifosfato	IMP, IDP, ITP
Pirimidinas			
Citosina (C)	Citidina	Citidina mono-, di-, trifosfato	CMP, CDP, CTP
Uracil (U)	Uridina	Uridina mono-, di-, trifosfato	UMP, UDP, UTP
Timina (T)	Timidina	Timidina mono-, di-, trifosfato	TMP, TDP, TTP

As concentrações de NTs variam muito nos diferentes tecidos, estando o ATP presente nas concentrações mais altas. Em todas as células, concentrações de RNA são maiores do que as de DNA e relativamente constantes, enquanto as concentrações de DNA variam com o estágio do ciclo celular, constituindo apenas 5% a 10% do total de ácidos nucléicos (11, 12).

NTs e ácidos nucléicos são constantemente formados e degradados, especialmente nos tecidos em crescimento, ou naqueles que sofrem constante renovação celular, como a pele, a mucosa intestinal, as células sangüíneas da série

branca e vermelha e o sistema imunológico. Organismos em crescimento também requerem constante formação de DNA e têm uma rápida modificação do RNA (4,8).

O gasto energético da síntese “de novo” das bases nitrogenadas requer significativamente mais energia do que o processo de “salvamento”: 5 mols de ATP contra 1 mol de ATP para cada monofosfato de NT (MNT) produzido. Sendo assim, do ponto de vista evolutivo, a rota de “salvamento” tem uma vantagem seletiva para o rápido crescimento dos organismos (9, 10).

Os NTs e NSs desempenham várias funções metabólicas (4,8,13,14,15,16,17):

- **Metabolismo energético:** ATP é a principal molécula responsável pela transferência de energia química de reações produtoras de energia para reações que requerem energia, servindo também como doadora de fosfato para a geração de outros NTs.
- **Precusores na síntese de ácidos nucleicos:** DNA e RNA são compostos poliméricos formados por unidades monoméricas de NTs. Produzem a informação para o código genético e são também fundamentais para o metabolismo celular.
- **Mediadores fisiológicos:** NTs e seus derivados são mediadores de processos metabólicos. Servem como exemplo, AMP cíclico, mensageiro de muitas ações hormonais e de neurotransmissores; GMP cíclico, mediador de eventos celulares; ADP, crítico para a agregação plaquetária normal, entre outros.

-
- Componentes de co-enzimas, como a co-enzima A, estando envolvidos em várias rotas metabólicas.
 - Atividades intermediárias: NTs servem como carreadores de atividades intermediárias em diversas reações. Por exemplo, UDP – glicose é um intermediário na síntese de glicogênio e de glicoproteínas; GDP – manose, GDP – fucose e UDP – galactose são intermediários na síntese de glicoproteínas; CDP – colina e CDP – etanolamina estão envolvidos no metabolismo fosfolipídico.
 - Agonistas celulares: NTs extracelulares podem funcionar como potentes agonistas, servindo de gatilho para a transmissão de sinais intracelulares. Evidências sugerem a existência de receptores pirimidínicos, em adição aos já bem estudados receptores purínicos.

1.2 - NUCLEOTÍDEOS NA DIETA

Os compostos poliméricos RNA e DNA e as nucleoproteínas são geralmente a fonte primária de NTs na dieta. A digestão das nucleoproteínas é iniciada por proteases. Ácidos nucléicos são submetidos às nucleases pancreáticas, resultando numa mistura de mono, di, tri e polinucleotídeos (PoliNT).

As glândulas intestinais de Brunner e Lieberkuhn secretam fosfoesterases, que suplementam a ação das nucleases pancreáticas na produção de mononucleotídeos

(MonoNT). A transformação de NTs em nucleosídeos é, na maior parte, uma função da fosfatase alcalina intestinal. Em adição à ação desta última, nucleosidases e nucleotidases intestinais atuam para gerar uma mistura de NSs e bases livres (purinas e pirimidinas) (18,19,20), que é oferecida ao enterócito para absorção. Mais de 90% dos NTs ingeridos são absorvidos como NSs, enquanto menos de 5% são incorporados para ácidos nucleicos intestinais e uma quantidade relativamente pequena aparece nas células hepáticas (21, 22).

A figura 2 mostra, de forma esquemática, o que foi exposto acima.

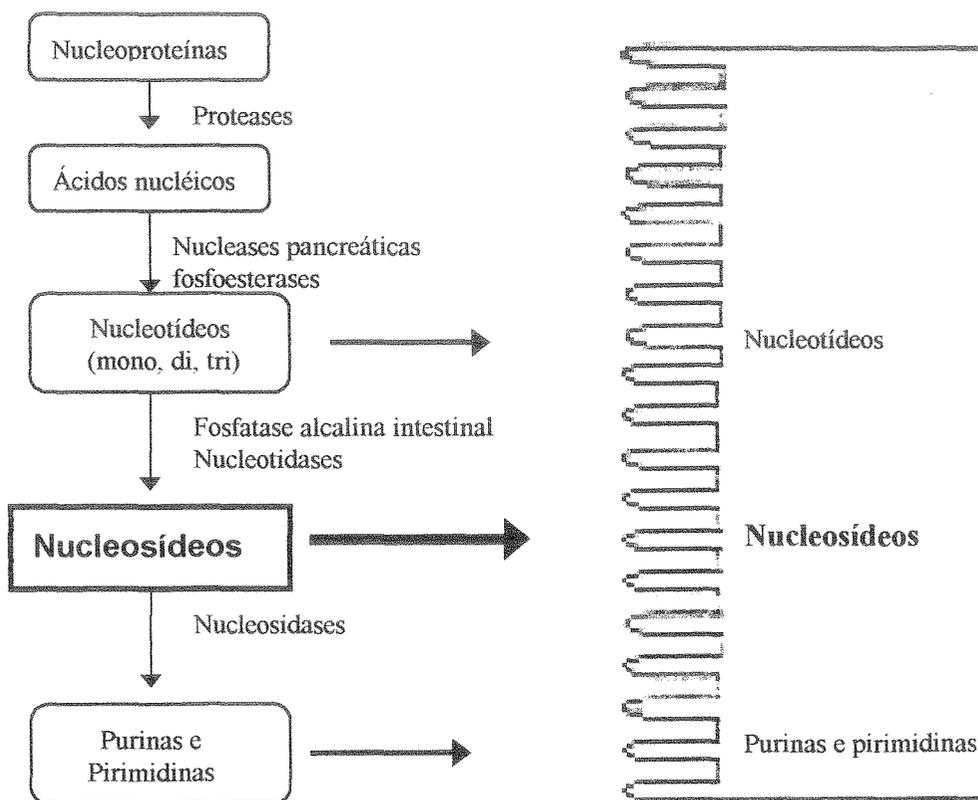


Fig. 2 - Digestão de nucleoproteínas e ácidos nucleicos e absorção de nucleosídeos no trato gastrointestinal

Fonte: (4) adaptada

As implicações da falta de síntese “de novo” envolvem questões a respeito do desenvolvimento intestinal, adaptação após cirurgia e recuperação de enfermidade intestinal aguda ou crônica, incluindo as doenças inflamatórias intestinais. Essas preocupações são ampliadas pela ausência de NTs e NSs em fórmulas nutricionais padronizadas ou dietas elementares. Além disso, os NTs e NSs não estão presentes nas soluções de nutrição parenteral total (23).

Iijima e colaboradores (24) observaram que a nutrição parenteral total está associada com mudanças atróficas na estrutura e nas funções da mucosa intestinal e que ratos que recebiam nutrição parenteral total suplementada com NTs apresentavam conteúdo significativamente mais elevado de proteína e DNA na mucosa intestinal, vilos mais desenvolvidos e níveis aumentados da atividade da maltase e da atividade proliferativa nas células da cripta, quando comparados com ratos não suplementados. A suplementação de NTs, no trabalho realizado, preveniu as mudanças da atrofia da mucosa intestinal induzida pela nutrição parenteral total mais efetivamente do que a de glutamina.

He e colaboradores (25) relataram que, em condições normais, a suplementação com NTs estimulava especificamente a proliferação e diferenciação das células intestinais em cultura e que os NTs exógenos poupavam as necessidades celulares de glutamina para a síntese “de novo” de NTs. Além disso, a suplementação com NTs aumentava a taxa de diferenciação da linhagem celular intestinal *in vitro*. Esses resultados sugerem que os NTs exógenos podem estimular

o crescimento normal e a diferenciação, reduzindo a necessidade de glutamina/aminoácidos para a síntese “de novo” de NTs.

A síntese protéica pode ser aumentada com dieta suplementada com NTs. Um aumento estatisticamente significativo no peso foi observado por György e colaboradores (26) quando ratos que estavam recebendo uma dieta hipoprotéica (10% de caseína) passaram a receber adição de NTs, em comparação com controles sem esse suplemento. Entretanto, quando NTs foram adicionados a uma dieta rica em proteínas (20%), não ocorreu aumento significativo no crescimento. Para avaliar como essa situação poderia se aplicar às crianças, que recebem pouca proteína e altos níveis de NTs através do leite materno, maiores estudos se fazem necessários.

A síntese pode ocorrer por duas rotas alternativas, dependendo do que é ingerido. Quando purinas são ingeridas, uma significativa proporção dessas bases são degradadas rapidamente para formar ácido úrico. O intestino desempenha, então, um importante papel no destino metabólico das purinas da dieta; sabe-se menos sobre a regulação do metabolismo das pirimidinas pelos enterócitos, apesar de recentes evidências sugerirem que grande parte dessas bases são absorvidas e incorporadas para dentro dos ácidos nucléicos (21, 27, 28).

A necessidade de NTs para o desenvolvimento e maturação do trato gastrointestinal e do sistema imunológico pode ser explicada bioquimicamente, já que eles falham ou têm uma capacidade limitada para a síntese “de novo” das bases nitrogenadas (29, 30). Evidências bioquímicas também indicam que, quando NTs

são ingeridos, o intestino ativa a transcrição e a expressão do gene hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (HGPRT), aumentando a rota de “salvamento” ou preformando NSs a partir da dieta (31, 32).

Estudos genéticos têm caracterizado os efeitos nutricionais dos NTs sobre a transcrição do gene HGPRT, demonstrando que, quando várias construções de DNA foram transferidas para diferentes linhagens celulares e situadas em meios com ou sem purinas e pirimidinas exógenas, o efeito das purinas exógenas foi altamente evidenciado apenas nas linhagens celulares intestinais. Quando várias deleções foram realizadas a partir do fragmento genômico com 990 bases pareadas, uma região com aproximadamente 35 bases pareadas pôde ser identificada como aquela que confere especificamente sensibilidade às purinas exógenas. Essa região atua como um local para ligação por meio de uma proteína reguladora e tem sido denominada de elemento regulatório cisatante da HGPRT, o qual confere transcrição gênica específica para o tipo celular, sendo provavelmente regulado por um fator transatante de DNA ligado à proteína (32,33,34).

1.3 - SIGNIFICADO BIOLÓGICO DOS NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS

1.3.1 - Efeitos sobre o Sistema Imunológico

O sistema imunológico do RN encontra-se em um estágio de desenvolvimento rápido. Ao nascimento, o nível de imunoglobulina (Ig) G adquirida da mãe é máximo e as Igs sintetizadas pelo lactente estão começando a surgir. A redução pós-natal abrupta, no lactente, da IgG adquirida da mãe é compensada apenas parcialmente por uma elevação na IgG do lactente. A produção de IgA e IgM ocorre mais lentamente e em níveis menores. No 1º ano de vida, quando o sistema imunológico do lactente ainda está se desenvolvendo, ele é exposto a vários patógenos ambientais, tendo um risco aumentado de desenvolver infecções (35, 36).

O desenvolvimento e a competência do sistema imunológico podem ser influenciados por vários fatores, incluindo os nutricionais: ganho de peso intra-uterino, estado nutricional global, quantidade e tipo de proteína da dieta (35), adequação dos principais micronutrientes da dieta, como vitamina A, zinco e selênio (37-39).

Os lactentes amamentados parecem ter melhor proteção contra alguns patógenos do que os alimentados com fórmula (40, 41). Um dos fatores que pode

contribuir para essa proteção é a presença de NTs, NSs e ácidos nucleicos no leite humano (LH).

A possibilidade de um papel dos NTs exógenos na modulação da resposta imunológica normal tem sido investigada por estudos experimentais. Foi demonstrado que, no camundongo mantido com uma dieta sem NTs, a sobrevida a um transplante cardíaco foi significativamente prolongada quando comparada com o grupo que recebeu esse suplemento. O mecanismo parece envolver diminuição da produção de linfocinas e/ou bloqueio na maturação de linfócitos. Uma dieta sem NTs, combinada com o uso de ciclosporina, aumentou a sobrevida de ratos transplantados cardíacos, quando comparada com o uso isolado de ciclosporina. A adição de adenina ou uracil à dieta reverteu esse efeito (23, 42).

Animais recebendo uma dieta sem NTs tiveram significativa supressão da resposta linfoproliferativa aos antígenos. Similarmente, a resposta de hipersensibilidade cutânea após teste com derivados de proteína purificados foi diminuída no grupo com dieta sem NTs (23). Esses experimentos sugerem que os linfócitos T são alvos de uma deprivação de NTs na dieta, mas os mecanismos responsáveis por esses efeitos permanecem indeterminados.

Defeitos congênitos ou adquiridos no metabolismo dos NTs parecem também estar associados com depressão da função leucocitária (43, 44).

Restrição de NTs na dieta causou diminuição da resistência à sepse por *Staphylococcus aureus* e *Cândida albicans* em camundongos (45,46,47).

Macrófagos dos camundongos que receberam dieta sem NTs também mostraram diminuição da atividade fagocítica, e a adição de NTs na dieta determinou um aumento dessa atividade, juntamente com uma elevação da atividade das células *natural killers* (NK) dos ratos (46,48,49,50).

Carver, Cox e Barness (48) demonstraram, recentemente, que 13 crianças que ingeriram fórmulas com NTs tiveram, aos 2 e aos 4 meses, atividades das células NK e da interleucina-2 similares às de 9 crianças alimentadas ao seio, e esses dois grupos tiveram essas atividades significativamente superiores às de 15 crianças que receberam fórmulas sem NTs.

Estudos adicionais, em hospitais de adultos, mostraram que nutrição enteral contendo ácidos nucleicos, arginina e ácidos graxos ômega-3 preservou a resposta imunológica em pacientes cirúrgicos, quando comparada com um produto sem NTs, com quantidades semelhantes de proteína e energia (51, 52).

Continuam em investigação os efeitos da suplementação de NTs em pacientes com câncer, embora já existam estudos demonstrando melhora da função imune e manutenção da barreira da mucosa intestinal (52, 53).

Em 1995, foi realizado um estudo para avaliar o efeito da alimentação com NTs sobre o sistema imunológico do lactente (54). As respostas imunológicas foram

avaliadas pela resposta do anticorpo às vacinas padronizadas administradas durante o 1º ano de vida (vacinas para difteria, tétano, poliomelite e *Haemophilus influenzae*), considerando que uma resposta apropriada de anticorpos a uma provocação antigênica reflete a integridade funcional do sistema imunológico (55). As vacinas foram selecionadas com base na hipótese de que o efeito do enriquecimento com NTs era inversamente proporcional à potência do antígeno usado na vacina. Como antígeno fraco, a vacina contra *Haemophilus influenzae* do tipo B (Hib) foi aquela que melhor pôde ser usada como parâmetro de diferenciação das respostas imunológicas entre três grupos de lactentes (os alimentados com LH, os com fórmulas com NTs e os sem NTs). Os resultados do estudo indicaram que os lactentes alimentados com fórmula com NTs tiveram uma resposta consistentemente mais elevada do que os que receberam fórmula-controle, sendo que a diferença foi estatisticamente significativa para o Hib, o mesmo ocorrendo em relação à difteria.

Uma das questões levantadas nesse estudo foi se a melhor resposta imunológica poderia levar ao desenvolvimento de uma resposta alérgica. Entretanto não foi observada nenhuma diferença entre os grupos no que se refere à IgE total (produzida em uma resposta alérgica), e a IgE específica da proteína do leite de vaca não foi detectável em nenhum lactente alimentado com fórmula com NTs.

Os indicadores celulares da função imunológica (incluindo a contagem diferencial dos leucócitos e subgrupos de linfócitos) foram semelhantes para os três grupos até o tempo de avaliação de 12 meses. A partir daí, os lactentes que

receberam LH apresentaram significativamente mais linfócitos T e B do que os de fórmula-controle, mas não do que os suplementados com NTs. Nesse estudo, não foram observadas diferenças significativas na atividade das células NK entre os grupos durante o 1º ano de vida. Entretanto o número de células NK foi significativamente mais elevado entre os que receberam LH do que nos outros dois grupos.

Em resumo, os resultados desse estudo documentaram uma maturação aumentada no sistema imunológico entre os lactentes alimentados com a fórmula com NTs, como foi indicado pelas respostas melhoradas de anticorpos à vacina contra Hib. O estudo também demonstrou um crescimento semelhante nos três grupos, conforme os padrões do Centro Nacional de Estatística de Saúde e, uma boa tolerância à fórmula com NTs.

Embora dados em humanos sejam ainda limitados, cabe especular que ácidos nucleicos, NSs e NTs podem ser os componentes do LH que contribuem para o aumento da imunidade das crianças amamentadas ao seio. Isto é encorajado pela observação, em animais, de que a proliferação de tecido linfóide próximo ao intestino aumenta com uma dieta com NSs.

Muitas funções têm sido atribuídas ao grande número de macrófagos encontrados no LH fresco. Os macrófagos protegem a criança contra infecções, e o congelamento ou pasteurização tornam o LH menos anti-infeccioso do que o leite não processado. Macrófagos do LH se replicam e, assim como outras células,

precisam de NTs para proliferar. A única fonte disponível para a proliferação de macrófagos nos bebês amamentados ao seio deve ser a presença de NTs livres no leite (56, 57).

1.3.2 - Efeitos sobre a Flora Intestinal

Por várias décadas, pesquisadores têm conhecimento de que a microflora intestinal de crianças amamentadas ao seio é diferente da de crianças alimentadas com fórmulas de leite de vaca. Bifidobactérias predominam no intestino de crianças amamentadas ao seio, enquanto bactérias gram-negativas são os organismos dominantes nas alimentadas com fórmulas. A porcentagem e a distribuição das bifidobactérias variam com a idade pós-natal e a dieta (58, 59).

NTs modificam a microflora intestinal; experimentos *in vitro* têm revelado que a adição de NTs a bifidobactérias em culturas aumenta seu crescimento (60). Lactentes que ingeriram fórmulas suplementadas com NTs tiveram maior porcentagem de bifidobactérias fecais e menor porcentagem de enterobactérias gram-negativas do que os alimentados com fórmulas convencionais sem NTs (61). Logo, é possível que NTs na dieta possam favorecer o desenvolvimento de uma flora fecal com predomínio de bifidobactérias, similar ao observado em crianças amamentadas ao seio (3, 4).

Bifidobactérias trazem benefícios à criança: baixam o pH do conteúdo colônico, devido à sua capacidade de hidrolisar açúcares para ácido lático, o que suprime a proliferação de bactérias patogênicas, que são intolerantes ao ácido. Além disso, inibem o crescimento de algumas enterobactérias responsáveis, em parte, pela doença diarréica (3, 4, 62).

Diferentes mecanismos podem explicar como os NTs diminuem a incidência de diarréia. O corpo humano sintetiza esses compostos para suprir suas necessidades metabólicas, entretanto o intestino é limitado na sua capacidade da síntese “de novo”, sendo os NTs considerados como semi-essenciais para esse órgão (5, 21).

Adição de NTs à dieta aumenta a regeneração da mucosa e pode também intensificar o efeito do fator de crescimento epidérmico nessa regeneração durante a diarréia, aumentando a síntese de DNA (63,64,65).

1.3.3 - Efeitos sobre o Desenvolvimento e a Reparação Intestinais

Estudos sugerem que NTs promovem crescimento e maturação intestinal no rato jovem. Foram avaliados ratos desmamados e alimentados com uma dieta semi-sintética sem NTs ou com a mesma dieta isocalórica suplementada com 0,8% de NTs, por um período superior a 2 semanas. Altura das vilosidades, profundidade das criptas, atividade da maltase, proteínas totais e DNA do intestino proximal foram maiores nos animais que receberam suplemento de NTs na dieta. Os efeitos foram

mais pronunciados no duodeno e jejuno proximal, que são os segmentos mais expostos a maiores concentrações de NTs derivados da dieta e mais responsivos às mudanças nessa suplementação (65, 66).

Quan e colaboradores (67) demonstraram, em ratos, que a recuperação de injúrias, induzidas após exposições a doses subletais de radiação, aumenta com a ingestão de NTs.

Um potencial benefício da suplementação de NTs durante a recuperação de uma doença diarréica também foi investigado em ratos desmamados, usando um modelo de diarréia crônica lactose-induzida. Após 2 semanas de dieta com lactose, os animais foram randomizados para receber uma dieta semi-sintética controle ou a mesma dieta suplementada com 0,5% de NTs. Após 4 semanas, os animais que receberam suplemento apresentaram maior atividade de maltase, lactase e sucrase e, histologicamente, maior aumento na altura das vilosidades e profundidade das criptas e menos linfócitos intra-epiteliais, demonstrando uma melhor recuperação intestinal (64).

Um estudo randomizado, em crianças, mostrou que uma dieta com NTs suplementares, em concentrações similares às do LH, por um período acima de 3 meses, diminuiu a incidência de diarréia, enquanto a severidade da doença permaneceu inalterada. O número de dias com a doença também foi menor do que o do grupo sem NTs (68).

1.3.4 - Efeitos sobre Tecidos em Crescimento e em Reparação

NTs oferecidos intravenosamente parecem promover a recuperação da injúria induzida por um agente hepatotóxico, a D-galactosamina (69). Tem sido sugerido por pesquisadores que o uso de NTs, em pacientes recebendo nutrição parenteral total após estresse cirúrgico, poderia promover retenção de nitrogênio e aumentar a utilização protéica quando o suplemento da dieta é inadequado. Necessidades dietéticas adicionais para purinas e pirimidinas podem também ser exigidas quando estresse metabólico está presente (24, 53). Os efeitos benéficos dos NTs, nessas circunstâncias, podem ser explicados por promover a imunidade ou, alternativamente, devido ao efeito sobressalente protéico dos mesmos.

Daly e colaboradores (70) relataram menor índice de infecção e complicações relacionadas à cicatrização, bem como redução nos dias de hospitalização, em pacientes tratados cirurgicamente para doença maligna gastrointestinal recebendo nutrição enteral com fórmula enriquecida com ácidos graxos ômega-3, arginina e RNA, quando comparados ao grupo controle que recebia fórmula enteral isonitrogenada padrão.

1.3.5 - Efeitos sobre a Absorção do Ferro

O LH é o único capaz de promover a absorção de ferro e, apesar de os fatores responsáveis por essa capacidade serem desconhecidos, tem sido sugerido que o

conteúdo de inosina pode estar envolvido (71). Inosina e seus metabólitos, hipoxantina, xantina e ácido úrico parecem intensificar a absorção de ferro em ratos pelo aumento da atividade da xantina-oxidase intestinal, enzima isolada e caracterizada no LH. Os sítios de absorção intestinal do ferro são duodeno e jejuno proximal (72,73,74).

Inosina e xantina-oxidase do LH podem desempenhar um papel importante no processo de absorção do ferro, considerando que há um aumento de duas vezes na concentração de IMP do LH no 3º mês de lactação, correspondendo ao período em que as reservas de ferro da criança estão diminuindo (75).

1.3.6 - Efeitos sobre o Metabolismo Lipídico

Estudos em ratos desmamados e em humanos indicam que o metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e das lipoproteínas pode ser modulado pelo suplemento de NTs na dieta precoce (76, 77).

Crianças que ingeriram fórmulas suplementadas com NTs mostraram, após o 1º mês de vida, maior concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL colesterol), similarmente a crianças amamentadas ao seio, e aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia longa (acima de 18 carbonos n-3 e n-6) (78, 79). Lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL colesterol) aumentaram em todas as crianças durante o 1º mês de vida, mas, após esse período, as crianças

amamentadas ao seio ou as alimentadas com suplemento de NTs tiveram colesterol VLDL mais baixo do que as que receberam fórmula sem suplemento (80).

Os mecanismos ainda precisam ser elucidados, mas estudos sugerem que os NTs facilitam a apossíntese e também a síntese de fosfolipídios pelo aumento da disponibilidade dos derivados da CDP. A combinação desses dois efeitos poderia aumentar a síntese de lipoproteínas, sendo o fígado e o intestino os principais órgãos envolvidos nesse processo (79, 80).

Quando a concentração de orotato na dieta é superior a 0,1%, se desenvolve fígado gorduroso devido a uma inibição da secreção de lipoproteínas pelo fígado (81, 82).

Martínez (83) sugere que a ingestão de uma fórmula láctea sem ácido orótico e suplementada com NTs em quantidades similares às do LH faria com que o padrão de ácidos graxos plasmáticos fosse semelhante ao do RN que mama ao seio, concluindo que os NTs teriam, então, um papel no metabolismo lipídico.

O LH possui um conteúdo elevado de colesterol (15-22 mg/dl) em relação às fórmulas infantis (2 mg/dl). Pesquisas sugerem que o colesterol no LH, juntamente com a taurina, formaria o ácido taurocólico, que determinaria uma melhor absorção de gorduras nos bebês alimentados ao seio (84, 85).

Gordura na dieta influencia qualitativamente ácidos graxos séricos neonatais. Mudanças na dieta, especialmente nos PUFAs de cadeia longa, ocasionam

modificações na fração fosfolipídica da membrana celular. Foram estudados os efeitos dos NTs na dieta dos RNs a termo (AT) e prematuros (PMT) sobre os componentes dos ácidos graxos da membrana eritrocitária e sérica. PUFAs de cadeia longa com mais de 18 carbonos da série ômega-6 aumentaram significativamente nas crianças amamentadas ao seio ou nas que receberam fórmulas com NTs, em comparação àquelas que receberam fórmulas convencionais. NTs adicionados às fórmulas afetaram as concentrações plasmáticas das lipoproteínas nos PMTs significativamente mais do que nas crianças AT. Esses achados sugerem que NTs na dieta poderiam aumentar a síntese de lipoproteínas durante o período neonatal precoce, especialmente em PMTs (86,87,88).

As atividades enzimáticas para dessaturação e alongamento dos ácidos graxos da dieta necessários à produção de PUFAs de cadeia longa são extremamente importantes no desenvolvimento cerebral, pois esses ácidos graxos são componentes estruturais do sistema nervoso. Além disso, são precursores para a síntese de substâncias biologicamente ativas, como prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e leucotrienos (89). O LH tem um bom suplemento de PUFAs de cadeia longa pré-formados (90,91,92).

O conteúdo de fosfatidilcolina e a sua razão em relação à fosfatidiletanolamina no córtex cerebral de ratos alimentados com dieta com NTs foram significativamente maiores do que no de ratos com dieta sem NTs. Os níveis de ácido docosaexaenóico e ácido aracdônico na fração de fosfatidilcolina cerebral

foram maiores nos ratos que receberam NTs. Segundo esse trabalho, o uso de NTs na dieta poderia influenciar o metabolismo lipídico do córtex cerebral e contribuir para o aumento da habilidade de aprendizado em ratos (93).

1.3.7 - Efeitos Hepáticos

O fígado tem um importante papel na síntese ativa de NTs no organismo e na sua liberação para uso em outros tecidos (2). O suprimento hepático é mantido pela síntese “de novo” e “salvamento” (94, 95). NTs e NSs extra-celulares modulam o crescimento e a regeneração dos hepatócitos. Após injúria hepática, a síntese e o “salvamento” de NTs são ativados e a regeneração de novos tecidos é acompanhada por síntese acelerada de RNA e DNA (96).

Pesquisa realizada por Ogoshi e colaboradores (97) mostrou que uma mistura parenteral de NTs e NSs aumentou a função hepática e promoveu uma restauração mais precoce do balanço nitrogenado após injúria hepática ou hepatectomia parcial em ratos. Quando a mistura foi infundida 72 horas após hepatectomia parcial em coelhos, a taxa de fosforilação mitocondrial e a concentração de DNA no fígado remanescente aumentaram (97, 98).

Novak e colaboradores (99) relataram que ratos desmamados alimentados com uma dieta sem NTs tiveram aumento do colesterol hepático e das bilirrubinas e

redução do peso do fígado (como porcentagem do peso corporal) e do glicogênio, quando comparados a animais que receberam 0,21% de NTs na dieta.

Esses estudos sugerem que a administração exógena de NTs pode afetar a composição e a função hepáticas, principalmente nas situações de doença ou injúria do fígado, quando sua capacidade de síntese de NTs está diminuída.

1.4 - NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS NO LEITE

O leite materno, o aleitamento e o bebê amamentado têm sido considerados há muito tempo os padrões de referência da alimentação infantil. Historicamente, os lactentes que não eram amamentados pela mãe biológica ou ama-de-leite apresentavam um pior prognóstico e muitos morriam. O advento de uma fórmula infantil, no século XX, forneceu uma alternativa segura para o LH (100).

Desde a fabricação da primeira fórmula, com níveis apropriados dos principais nutrientes, estimulando a sobrevivência de lactentes alimentados com leite não humano, houve uma rápida evolução das fórmulas para lactentes. Usando a composição do LH como modelo, os cientistas identificaram e acrescentaram os primeiros micronutrientes (ferro e zinco) e, subsequentemente, os nutrientes semi-essenciais (taurina e carnitina) (100).

Os valores dos nutrientes do LH mudam durante a lactação (100). Existe uma variabilidade substancial de mulher para mulher e de dia para dia nos nutrientes

individuais do LH. Parte dessa variabilidade pode estar relacionada com a dieta materna, que influencia, por exemplo, as concentrações de vitamina B e os tipos de ácidos graxos (101, 102).

NTs foram primeiramente isolados no LH há aproximadamente 30 anos. Contribuem com 2% a 5% do nitrogênio não-protéico no LH, que corresponde a cerca de 25% a 30% do nitrogênio total no LH (103,104,105,106).

Em contraposição, o nitrogênio não-protéico constitui apenas 2% do nitrogênio total na maioria das fórmulas produzidas com leite de vaca. Outra diferença entre o LH e o de vaca é a razão dos NTs específicos. O LH contém concentrações relativamente elevadas de CMP, UMP, AMP e GMP, enquanto o IMP é encontrado em quantidade pequena ou não é encontrado. Já o leite de vaca processado contém apenas níveis baixos de UMP e CMP e quantidades pequenas ou traços de AMP e GMP (107, 108).

Muitas pesquisas têm sido feitas no sentido de avaliar as diferenças na composição do leite entre as espécies, mas relativamente pouca atenção vinha sendo dada aos constituintes menores do leite.

Vários autores têm descrito diferenças no conteúdo de NTs entre as espécies de mamíferos (105, 109, 110). Kobata e colaboradores (103), em 1962, foram os primeiros a determinar o conteúdo de NTs no LH e bovino, utilizando cromatografia de troca de íons e eletroforese para isolar cada NT. Devido à baixa sensibilidade do

método, eram necessários 2 litros de leite para essa determinação e as mudanças na composição do leite durante a lactação não puderam ser analisadas.

Gil e Sánchez-Medina (107), em 1981, estudaram a variação na composição de NTs no leite de ruminantes (vaca, ovelha e cabra) em diferentes estágios da lactação, por cromatografia com troca de íons e métodos enzimáticos. Acharam que o conteúdo de NTs no colostro foi qualitativamente similar, mas quantitativamente distinto, aumentando imediatamente após o parto, chegando a níveis máximos em 24 a 48 horas e diminuindo com o avanço da lactação.

O leite de vaca contém grande quantidade de ácido orótico, o qual aumenta com o avanço da lactação, em comparação com os níveis de orotato do leite de cabra e do de ovelha. O conteúdo de NTs no leite de vaca é 4 a 5 vezes menor do que nos outros dois leites, em estágios similares da lactação (107).

Schlimme e colaboradores (108), em 1991, avaliaram a concentração de ribonucleosídeos (RiboNS) no leite bovino em função do estágio da lactação. Com exceção do colostro, os níveis de RiboNSs variaram pouco durante o período de lactação, embora se saiba que sua distribuição segue um padrão específico para cada espécie. As mais altas concentrações de RiboNSs (particularmente uridina) encontradas no colostro suscitam discussões sobre as causas lactobioquímicas desses achados. Deve ser esclarecido, por exemplo, se a sua origem no leite é humoral e/ou local. No primeiro caso, RiboNSs passam do sangue para o leite através da barreira sangue-leite. No segundo caso, eles resultam do processo

metabólico na glândula mamária e são excretados pelas células de lactação para o lúmen alveolar ou formados por processos metabólicos pós-secretórios no leite. Logo, tanto a alta atividade metabólica da glândula mamária quanto o aumento da taxa de transferência dos RibonNs circulantes no sangue, através da barreira sangue-leite, nos primeiros dias pós-parto, podem ser considerados para explicar as variações bioquímicas detectadas. Durante esse período, o colostro contém alta proporção dos constituintes do sangue. Além disso, processos metabólicos atribuídos a enzimas do leite (como fosfatase alcalina), células somáticas e microorganismos são marcadamente pronunciados no colostro.

Recentemente, a potencial importância dos NTs na dieta, especialmente na alimentação infantil, tem sido considerada. Como o LH é relativamente rico em NTs, em comparação a outros leites, têm surgido alguns estudos a respeito da quantidade e da composição dos NTs no LH. Existe alguma variação nesses valores, sendo desconhecido o quanto dessa variação poderia ser atribuída aos métodos de preparação das amostras ou aos procedimentos analíticos (106,111,112,113,114).

Estudos iniciais de japoneses e alemães apontaram determinações de NTs derivadas de repetidas cromatografias de troca de íons de amostras de LH desproteínizado e deslipidizado (103,104,105,115,116). Mais recentemente, alguns pesquisadores passaram a avaliar NTs usando cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), após desproteínização do leite com ácido perclórico (114). Outros procuraram determinar níveis de NTs cíclicos no LH por radioimunoensaio de

amostras desproteinizadas e deslipidizadas (117). Um importante fator na determinação de NTs refere-se à atividade da fosfatase no leite, transformando NTs em NSs (118). O ideal seria utilizar uma metodologia *standard* tanto para coletar quanto para analisar com clareza as características dos NTs no LH ou no de outras espécies.

Sanguansermri e colaboradores (12), em 1974, relataram níveis de DNA de 10-20 mg/l e níveis de RNA de 100-600 mg/l no LH coletado entre o 5º dia e a 8ª semana de lactação.

Ho e colaboradores (119), em 1979, observaram pequenas variações na contagem absoluta de células e na proporção dos tipos de leucócitos do período pré-parto em relação ao pós-parto imediato. A contagem total de células diminuiu assim que a lactação ficou estabelecida e a porcentagem de macrófagos aumentou, enquanto a de polimorfonucleares diminuiu; os linfócitos permaneceram constantes. Após as duas primeiras semanas, entretanto, embora a contagem de células tenha diminuído, o volume de leite produzido aumentou, fazendo com que o número total de leucócitos permanecesse constante.

Janas e Picciano (114), em 1982, coletaram 16 amostras de leite de 5 mulheres no decorrer da 2ª a 12ª semana pós-parto e avaliaram o conteúdo de nitrogênio total e NTs com a utilização de HPLC. Embora tenham determinado o conteúdo de 9 NTs, não mencionaram nada sobre NSs. Observaram que, com a progressão da lactação, os níveis de CMP e AMP declinaram de 594 a 321 µg/100 ml e de 244 a

143 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, respectivamente, enquanto os níveis da IMP aumentaram de 158 para 290 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ e os níveis totais de NTs permaneceram constantes. Das amostras analisadas, os NTs corresponderam a 0,1% a 0,15% do conteúdo de nitrogênio total do LH. Constataram também que a concentração de nitrogênio total no LH diminuiu com a progressão da lactação e que era maior nas amostras coletadas à tarde do que nas coletadas pela manhã. Esses autores foram os primeiros a estudar a presença de IMP no LH.

Há estudos mostrando que IMP pode contribuir para a maior absorção de ferro observada nas crianças amamentadas ao seio (71, 75). Apoiando esses estudos, o trabalho de Janas e Picciano mostra um aumento nos níveis de IMP no LH justamente no período em que os estoques de ferro da criança estão diminuindo.

Gil e Sánchez-Medina (113), em 1982, avaliaram os NTs ácido-solúveis no LH por análises enzimáticas e cromatografia com troca de íons, nos diferentes estágios de lactação. Embora o método utilizado seja bastante sensível, necessita de uma quantidade grande de leite e o procedimento é um pouco lento. Observaram a presença de CMP, AMP, GMP, UMP, GDP-manose, UDP-N-acetil-glicosamina, UDP-N-acetil-galactosamina, UDP-glicose, UDP-galactose, UDP e outros NTs menores.

O padrão de NTs encontrado no leite maduro e no colostro foi qualitativamente similar. Entretanto a concentração dos NTs no leite maduro foi menor do que no colostro e diminuiu com o avanço da lactação. A composição dos

NTs no LH foi muito diferente da do leite de vaca. O conteúdo encontrado de NTs no LH foi de 10–15 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ de leite. Os derivados da citidina e da adenosina no LH representaram 25% do total de NTs, estando presentes em relativamente maiores concentrações do que no leite de outras espécies.

O LH difere do leite dos ruminantes principalmente em relação à ausência de quantidades detectáveis de ácido orótico. No trabalho realizado, foi confirmado que o colostro e o leite maduro humanos não contêm orotato, que é o principal componente dos NTs ácido-solúveis do leite de vaca.

Quinty e colaboradores (120), em 1992, utilizando a técnica de HPLC, quantificaram níveis de MNTs no LH e demonstraram que esses níveis não variaram em relação ao início, meio ou final da mamada. Ao comparar o horário das coletas, observaram mínimas variações entre as da manhã, meio-dia e tarde. Nesse estudo, os níveis de MNTs tenderam a ser constantes para cada doadora, mas foram observadas substanciais diferenças entre as 18 doadoras. Foram quantificados CMP ($26,0 \pm 6,0\ \mu\text{g/l}$), UMP ($3,1 \pm 1,4\ \mu\text{g/l}$), GMP ($0,7 \pm 0,4\ \mu\text{g/l}$), IMP ($<0,3\ \mu\text{g/l}$), AMP ($0,8 \pm 0,5\ \mu\text{g/l}$).

Sugawara e colaboradores (112), em 1995, avaliaram o conteúdo de NTs e NSs do LH com um novo método de HPLC, capaz de analisar os NTs e os NSs simultaneamente e com apenas 5 ml de leite. As amostras foram agrupadas conforme a estação do ano, o período da lactação e a área geográfica. Três tipos de NSs (citidina, uridina e adenosina) e 6 tipos de NTs (5'-CMP, 5'-UMP, 5'-AMP,

5'-GMP, 5'-IMP e 5'-CDP) foram detectados, sendo que citidina, 5'-CMP e 5'-CDP predominaram durante toda a lactação. Isso sugere que citidina e seus NTs derivados possam ser os componentes-chave dos NTs e NSs no LH. A quantidade total de NTs e NSs foi maior no inverno do que no verão, possivelmente porque as crianças necessitem mais NTs nessa estação do ano, embora as razões para isso sejam desconhecidas. Os resultados desse estudo sugerem que os hábitos alimentares poderiam afetar os NTs e os NSs no LH, mas para clarificar essas observações seriam necessárias maiores informações sobre as diferenças dos hábitos alimentares nas várias áreas do Japão, onde o trabalho foi realizado.

Paralelamente a isso, não foram detectados NSs no leite bovino nem nas fórmulas infantis (feitas com leite de vaca) e o leite bovino contém muito menos NTs do que o LH, sugerindo que os NTs e os NSs encontrados no LH podem desempenhar importante papel no desenvolvimento da criança.

Leach e colaboradores (111), em 1995, avaliaram a disponibilidade fisiológica dos NTs no LH, considerando todas as fontes de NTs que poderiam ser absorvidas como NSs durante a digestão, ou seja, o total de nucleosídeos potencialmente disponíveis (TNPD) do LH, de acordo com o estágio da lactação. Nesse trabalho, o TNPD foi constituído por NTs poliméricos (RNA), NTs monoméricos (livres), NSs livres e NSs provenientes dos aductos (compostos formados por NS-fosfato-fosfato-X, onde X é um açúcar diferente da ribose ou deoxirribose, como por exemplo, UDP-galactose). Foram coletadas amostras de 100 mulheres de 3 países da Europa e

agrupadas conforme o estágio da lactação, assim como amostras de 11 mulheres americanas, com o objetivo de testar os efeitos da cultura e da dieta. A metodologia simulou a digestão *in vivo*. Tanto os NSs livres originais quanto os liberados enzimaticamente foram quantificados por HPLC, para determinar o TNPD.

A concentração média do TNPD de 16 grupos derivados de 100 amostras individuais das mulheres europeias foi de 189 ± 70 μmol de NS/l de LH (variação de 82 a 402 $\mu\text{mol/l}$). As médias ($\mu\text{mol/l}$ de LH) de cada NS foram: 38 para uridina, 88 para citidina, 31 para guanosina e 32 para adenosina. Esses valores incluíram a contribuição da porção celular do LH. Apenas 1 dos 16 grupos de amostras misturadas continha uma quantidade mensurável de inosina (4 $\mu\text{mol/l}$) e em outros 8 havia apenas traços. Os autores consideram que, como o LH contém uma atividade enzimática (adenosina-deaminase) que converte a adenosina em inosina, nos trabalhos prévios, a presença de inosina no LH provavelmente tenha representado apenas um artefato.

O TNPD nas amostras de LH teve um predomínio de NTs monoméricos ($36 \pm 10\%$) e poliméricos ($47 \pm 8\%$). NSs livres ($8 \pm 6\%$) e NSs provenientes dos aductos ($9 \pm 4\%$) tiveram pequena, mas significativa contribuição, já que os aductos colaboram com grande parte da uridina encontrada no LH ($27 \pm 12\%$). Vários estudos sugerem que a uridina possa ser responsável pela maioria dos efeitos imunológicos atribuídos aos NTs (23, 45, 47, 49). Esse estudo demonstra que a dosagem tradicional apenas do conteúdo de NTs livres do LH (que não considera

nem os NTs poliméricos nem os aductos) subestima o total de NTs potencialmente disponíveis para o lactente em aproximadamente 50%. Citidina foi o NS presente em maior concentração ($88 \pm 24 \mu\text{mol/l}$). Houve uma variação substancial na concentração do TNPD em cada estágio e durante toda a lactação entre as amostras de leite individuais. Como a dieta varia com a nacionalidade, a dieta materna individual não foi considerada como fator de influência nessa variação. As amostras de colostro apresentaram níveis um pouco mais baixos do TNPD do que as amostras de estágios mais tardios de lactação. Não houve uma relação consistente entre a concentração do TNPD, o estágio da lactação ou o país europeu no qual as mulheres residiam, e os resultados foram similares aos das amostras de leite de mulheres americanas.

Thorell e colaboradores (121), em 1996, estudaram o leite humano de 14 mulheres, após a lactação já estabelecida, com relação à concentração dos ácidos nucleicos e metabólitos dos ribonucleotídeos (RiboNT). Expressos como NTs equivalentes, $68 \pm 55 \mu\text{mol/l}$ estavam presentes como ácidos nucleicos, $84 \pm 25 \mu\text{mol/l}$ como NTs e $10 \pm 2 \mu\text{mol/l}$ como NSs. O perfil de NTs/NSs mostrou um substancial predomínio de pirimidinas e ácido úrico. Esse perfil específico poderia ser resultado da limitada catálise durante a permanência do leite no seio, uma vez que enzimas capazes de degradar NTs foram encontradas no leite.

NTs 5'-CMP e 5'-UMP foram registrados em níveis maiores que 5'-GMP e 5'-AMP, enquanto 5'-IMP não foi detectado, assim como no estudo de Leach e

colaboradores (111). Dos NSs, só foram identificadas citidina e uridina. Guanina foi detectada em pequena quantidade em apenas 4 amostras, enquanto ácido úrico (produto final do catabolismo das purinas em humanos) esteve presente em quantidade relativamente alta em todas as amostras. Ácido orótico não foi detectado.

Se os NSs e os NTs no LH são ativamente secretados para o leite em resposta a uma demanda nutricional do lactente ou indiretamente como resultado de eventos metabólicos dentro das células secretórias mamárias é, até o momento, um fato desconhecido.

Nessa pesquisa, foram incubadas amostras de leite fresco e congelado, para avaliar a digestão enzimática. O leite contém a seqüência completa de enzimas necessária para converter NTs purínicos em ácido úrico. Essas enzimas, assim como os ácidos nucleicos, podem originar-se dos vários tipos de células identificadas no LH durante a lactação (119). Como NSs pirimidínicos acumularam durante a incubação, isso mostra que as enzimas responsáveis por sua degradação foram menos ativas ou ausentes. As mudanças que ocorreram durante a incubação foram similares, independentemente de o leite ser fresco ou congelado antes da incubação.

Para avaliar a capacidade endógena do RN em metabolizar RNA e NTs, foi analisado o intestino delgado de um feto de 22 semanas de idade gestacional em relação às enzimas digestivas. Esse intestino transformou RNA em citidina, uridina e ácido úrico *in vitro*.

Os resultados dessa investigação sugerem que PMTs poderiam ter capacidade de digerir RNA, assim como NTs e NSs e, portanto, a suplementação de fórmulas infantis com RNA, NSs e NTs ou uma combinação deles poderia ser importante. Entretanto mais estudos são necessários para esclarecer se os processos digestivos do RN têm suficiente capacidade ou se NTs e NSs presentes no leite têm o objetivo de auxiliar a baixa capacidade digestiva endógena.

1.5 - IMPLICAÇÕES PARA A NUTRIÇÃO INFANTIL

Ácidos nucleicos, NTs e seus produtos metabólicos estão presentes no LH numa quantidade relativamente grande: cerca de 2% a 5% do nitrogênio não-protéico consistem de NTs livres, enquanto a maioria das fórmulas infantis tem poucos NTs e de diferentes tipos (3, 4, 122). Ácidos nucleicos de células presentes no LH também podem ser considerados uma fonte disponível de NTs para as crianças amamentadas ao seio.

Estima-se que um RN a termo, amamentado ao seio, recebe 10 a 20 mg/dia de NTs livres e 100 a 150 mg/dia de ácidos nucleicos, provenientes das células do LH (4, 12). A quantidade de NTs necessária para repor a perda oxidativa foi estimada em 120 mg/dia, e a quantidade depositada em novos tecidos formados foi de 360 mg/dia. Logo, um total de 480 mg/dia (aproximadamente 160 mg/kg) seria necessário; para uma criança amamentada ao seio, em torno de um terço poderia vir

do “salvamento” de NTs e, para os alimentados com fórmula, acima de 95% viriam da síntese “de novo”(4).

A estimativa do metabolismo das bases nitrogenadas para um neonato de 3 kg apóia-se nas seguintes suposições:

- O conteúdo total de NTs corporais é de 12 g/kg de peso corporal.
- A excreção de ácido úrico é 10 mg/kg/dia.
- O *pool* de NTs corporais e a velocidade de quebra são similares para purinas e pirimidinas.
- A maioria dos NSs e bases (90%) derivados da quebra de NTs são reutilizados via rota de “salvamento”.
- Um mol de ácido úrico excretado é associado com uma quantidade equimolar da oxidação de purinas e pirimidinas.
- O conteúdo total de NTs para o ganho tecidual para um neonato a termo é 12 mg/g de peso corporal ganho.

Testes clínicos controlados, com suplementação de NTs, indicam que o presente nível de adição não demonstrou efeitos adversos. Essa avaliação vem incluindo um longo período de testes controlados em humanos (acima de 9 a 12 meses de alimentação), mostrando crescimento e achados clínico-laboratoriais similares no grupo alimentado com NTs em relação ao grupo controle (4).

Estudos semelhantes, feitos em PMTs, mostraram que a suplementação com NTs é segura e que as crianças alimentadas com NTs assemelhavam-se mais às alimentadas com LH: as mudanças induzidas na flora fecal aumentaram o crescimento de bifidobactérias e inibiram o crescimento de bactérias entéricas gram-negativas; além disso, mudanças nos lipídios, como aquelas das crianças alimentadas ao seio, têm sido demonstradas durante os primeiros meses de vida (3, 122).

Estudos futuros são necessários para proporcionar mais informações sobre os efeitos potenciais de fórmulas suplementadas com NTs em relação ao crescimento intestinal e sua maturação, à reparação de injúrias, ao desenvolvimento imunológico normal e à absorção de ferro. Se for confirmado o potencial impacto biológico positivo dos NTs na dieta no início da vida, a suplementação de NTs nas fórmulas infantis necessitará ser considerada com especial atenção.

Sendo o LH considerado o “padrão-ouro” para a alimentação infantil precoce e sendo ele relativamente rico em NTs quando comparado aos outros leites, cabe estudá-lo como base inicial para ampliar os conhecimentos atuais.

1.6 - LEITE HUMANO – ESTÁGIOS DA LACTAÇÃO

O estágio da lactação é o fator mais importante na determinação da composição e do volume do leite. A lactogênese ocorre em dois estágios (123). O

estágio 1 compreende o desenvolvimento da glândula mamária e de sua capacidade de sintetizar leite durante o final da gravidez. O 2º estágio refere-se à “descida” do leite. No 1º estágio predomina o colostro. O período no qual o colostro progressivamente se modifica até atingir as características do leite maduro varia de mãe para mãe; assim, o número de dias pós-parto parece ser uma inadequada definição para colostro. Humenick (124), em 1987, desenvolveu um Índice de Maturação de Colostro e Leite para medir a maturação do leite materno. A autora verificou que aproximadamente 40% das mulheres ainda estão produzindo o leite de transição tardio em torno de 15 dias, enquanto outras produzem leite maduro já aos 4 dias. Leite maduro está presente em quase metade das mulheres após aproximadamente 10 dias. Ela demonstrou, também, que uma taxa de maturação do leite mais rápida está associada com um maior ganho de peso do bebê aos 28 dias.

A composição do leite varia nas distintas etapas da amamentação, em diferentes horas do dia e durante uma mesma mamada, no começo e no final (57, 125). Ao analisar a composição do LH, devemos distinguir o colostro, o leite de transição e o leite maduro, bem como o leite de uma mãe de um RN PMT. Cada um desses leites tem características adequadas para um determinado período da vida do lactente. Pode haver pequenas variações com a alimentação da mãe, mas raramente têm algum significado.

Durante a gestação, a glândula mamária acumula no lúmen dos alvéolos uma substância denominada de pré-colostro, formada principalmente por exsudato do

plasma, células, Igs, lactoferrina, albumina, sódio, cloro e uma pequena quantidade de lactose. Durante os primeiros 4 dias após o parto, produz-se o colostro, fluido amarelo e espesso, composto pelo pré-colostro que, progressivamente, vai se mesclando com o leite que começa a ser produzido. O volume de colostro nos primeiros dias pós-parto é de 2 a 20 ml por mamada, sendo suficiente para satisfazer as necessidades do RN (57).

Leite de transição é o produzido entre o 5° e o 14° dia pós-parto. Entre o 4° e o 6° dia pós-parto, ocorre um aumento brusco da produção de leite, que segue aumentando de forma progressiva até alcançar um volume estável, aproximadamente 600 a 700 ml/dia, entre o 15° e o 30° dia pós-parto. Tem-se registrado uma importante variação individual no tempo que a mãe demora para alcançar o volume estável de sua produção de leite (57, 126). A composição do leite de transição varia com o passar dos dias, das características de colostro até às de leite maduro.

Leite maduro é o produzido como continuação do leite de transição e seu volume oscila em torno de 700 a 900 ml/dia durante os primeiros 6 meses pós-parto (126, 127). Seus principais componentes são: água, proteínas, carboidratos, lipídios, minerais e vitaminas.

Comparado com o leite maduro, o colostro é mais viscoso, rico em proteínas e minerais e pobre em carboidratos, gorduras e algumas vitaminas. Essa alta concentração de proteínas totais e minerais no colostro modifica-se gradualmente,

refletindo as necessidades da criança após as primeiras semanas em que a lactação fica estabelecida. Ao mesmo tempo, observa-se que a dose total dos componentes-chave, como as Igs que a criança recebe do leite materno, torna-se relativamente constante durante a lactação, independentemente da quantidade de leite fornecida pela mãe (128, 129).

Pelo que foi exposto acima, é possível concluir que não existe um critério exato para delimitar cada estágio da lactação. No presente estudo, estabelecemos que as amostras de leite coletadas do 1º ao 5º dia pós-parto seriam consideradas como colostro, do 6º ao 14º dia seriam leite de transição e, a partir do 15º dia pós-parto, leite maduro.

2 - JUSTIFICATIVA

O LH tem sido reconhecido há muito tempo como “padrão-ouro” para a alimentação da criança, tanto sob o aspecto nutricional quanto imunológico, sendo que, somente neste século, foi possível a sua substituição por fórmulas artificiais. Entretanto ainda não se conseguiu fazer uma fórmula idêntica ao LH, embora esse tenha sido sempre usado como modelo e os leites artificiais sejam manufaturados para serem tão similares a ele quanto possível. Com o aumento do uso de fórmulas em vários países desenvolvidos, tem reaparecido o interesse pelo LH. À medida que pesquisas demonstram diferenças bioquímicas com significado biológico entre o LH e o de outras espécies animais, modificações nas fórmulas infantis começam a ser consideradas (100,101,102,103).

Do nitrogênio total do LH, 25% a 30% são nitrogênio não-protéico. Alguns desses compostos nitrogenados são reconhecidos como importantes reguladores de funções neonatais. NTs presentes no LH contribuem com aproximadamente 2% a 5% do nitrogênio não-protéico.

O perfil de NTs e NSs do LH é caracteristicamente diferente do de outros leites comumente usados na alimentação infantil, sendo estimado que uma criança

consumindo LH como principal fonte nutricional venha a ingerir 1,4 a 2,1 mg/dia de NTs (2,4,27).

Estudos mostram variações na concentração de NTs e NSs no leite de uma mesma espécie conforme o estágio da lactação ou os métodos utilizados para a coleta de amostras (100,101,102, 111,112,113,114).

No início da vida, os NTs e NSs na dieta podem ser considerados como “condicionalmente” essenciais. Uma dieta sem NTs, NSs e bases nitrogenadas causa efeitos adversos sobre o desenvolvimento normal do sistema imunológico e pode impedir o crescimento e a maturação do intestino delgado (2,5,6,7). Evidências preliminares em humanos sugerem que a suplementação de NTs nas fórmulas, em níveis similares àqueles encontrados no LH, pode ter efeito benéfico na colonização da microflora intestinal (58,59,60,61) e maior bioavaliabilidade do ferro (72,73,74,75). O efeito dessa suplementação no metabolismo lipídico no início da vida sugere que ela também pode estar associada com aumento dos níveis de HDL, queda do VLDL e maior conteúdo relativo de PUFAs de cadeia longa no plasma e membranas celulares (76,77,78,79,80,86,87,88,89,90,91,92).

Até o momento, não existem recomendações específicas sobre NTs a serem ingeridos na dieta. Com base nas perdas corporais e taxas acrescidas para o crescimento, entretanto, o mínimo necessário de NTs pode ser estimado. Um RN a termo necessita, aproximadamente, 160 mg/kg de peso corporal/dia (480 mg/dia) para repor as perdas urinárias e para o crescimento normal. Para uma criança

amamentada ao seio, em torno de um terço dessas necessidades poderia vir do “salvamento” de NTs e, para os alimentados com fórmula (até o presente momento) acima de 95% viriam da síntese “de novo” (4,27).

Tendo em vista a importância dos NTs e NSs para vários processos bioquímicos e biológicos e considerando que o LH é a melhor fonte desses compostos para os lactentes, surgiu a motivação da autora em realizar esta Dissertação de Mestrado, com o propósito de verificar a concentração dos NSs totais (NSsT, ou seja, aqueles potencialmente disponíveis para absorção intestinal e constituídos pela soma dos NTs e NSs livres, RNA e aductos) no LH e sua variação com a idade gestacional e o estágio da lactação. Cabe salientar a ausência de referências na literatura, até o momento, relativas às concentrações acima mencionadas no leite de mães de PMTs, motivo pelo qual optamos por investigar esse aspecto em nosso trabalho, acreditando estar contribuindo com informações inéditas sobre o assunto.

3 - OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Verificar a concentração de nucleosídeos totais no leite de uma amostra de puérperas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se existe variação na concentração de nucleosídeos totais no leite de acordo com a idade gestacional.
- Avaliar se existe variação na concentração de nucleosídeos totais no leite de acordo com o estágio da lactação.
- Avaliar se existe variação na concentração de nucleosídeos totais no leite de acordo com a idade das nutrizes.
- Avaliar se existe variação na concentração de nucleosídeos totais no leite de acordo com o grau de nutrição das lactantes.

- Avaliar se existe variação na concentração de nucleosídeos totais no leite de acordo com a renda das nutrizes.

- Avaliar se existe variação na concentração de nucleosídeos totais no leite das nutrizes fumantes com relação às não-fumantes.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - LOCAL DE REALIZAÇÃO

O estudo foi realizado na Unidade de Neonatologia do HCPA, Hospital-Escola da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O HCPA é um hospital de nível terciário, que atende a uma população oriunda da cidade de Porto Alegre, da Grande Porto Alegre e do Interior do Estado. O atendimento é feito principalmente por intermédio do convênio MEC-SUS (Ministério da Educação e Cultura - Sistema Único de Saúde) mas, também, por outros convênios e em nível privado.

A Unidade de Neonatologia do HCPA consta de 20 leitos na unidade de tratamento intensivo (UTI) neonatal e 27 leitos de internação neonatal, além de 10 leitos de admissão de RNs normais e de 45 leitos no alojamento-conjunto.

A coleta de amostras de leite foi realizada no Banco de Leite da Unidade, o qual permanece em funcionamento durante as 24 horas do dia e possui 5 máquinas de ordenha de leite materno (modelo 101, marca Olidef) para extração mecânica do leite e um *freezer* (marca Prosdócimo) para armazenamento do leite coletado

(a -4°C). O Banco de Leite é utilizado pelas puérperas do HCPA, assim como por outras mães cujos filhos estejam aí internados.

A análise bioquímica das amostras de leite foi realizada pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular no *Departamento de Investigación y Desarrollo de Abbott Laboratories SA*, em Granada (Espanha).

4.2 - DELINEAMENTO DO ESTUDO

O delineamento básico utilizado foi de um estudo de corte transversal, com eixo de unidade individual, contemporâneo e de natureza observacional. Foram realizados dois estudos transversais, tendo como desfecho a concentração de NSsT no LH e, como fatores em estudo, a idade gestacional por ocasião do parto e o estágio da lactação de puérperas do HCPA.

4.3 - CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todas as puérperas cujos leites foram selecionados para o estudo receberam uma breve explanação oral e escrita sobre os objetivos da pesquisa e noções gerais sobre o assunto em estudo, sendo após solicitado o consentimento por escrito para a coleta do leite (Anexo 1).

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão Científica e Comissão de Ética em Saúde, do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, tendo sido considerado metodológica e eticamente adequado, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde).

4.4 - POPULAÇÃO E AMOSTRA

4.4.1 - População em Estudo

A população em estudo constituiu-se de puérperas entre 1 e 30 dias pós-parto, que estivessem retirando leite no Banco de Leite do HCPA.

4.4.2 - Seleção da Amostra

Foram selecionadas para o estudo puérperas entre 1 e 30 dias pós-parto que estivessem retirando leite no Banco de Leite do HCPA, no horário da manhã, durante o período de 2 de julho de 1996 a 21 de junho de 1997.

As puérperas foram incluídas no estudo em ordem sequencial, conforme fossem coletar leite no Banco de Leite, no horário da manhã, e concordassem em

participar do trabalho, até que fosse atingido o número estimado para completar cada um dos seis grupos do estudo, ou seja, 10 amostras de leite para cada grupo.

As amostras de leite foram divididas em 6 grupos, conforme a idade gestacional até a data do parto (prematuridade e a termo) e o estágio da lactação (coloostro, leite de transição e leite maduro). A coleta das amostras poderia ser repetida em uma mesma puérpera, em 2 ou 3 estágios da lactação diferentes, ou ser realizada uma única vez para cada participante do trabalho.

4.4.3 - Estimativa do Tamanho da Amostra

Objetivando comparar as amostras de leite nos diferentes estágios da lactação e entre as mães de PMTs e as de RNs AT, a partir de uma diferença de 15 entre os valores mínimo e máximo das médias das concentrações de NSsT entre os grupos e um desvio padrão de 6 e, considerando um α de 0,05 e um β de 0,10, foi estimado um tamanho amostral de 10 por grupo, totalizando 60 amostras no estudo (130).

4.4.4 - Critérios de Exclusão

Por não sabermos que fatores podem influenciar a concentração dos NSsT no LH, as características gerais das puérperas não foram consideradas para a definição dos critérios de exclusão. Como assinamos um termo de responsabilidade com

relação ao material biológico (amostras de leite) enviado ao exterior, foram excluídas da pesquisa as mulheres com patologias possíveis de transmissão através do leite (como síndrome de imunodeficiência adquirida, hepatite e citomegalovirose). Excluimos, também, as nutrizes que apresentassem outras patologias ou que estivessem fazendo uso de medicações no período da coleta do leite.

Foram considerados critérios de exclusão para as amostras de leite: horário diverso do turno da manhã, contaminação na coleta do leite por técnica inadequada, demora no congelamento do material coletado e conservação inadequada das amostras, impossibilitando a realização das análises bioquímicas.

Foram coletadas 150 amostras, na tentativa de completar pelo menos 20 em cada grupo. Houve 9 (6%) perdas, sendo 3 (2%) de leite de transição de mães de RNs AT e 6 (4%) de leite maduro de mães de RNs AT.

4.4.5 - Coleta, Armazenamento e Transporte das Amostras

As amostras foram coletadas em tubos de ensaio de vidro, com tampa de rosca de plástico, sendo esse material esterilizado e embalado individualmente no HCPA antes de ser utilizado. As coletas foram realizadas sempre pela mesma pessoa, em condições assépticas (manuseio de todo o material com luvas estéreis), com seringas e agulhas estéreis, retirando-se 10 ml do volume de leite coletado de cada mãe,

diretamente do frasco de coleta antes de transferir o leite para a mamadeira. Todas as coletas foram realizadas no turno da manhã.

Após coletadas, as amostras de leite foram imediatamente armazenadas em um *freezer* a -4°C , no Banco de Leite do HCPA e, em menos de 30 minutos, levadas ao *freezer* do laboratório do HCPA, para congelamento a -20°C , onde permaneceram até serem enviadas para a Espanha.

O transporte do material ao exterior foi realizado por avião. As amostras de leite foram acondicionadas em caixa de isopor, com neve carbônica, em quantidade suficiente para permanecerem congeladas até o seu destino, em Granada.

4.5 - VARIÁVEIS EM ESTUDO

As variáveis em estudo foram obtidas dos prontuários obstétrico e do RN, bem como do questionário aplicado à puérpera no momento da coleta do leite (Anexo 2).

Entre as variáveis independentes foram avaliadas: idade materna, cor, paridade, tipo de parto, uso de fumo, álcool e drogas na gestação, procedência, peso no início e no final da gestação, altura, índice de massa corporal (IMC), grau de nutrição, ganho ponderal na gestação, nível sócio-econômico (renda *per capita* e saneamento básico), idade gestacional e estágio da lactação.

Entre as variáveis dependentes foram avaliadas: concentrações de NSsT, NSs livres, NTs livres, RNA e aductos.

4.5.1 - Idade Materna

Foi considerada a idade materna em relação à data do parto, sendo aferida em anos, a partir da data de nascimento da puérpera.

4.5.2 - Cor

Avaliada como branca, preta, mista, sendo as mulheres posteriormente agrupadas para análise estatística em brancas ou não brancas.

4.5.3 - Paridade

Foi avaliado o número de gestações de cada nutriz e, a partir daí, elas foram agrupadas conforme tivessem tido uma, duas e três ou mais gestações.

4.5.4 - Tipo de Parto

Visto na ficha obstétrica e avaliado como parto vaginal ou cesáreo.

4.5.5 - Idade Gestacional

Para determinação da idade gestacional obstétrica, foi utilizada a data de início do último período menstrual. A idade gestacional pediátrica, presente na ficha do RN, foi avaliada de acordo com o método de Capurro (131) ou o de Ballard (132), sendo este último utilizado para os PMTs com menos de 34 semanas de idade gestacional. Se houvesse diferença entre a idade gestacional obstétrica e a pediátrica, esta última seria utilizada.

Para caracterizar prematuridade, foi considerado o critério da Organização Mundial de Saúde, ou seja, todo RN com menos de 37 semanas de idade gestacional (133).

4.5.6 - Uso de Fumo, Álcool e Drogas na Gestação

Foram solicitadas informações sobre o uso de fumo durante a gravidez e o número médio de cigarros fumados por dia, bem como sobre o consumo de bebidas alcoólicas e a frequência do uso. Investigou-se também o uso de algum tipo de droga na gestação e, em caso afirmativo, qual o tipo e com que frequência.

4.5.7 - Peso no Início da Gestação

Esse dado foi obtido por informação da própria puérpera, sendo avaliado em quilogramas (kg).

4.5.8 - Peso no Final da Gestação

Foi verificado no prontuário da paciente. A aferição foi realizada no momento da admissão no Centro Obstétrico, conforme rotina do hospital. Nos casos em que o parto não ocorreu no HCPA, esse dado era fornecido pela puérpera. O peso no final da gestação também foi avaliado em quilogramas (kg).

4.5.9 - Altura

Igualmente foi verificada no prontuário de admissão da paciente no Centro Obstétrico, conforme rotina do hospital. Da mesma forma, para aquelas cujos partos não ocorreram no HCPA, esse dado era perguntado à própria puérpera. A altura foi avaliada em metros (m).

4.5.10 - Índice de Massa Corporal e Grau de Nutrição

Para avaliação do estado nutricional e da proporção de massa corporal, foi utilizado o IMC ou Índice de Quetelet, definido como peso (kg)/estatura²(m). O IMC tem sido reconhecido como o indicador que, isoladamente, melhor expressa o estado nutricional em nível epidemiológico (134).

Os pontos de corte foram os recomendados pela Organização Mundial de Saúde para uso internacional, sendo também empregados em estudos nacionais pelo Ministério da Saúde (134):

IMC < 20 - Baixo Peso

IMC de 20 a 24,99 - Normal

IMC de 25 a 29,99 - Sobrepeso

IMC ≥ 30 - Obesidade

4.5.11 - Ganho Ponderal na Gestação

O ganho de peso durante a gestação (peso final menos peso inicial) foi classificado segundo os critérios do *US Institute of Medicine*, considerando-se o peso mínimo recomendado para cada categoria de IMC, para gestações a termo (135), conforme mostra a tabela 2.

TABELA 2
Taxa de ganho ponderal recomendada para mulheres grávidas de acordo com o índice de massa corporal pré-gestacional, para gestações a termo

Índice de massa corporal	Ganho total recomendado (kg)
Baixo	12,5 - 18
Normal	11,5 - 16
Sobrepeso	7,0 - 11,5
Obesidade	Mínimo 6

Fonte: (135) adaptada

Independentemente da idade gestacional, a média de ganho ponderal é de 900 a 1700 g durante o primeiro trimestre e, após esse período, é de aproximadamente 380 a 450 g por semana (136,137). Com esse embasamento tornou-se possível avaliar se o ganho de peso de cada puérpera foi baixo ou adequado, proporcionalmente à idade gestacional por ocasião do parto.

4.5.12 - Nível Sócio-Econômico

A avaliação do nível sócio-econômico da puérpera baseou-se na renda *per capita* e nas condições de saneamento básico. As informações foram obtidas conforme modelo adaptado do censo demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de 1990 (138,139).

Para classificar as condições de saneamento básico, foram utilizados os critérios da Pesquisa Nacional de Amostragem de Domicílios - Fundação IBGE - 1990, que considera adequados os domicílios com fornecimento de água por rede geral com canalização interna, esgoto de rede geral ou fossa séptica e lixo coletado (140).

A estratificação da renda familiar obedeceu a pontos de corte tradicionalmente utilizados pelos planejadores de programas sociais no Brasil (134), quais sejam:

- menos de 0,25 salário mínimo (SM)
- de 0,25 SM a menos de 0,5 SM
- de 0,5 SM a menos de 2,2 SMs
- igual ou acima de 2,2 SMs

Os valores declarados pela puérpera foram convertidos em SM do mês vigente e o resultado dividido pelo número de pessoas do domicílio, obtendo-se, assim, o valor da renda *per capita*. Um valor inferior a 0,5 SM é considerado como linha de pobreza.

4.5.13 - Estágio da Lactação

Conforme já comentado na Introdução, não existe um critério bem definido para delimitar cada estágio da lactação (123,124). Neste estudo, estabelecemos que as amostras de leite coletadas do 1º ao 5º dia pós-parto seriam consideradas como

colostro; do 6° ao 14° dia seriam leite de transição e, a partir do 15° dia pós-parto, leite maduro.

4.5.14 - Determinação das Concentrações de NSs Livres, NTs Livres, RNA, Aductos e NSsT no Leite Humano

As amostras de leite encaminhadas a Granada foram mantidas congeladas a -70°C até sua análise, quando, então, foram descongeladas rapidamente em banho a 50°C e após tratadas com banho em ebulição durante 15 minutos, para inativar as ribonucleases que poderiam existir na amostra. Está comprovado que, durante esse tempo, os NTs, NSs e RNA são termicamente estáveis (141). A seguir, as amostras foram separadas em 8 alíquotas de 500 µl em tubos Eppendorf livres de ribonucleases e recongeladas a -70°C. Cada alíquota foi utilizada para a análise de um dos parâmetros estudados (NSs livres, NTs livres, NTs poliméricos em forma de RNA e aductos), sendo que foram feitas duas dosagens para cada um dos parâmetros.

Foram realizadas quatro preparações distintas, em duplicata, a partir das amostras de leite diluídas. Para a quantificação dos NSs foi utilizado um *standard* interno com metilguanossina e metilcitidina em todas as preparações.

A figura 3 representa a atividade das três enzimas usadas. Na preparação 1, amostras de LH foram incubadas durante 16 a 18 horas com nuclease (nuclease P₁

fosfodiesterase, 19 U) para hidrolisar NTs poliméricos (provenientes do RNA) para monoméricos. Essa etapa foi seguida pela incubação com pirofosfatase (0,4 U) para liberar NTs a partir dos aductos, e com fosfatase alcalina (16 U) para hidrolisar NTs até NSs, durante 3 horas, a 37°C. A preparação 2 incluiu a hidrólise por intermédio das nucleases e fosfatases; a preparação 3 usou apenas a fosfatase alcalina, e a 4 utilizou a amostra não hidrolisada.

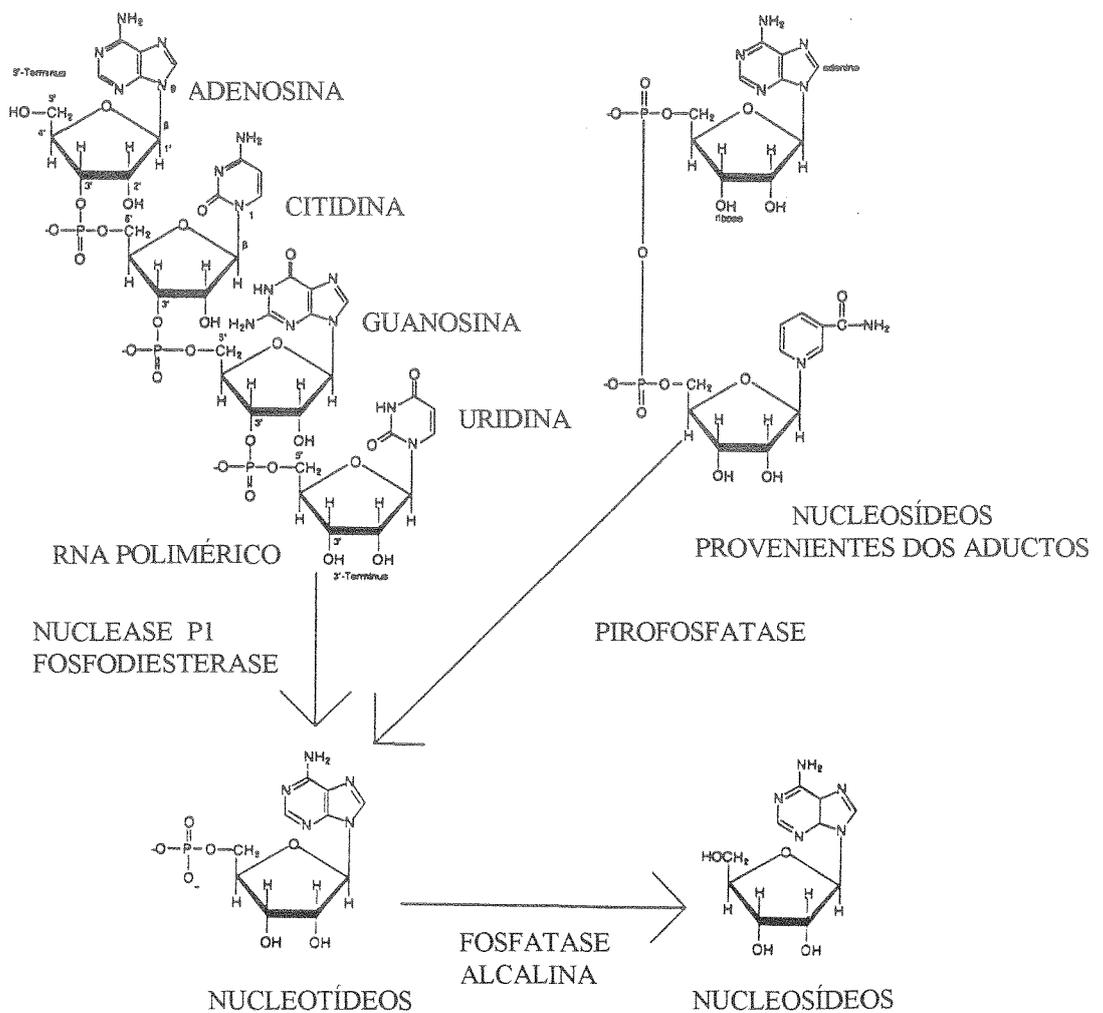


Fig. 3 - Digestão enzimática resultando em nucleosídeos totais disponíveis para a absorção. RNA polimérico e nucleosídeos provenientes dos aductos são hidrolisados até nucleotídeos pela ação de nucleases e pirofosfatases, respectivamente. Nucleotídeos são hidrolisados até nucleosídeos, a forma mais freqüente de absorção intestinal, pela ação da fosfatase alcalina.

Fonte: (111) adaptada

As reações enzimáticas ocorreram em condições de pH e temperatura similares às fisiológicas. Uma vez hidrolisadas as amostras, os NSs foram determinados mediante HPLC, após prévia extração em gel boronato (141). Para isso foi empregado um sistema cromatográfico da marca Supelco, com uma coluna ODS-Hipersil de fase reversa C₁₈, de 3µm de tamanho de partícula, com 5 x 250 mm, com uma fase móvel de 100 mmol/l de ácido fosfórico-trietilamina, pH 6,0 e metanol. O modificador orgânico foi acetonitrila, com uma concentração inicial de 1%, um aumento linear até 7% entre 0 e 8 minutos, uma permanência em 7% por 2 minutos e um retorno a 1% durante 8 minutos antes da próxima dosagem. Os NSs foram detectados por luz ultravioleta, num espectro de 255 nm. As curvas de calibração para cada NS foram construídas pelo cálculo da proporção da área resultante no exame comparada a uma concentração conhecida de diluições *standard* de NSs (*Sigma products*: U-3750, C-9505, I-4125, G-6752 e A-9251). A concentração de cada NS na amostra foi calculada por regressão linear para aquele NS e a proporção da área (conforme *standard* interno do NS) para análise.

As concentrações dos NSs medidas após as 4 preparações distintas das amostras permitiram determinar a quantidade de NSs encontrada em cada forma e quanto de cada uma delas contribuiu para o total (NSsT).

– Preparação 1: Medida dos NSs livres e NSs resultantes da hidrólise por intermédio de nuclease, pirofosfatase e fosfatase alcalina, resultando no valor dos NSsT.

– Preparação 2: Hidrólise com nuclease e fosfatase alcalina, resultando na quantidade de NSs livres, NSs provenientes dos NTs e do RNA. Preparação 1 - preparação 2 = NSs derivados dos aductos.

– Preparação 3: Hidrólise com fosfatase alcalina, resultando na quantidade de NSs livres e NSs derivados dos NTs. Preparação 2 - preparação 3 = NSs derivados do RNA.

– Preparação 4: Nenhuma hidrólise ocorreu, resultando na quantidade de NSs livres. Preparação 3 - preparação 4 = NSs derivados dos NTs.

4.6 - LOGÍSTICA

Foi realizado um estudo com amostras de LH, coletadas no Banco de Leite do HCPA, com máquinas de ordenha de leite materno. As amostras coletadas foram de puérperas entre 1 e 30 dias pós-parto, que estivessem retirando leite no Banco de Leite, no horário da manhã, e que concordassem em participar do estudo, após esclarecimento oral e escrito. Nesse momento era feita a entrevista com a puérpera, preenchendo o protocolo de pesquisa e solicitando o consentimento escrito para a retirada de leite. O tempo de duração das coletas foi de aproximadamente um ano (de 02 de julho de 1996 a 21 de junho de 1997).

As amostras foram divididas em 6 grupos, de acordo com a idade gestacional (prematividade e a termo) e o estágio da lactação (colostró, leite de transição e leite maduro). As puérperas foram selecionadas em ordem seqüencial, conforme chegassem ao Banco de Leite no horário da manhã e não preenchessem os critérios de exclusão, até que fosse atingido o número necessário para completar cada um dos 6 grupo do estudo.

As amostras foram coletadas em tubos de ensaio estéreis, em condições assépticas (manuseio de todo o material com luvas esterilizadas), retirando-se 10 ml do volume de leite coletado das duas mamas de cada mãe. As amostras coletadas foram armazenadas no *freezer* do Banco de Leite, a uma temperatura de -4°C e, em menos de 30 minutos, levadas ao laboratório do HCPA, para congelamento a -20°C , onde permaneceram até serem enviadas para a Espanha.

O transporte do material biológico ao exterior foi realizado em caixa de isopor, com neve carbônica em quantidade suficiente para que as amostras de leite permanecessem congeladas até o seu destino.

As amostras foram encaminhadas, congeladas, ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do *Departamento de Investigación y Desarrollo de Abbott Laboratories SA*, em Granada. Foram identificadas por um código, presente no rótulo de cada tubo de ensaio, onde constavam um número (em ordem seqüencial) para cada participante da pesquisa, um número para a idade gestacional (em semanas) e outro para o estágio da lactação (em dias pós-parto).

A aferição das concentrações de NTs, NSs, RNA e aductos das amostras de leite foi realizada em Granada e os resultados nos foram enviados para a análise dos dados.

4.7 - RESPONSABILIDADE DO PESSOAL ENVOLVIDO NA PESQUISA

4.7.1 - Autora do Trabalho

Foi responsável pelas entrevistas com as puérperas, preenchendo os protocolos de pesquisa e revisando os prontuários necessários, supervisionando as coletas de leite, rotulando os tubos de ensaio, levando o material ao *freezer* do Laboratório do HCPA e, posteriormente, encaminhando as amostras para transporte ao Laboratório de Granada. Após receber os resultados das dosagens esperadas, procedeu à análise estatística e demais etapas para a conclusão da Dissertação de Mestrado.

4.7.2 - Professor Orientador

Foi responsável pela coordenação do Projeto, mantendo um intercâmbio com os pesquisadores de Granada e supervisionando e orientando o andamento dos trabalhos no HCPA.

4.7.3 - Professores Colaboradores

Dr. Angel Gil foi responsável pela supervisão do andamento da pesquisa no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do *Departamento de Investigación y Desarrollo de Abbott Laboratories SA*, em Granada. Dr. Gil é catedrático do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade de Granada.

Dr. Juan Romera e Dra. Carmen Gómez de León foram responsáveis pela determinação das concentrações dos NTs, NSs, RNA e aductos das amostras enviadas e pelo repasse dos resultados obtidos. Dr. Romera é professor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Granada e chefe do Laboratório de Controle de Qualidade da *Abbott Laboratories S.A.* Dra. Carmen é Licenciada em Farmácia e está realizando sua tese de doutorado nesse Laboratório.

4.7.4 - Nutricionista e Técnica de Nutrição

A nutricionista é responsável pelo Banco de Leite do HCPA e orientou as coletas realizadas. A técnica de nutrição foi responsável pela coleta das amostras de leite de forma asséptica, utilizando luvas, agulhas e seringas descartáveis, estéreis.

As coletas foram feitas sempre no turno da manhã e pela mesma funcionária, instruída quanto à adequada técnica de coleta.

4.7.5 - Transporte do Material

O envio das amostras para a análise bioquímica em Granada foi feito por um despachante autorizado pelo HCPA (Celiberto Com. Desp. Ltda), sendo que o material enviado foi utilizado exclusivamente para a pesquisa proposta.

4.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos dados foi realizado com a utilização do programa computadorizado SPSS (*Statistical Package for Social Science*) (142).

Em todos os testes, foi estabelecido o nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Inicialmente foi realizada a análise descritiva, com relação às características da população. Para a análise das variáveis contínuas foram avaliadas a média e o desvio padrão e utilizados o teste t de Student e a análise de variância. Para as variáveis categóricas foi empregado o teste qui-quadrado, sendo avaliadas a frequência e a porcentagem de cada característica estudada.

Ao avaliarmos a concentração de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT, obtivemos, para todos eles, resultados mostrando uma curva de distribuição assimétrica. Sendo assim, utilizamos valores de mediana, amplitude de variação (valores mínimos e máximos) e amplitude entre quartis (AEQ - valores relativos aos percentis 25 e 75 dos resultados) para analisar os dados obtidos.

Foi empregado o teste U de Mann-Whitney para avaliar os índices bioquímicos estudados em relação à idade gestacional. Quando comparamos esses índices em relação aos estágios da lactação, fizemos uso do teste de Kruskal-Wallis, sendo usado o teste Q de Comparações Múltiplas pós Kruskal-Wallis para localizar as diferenças entre os grupos.

Na maioria das figuras presentes na seção de Resultados, optamos por adotar uma técnica gráfica poderosa, descrita por Tukey (143), em 1977, e utilizada também por outros autores (144,145), denominada de *boxplot*, cuja anatomia está expressa na figura 4.

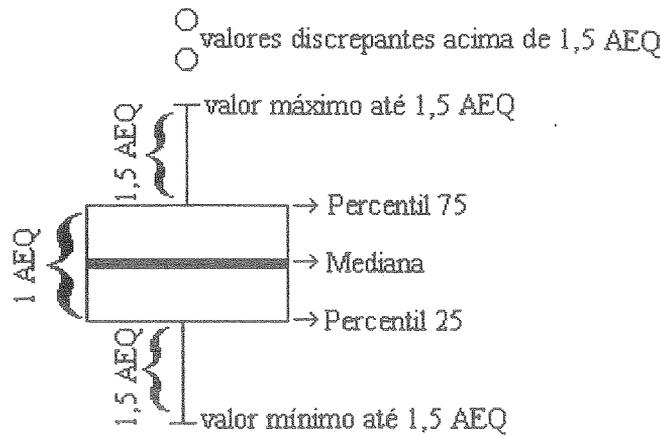


Fig. 4 - Anatomia de um *box-whisker plot* (ou *boxplot*), onde a altura do *box* corresponde a uma amplitude entre quartis (AEQ), tendo como limite superior o percentil 75 e como limite inferior o percentil 25; as linhas horizontais correspondem aos valores mínimo e máximo até 1,5 AEQ; os círculos correspondem a valores discrepantes acima de 1,5 AEQ; a mediana aparece como a linha horizontal mais grossa dentro do *box*.

Fonte: (143) adaptada

Para examinar a influência de outros fatores além da idade gestacional e do estágio da lactação sobre as concentrações de NSsT, foi utilizada a regressão logística. A variável dependente foi a concentração de NSsT no LH. O modelo adotado incluiu as variáveis estágio da lactação, idade gestacional, idade das puérperas, grau de nutrição, renda *per capita* e fumo durante a gestação.

Sendo necessário dicotomizar a variável dependente para a análise da regressão logística e considerando não haver valores definidos de normalidade até o momento (111,112,121), optou-se por utilizar a mediana como ponto de corte. Foram considerados como grupo 1 os valores acima da mediana e, como grupo 2, os valores abaixo da mediana.

5 - RESULTADOS

Foram coletadas, no Banco de Leite do HCPA, 141 amostras de leite humano, provenientes de 110 mulheres entre 1 e 30 dias pós-parto, no período de 02 de julho de 1996 a 21 de junho de 1997. Das amostras coletadas, 31 resultaram de uma segunda ou terceira coleta da mesma puérpera.

5.1 - CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO

5.1.1 - Características Gerais

As características gerais da população podem ser vistas na tabela 3, considerando as seguintes variáveis: idade (em anos), peso inicial na gestação (em quilogramas - kg), altura (em metros - m) e índice de massa corporal (IMC). Os resultados estão expressos como média e desvio-padrão.

TABELA 3
Características gerais da população com relação a idade, peso inicial na gestação, altura e índice de massa corporal

Características	Média	Desvio-padrão
Idade (anos)	25,3	7,2
Peso inicial (kg)*	59,760	8,820
Altura (m)**	1,61	0,06
Índice de massa corporal	23,18	3,35

* kg = quilograma

** m = metro

As características gerais da população com relação a cor, tipo de parto, paridade, fumo na gestação, procedência, grau de nutrição no início da gestação, ganho ponderal na gestação e renda *per capita* estão expostas na tabela 4.

TABELA 4

Características gerais da população com relação a cor, tipo de parto, paridade, fumo na gestação, procedência, grau de nutrição no início da gestação, ganho ponderal na gestação e renda *per capita*

Características	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Cor:		
Branca	90	81,8
Não Branca	20	18,2
Tipo de Parto:		
Vaginal	59	53,6
Cesáreo	51	46,4
Paridade:		
1ª gestação	48	43,6
2ª gestação	31	28,2
Acima da 2ª gestação	31	28,2
Fumo na gestação:		
Sim	20	18,2
Não	90	81,8
Procedência:		
Porto Alegre	62	56,4
Grande Porto Alegre	31	28,2
Interior	17	15,4
Grau de nutrição no início da gravidez:		
Baixo peso	16	14,5
Normal	66	60,0
Sobrepeso ou obesidade	28	25,5
Ganho ponderal na gestação:		
Baixo	37	33,6
Adequado	73	66,4
Renda <i>per capita</i>:		
Inferior a 2 SM*	66	60,0
Superior ou igual a 2 SM	44	40,0

* SM = salário mínimo

Com relação à renda *per capita*, cabe salientar que das 66 (60%) puérperas que referiram ganho inferior a dois SMs, apenas 4 (3,6%) tinham renda inferior a

meio SM, valor considerado como linha de pobreza (133). As outras 44 (40%) mulheres ganhavam dois ou mais SMs por ocasião da aplicação do questionário.

Quanto às condições de saneamento básico, obtivemos as seguintes características: com relação à água, apenas 2 (1,8%) mulheres referiram rede geral sem canalização interna; as outras 108 (98,2%) dispunham de canalização interna para água no domicílio. Quanto ao lixo, apenas 1 (0,9%) puérpera disse que costumava queimá-lo; as outras 109 (99,1%) responderam que o lixo era coletado diretamente. Com relação ao esgoto, 107 (97,3%) lactantes informaram que suas residências estavam ligadas à rede geral, 2 (1,8%) referiram usar fossa séptica e 1 (0,9%) não sabia responder. Conforme consta na Seção de Material e Métodos, são considerados domicílios com condições de habitação adequadas aqueles que dispõem de água encanada interna, coleta de lixo e esgoto de rede geral ou fossa séptica (140). Sendo assim, das mulheres avaliadas em nosso estudo, apenas 2 (1,8%) residiam em habitação com condições inadequadas (uma morava em domicílio com água, lixo e esgoto inadequados e outra residia em habitação com água e esgoto inadequados). As demais 108 (98,2%) puérperas dispunham de moradia com condições adequadas.

Quando interrogadas sobre álcool ou drogas durante a gestação, as 110 (100%) puérperas responderam não ter feito uso dos mesmos nesse período.

Na avaliação da idade gestacional, 63 (57,3%) mulheres tiveram RNs PMTs e 47 (42,7%) tiveram RNs AT. Entre as mães de PMTs, a média de idade gestacional

foi de $33,3 \pm 1,6$ semanas, com uma variação de 30 a 36 semanas. Entre as mães de RNs AT, a média de idade gestacional foi de $40,0 \pm 1,4$ semana, com uma variação de 37 a 41 semanas. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0000$). Desta forma, comprovamos a presença de dois grupos estatisticamente distintos com relação à idade gestacional e, a partir disso, comparamos as características de ambos.

5.1.2 - Características da População de acordo com a Idade Gestacional

Entre as mães de PMTs, a média de idade foi de $24,9 \pm 7,6$ anos, e entre as mães de RNs AT, de $25,7 \pm 6,7$ anos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos ($p = 0,457$).

Quanto ao peso no início da gestação, a média das mães de PMTs foi de $57,629 \pm 6,728$ kg, e a das mães de RNs AT, de $62,613 \pm 10,430$ kg. Com relação a essa variável, encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos ($p = 0,019$).

Já em relação à altura, a média das mães de PMTs foi de $1,60 \pm 0,07$ m, e a das mães de RNs AT, de $1,61 \pm 0,06$ m, não tendo sido detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,332$).

No tocante ao IMC, a média entre as mães de PMTs foi de $22,54 \pm 2,71$, e entre as mães de RNs AT, de $24,02 \pm 3,93$, não se tendo verificado diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos ($p = 0,083$), apesar da diferença estatisticamente significativa no peso inicial da gestação citada anteriormente.

Na tabela 5, comparamos as características das mães de PMTs e das mães de RNs AT, com relação a cor, tipo de parto, paridade, fumo na gestação, procedência, grau de nutrição no início da gestação, ganho ponderal na gestação e renda *per capita*. Não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de mães de PMTs e o de mães de RNs AT com relação a essas características ($p > 0,05$).

TABELA 5

Características dos grupos estudados com relação a cor, tipo de parto, paridade, fumo na gestação, procedência, grau de nutrição no início da gestação, ganho ponderal na gestação e renda *per capita*

Características	Mães de PMTs		Mães de RNs AT		p*
	n	(%)	n	(%)	
Cor:					
Branca	52	(82,5)	38	(80,9)	1,000
Não Branca	11	(17,5)	9	(19,1)	
Tipo de Parto:					
Vaginal	29	(46,0)	30	(63,8)	0,369
Cesáreo	34	(54,0)	17	(36,2)	
Paridade:					
1ª gestação	25	(39,7)	23	(48,9)	0,9722
2ª gestação	21	(33,3)	10	(21,3)	
Acima da 2ª gestação	17	(27,0)	14	(29,8)	
Fumo na gestação:					
Sim	13	(20,6)	7	(14,9)	0,601
Não	50	(79,4)	40	(85,1)	
Procedência:					
Porto Alegre	33	(52,4)	29	(61,7)	0,437
Grande Porto Alegre	18	(28,6)	13	(27,7)	
Interior	12	(19,0)	5	(10,6)	
Grau de nutrição no início da gravidez:					
Baixo peso	10	(15,9)	6	(12,8)	0,083
Normal	42	(66,7)	24	(51,1)	
Sobrepeso ou obesidade	11	(17,4)	17	(36,2)	
Ganho ponderal na gestação:					
Baixo	26	(41,3)	11	(23,4)	0,079
Adequado	37	(58,7)	36	(76,6)	
Renda <i>per capita</i>:					
Inferior a 2 SM**	42	(66,7)	24	(51,1)	0,145
Superior ou igual a 2 SM	21	(33,3)	23	(48,9)	

* Teste qui-quadrado

** SM = salário mínimo

5.1.3 - Características da População de acordo com o Estágio da Lactação

Dividimos as 141 amostras de leite coletadas em três grupos de acordo com o estágio da lactação. Assim sendo, obtivemos 54 (38,3%) amostras de colostro, 48 (34%) de leite de transição e 39 (27,7%) de leite maduro.

A média de dias pós-parto em que as amostras foram coletadas dentro do grupo colostro foi de $3,4 \pm 1,1$, tendo sido as coletas realizadas entre o 1º e o 5º dia. Em relação ao leite de transição, a média de dias pós-parto das coletas foi de $8,6 \pm 2,5$, variando entre o 6º e o 14º dia. Quanto ao leite maduro, a média de dias pós-parto em que as amostras foram coletadas foi de $19,6 \pm 5,8$, sendo que as amostras foram coletadas entre o 15º e o 30º dia.

Encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre os três grupos estudados ($p = 0,0000$). Desta forma, utilizamos o estágio da lactação como uma variável a ser estudada, com relação aos índices bioquímicos avaliados.

Considerando que cada puérpera coletou apenas uma amostra de leite por estágio da lactação, a seguir comparamos se houve diferença nas características das puérperas conforme o estágio da lactação.

As mulheres em que foi coletado colostro tinham uma média de idade de $25,6 \pm 6,9$ anos; naquelas em que foi coletado leite de transição, a média de idade foi de $25,8 \pm 7,8$ anos e naquelas cujas amostras foram de leite maduro, foi de $26,4 \pm 7,6$

anos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos com relação à idade das mulheres ($p = 0,881$).

Quanto ao peso no início da gestação, as mulheres que coletaram colostro tiveram uma média de $60,95 \pm 10,27$ kg, enquanto nas que coletaram leite de transição a média foi de $59,84 \pm 8,22$ kg e nas que coletaram leite maduro, de $58,11 \pm 7,49$ kg. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos com relação ao peso das puérperas no início da gestação ($p = 0,497$).

A média de altura das mulheres que coletaram colostro foi de $1,61 \pm 0,05$ m, a das que coletaram leite de transição foi de $1,61 \pm 0,07$ e a das que coletaram leite maduro, de $1,62 \pm 0,07$. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos com relação à altura das puérperas ($p = 0,912$).

A média de IMC das mulheres que coletaram colostro foi de $23,44 \pm 3,81$, a das que coletaram leite de transição, de $23,33 \pm 3,14$ e a das que coletaram leite maduro, de $22,31 \pm 2,72$. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos com relação ao IMC das puérperas ($p = 0,411$).

Com relação à idade gestacional por ocasião do parto, a média das mulheres que coletaram colostro foi de $36,1 \pm 3,5$ semanas, a das que coletaram leite de transição, de $35,5 \pm 3,3$ semanas e a das que coletaram leite maduro, de $35,6 \pm 3,4$ semanas. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos com relação à idade gestacional ($p = 0,671$).

Na tabela 6, comparamos as características dos três grupos de nutrizes (com colostro, com leite de transição e com leite maduro), com relação a cor, tipo de parto, paridade, fumo na gestação, procedência, grau de nutrição no início da gestação, ganho ponderal na gestação e renda *per capita*. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os três estágios da lactação com relação às características das puérperas ($p > 0,05$), com exceção do fumo na gestação, que mostrou uma diferença estatística limítrofe ($p = 0,049$) entre os grupos estudados, localizada entre as mães com leite de transição e as mães com colostro, as quais fumaram significativamente mais do que as primeiras ($p = 0,028$).

TABELA 6

Características dos grupos estudados com relação a cor, tipo de parto, paridade, fumo na gestação, procedência, grau de nutrição no início da gestação, ganho ponderal na gestação e renda *per capita*

Características	Mães com colostro	Mães com leite de transição	Mães com leite maduro	p *
	n (%)	n (%)	n (%)	
Cor:				
Branca	44 (81,5)	38 (79,2)	33 (84,6)	0,809
Não Branca	10 (18,5)	10 (20,8)	6 (15,4)	
Tipo de Parto:				
Vaginal	31 (57,4)	(45,8)	19 (48,7)	0,271
Cesáreo	23 (42,6)	26 (54,2)	20 (51,3)	
Paridade:				
1ª gestação	23 (42,6)	23 (47,9)	18 (46,1)	0,948
2ª gestação	14 (25,9)	13 (27,1)	9 (23,1)	
Acima da 2ª gestação	17 (31,4)	12 (25,0)	12 (30,8)	
Fumo na gestação:				
Sim	13 (24,1)	3 (6,2)	7 (17,9)	0,049
Não	41 (75,9)	45 (93,8)	32 (82,1)	
Procedência:				
Porto Alegre	31 (57,4)	32 (66,7)	22 (56,4)	0,682
Grande Porto Alegre	16 (29,6)	12 (25,0)	10 (25,6)	
Interior	7 (13,0)	4 (8,3)	7 (18,0)	
Grau de nutrição no início da gravidez:				
Baixo peso	9 (16,7)	5 (10,4)	5 (12,8)	0,322
Normal	28 (51,9)	31 (64,6)	28 (71,8)	
Sobrepeso ou obesidade	17 (31,4)	12 (25,0)	6 (15,4)	
Ganho ponderal na gestação:				
Baixo	16 (29,6)	16 (33,3)	11 (28,2)	0,385
Adequado	38 (70,4)	32 (66,7)	28 (71,8)	
Renda <i>per capita</i>:				
Inferior a 2 SM**	32 (59,3)	25 (52,1)	21 (53,8)	0,749
Superior ou igual a 2 SM	22 (40,7)	23 (47,9)	18 (46,2)	

* Teste qui-quadrado

** SM = salário mínimo

5.2 - ÍNDICES BIOQUÍMICOS

5.2.1 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite de Puérperas do HCPA

As concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de puérperas do HCPA apresentaram uma distribuição assimétrica, sendo necessário utilizar valores de mediana, amplitude de variação e AEQ para avaliar os resultados obtidos.

Entre as 141 amostras de leite analisadas, obtivemos os seguintes valores:

- NSs - $4,60 \pm 5,32$ mg/l, com mínimo de 0,00 e máximo de 26,74 mg/l
- NTs - $19,08 \pm 18,51$ mg/l, com mínimo de 3,08 mg/l e máximo de 92,50 mg/l
- RNA - $2,85 \pm 5,99$ mg/l, com mínimo de 0,00 e máximo de 28,67 mg/l
- Aductos - $2,83 \pm 9,25$ mg/l, com mínimo de 0,00 e máximo de 33,64 mg/l
- NSsT - $33,18 \pm 22,58$ mg/l, com mínimo de 14,21 mg/l e máximo de 125,49 mg/l

5.2.2 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Colostro de Mães de PMTs e de Mães de RNs AT

As concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT estão demonstradas na tabela 7, expressas como mediana e amplitude de variação (mínimo e máximo).

Não foi detectada diferença estatisticamente significativa para cada um dos índices bioquímicos avaliados entre o colostro de mães de PMTs e o colostro de mães de RNs AT ($p > 0,05$).

TABELA 7
Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no colostro de mães de PMTs e de mães de RNs AT

Índices bioquímicos*	Mães de PMTs (n=29)	Mães de RNs AT (n=25)	p**
NSs	4,96 (1,33 - 26,46)***	5,07 (0,45 - 23,16)	0,425
NTs	14,43 (6,13 - 78,11)	15,27 (3,08 - 41,02)	0,952
RNA	2,57 (0,00 - 10,57)	3,07 (0,00 - 21,90)	0,345
Aductos	1,25 (0,00 - 17,87)	0,13 (0,00 - 12,88)	0,501
NSsT	28,61 (14,42 - 99,95)	29,36 (14,21 - 72,82)	0,652

* Os valores estão expressos em mg/l

** Teste U de Mann-Whitney

*** Os valores estão expressos como mediana (mínimo-máximo)

Na figura 5, apresentamos a distribuição das concentrações de NSsT presentes no colostro de acordo com a classificação de idade gestacional (PMT e AT). Aqui

estão representados valores de mediana, percentis 25 a 75, valores mínimos e máximos até 1,5 AEQ e valores discrepantes acima de 1,5 AEQ.

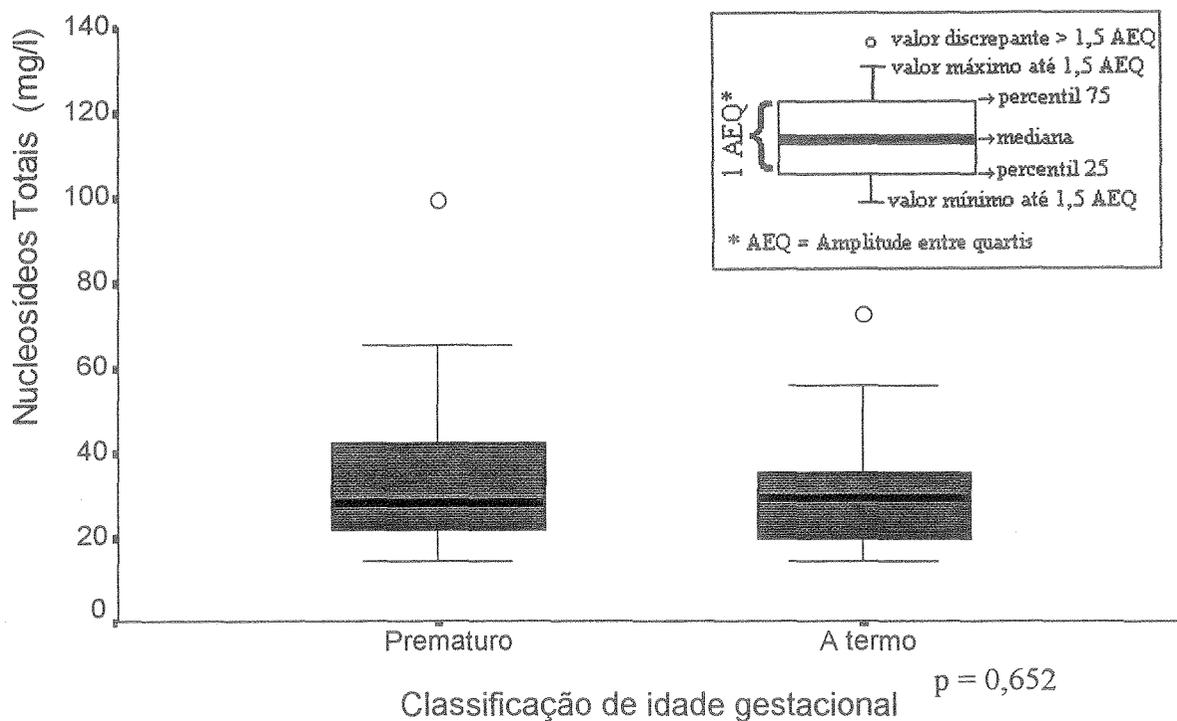


Fig. 5 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no colostro de acordo com a classificação de idade gestacional

5.2.3 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite de Transição de Mães de PMTs e de Mães de RNs AT

As concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de transição de mães de PMTs e de mães de RNs AT estão indicadas na tabela 8, como mediana e amplitude de variação (mínimo e máximo).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa para cada um dos índices bioquímicos avaliados no leite de transição entre os 2 grupos ($p > 0,05$).

TABELA 8
Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de transição de mães de PMTs e de mães de RNs AT

Índices bioquímicos*	Mães de PMTs (n=31)		Mães de RNs AT (n=17)		p**
NSs	5,38	(0,00 - 26,74)***	4,26	(0,39 - 25,72)	0,425
NTs	20,64	(5,94 - 92,50)	24,66	(5,43 - 73,47)	0,952
RNA	4,73	(0,00 - 28,67)	3,00	(0,00 - 14,24)	0,345
Aductos	4,00	(0,00 - 33,64)	2,83	(0,00 - 21,75)	0,501
NSsT	37,41	(15,47 - 125,49)	36,20	(17,87 - 104,08)	0,652

* Os valores estão expressos em mg/l

** Teste U de Mann-Whitney

*** Os valores estão expressos como mediana (mínimo-máximo)

Na figura 6, apresentamos a distribuição das concentrações de nucleosídeos totais presentes no leite de transição de acordo com a classificação de idade gestacional. Aqui estão representados valores de mediana, percentis 25 a 75, valores mínimos e máximos até 1,5 AEQ e valores discrepantes acima de 1,5 AEQ.

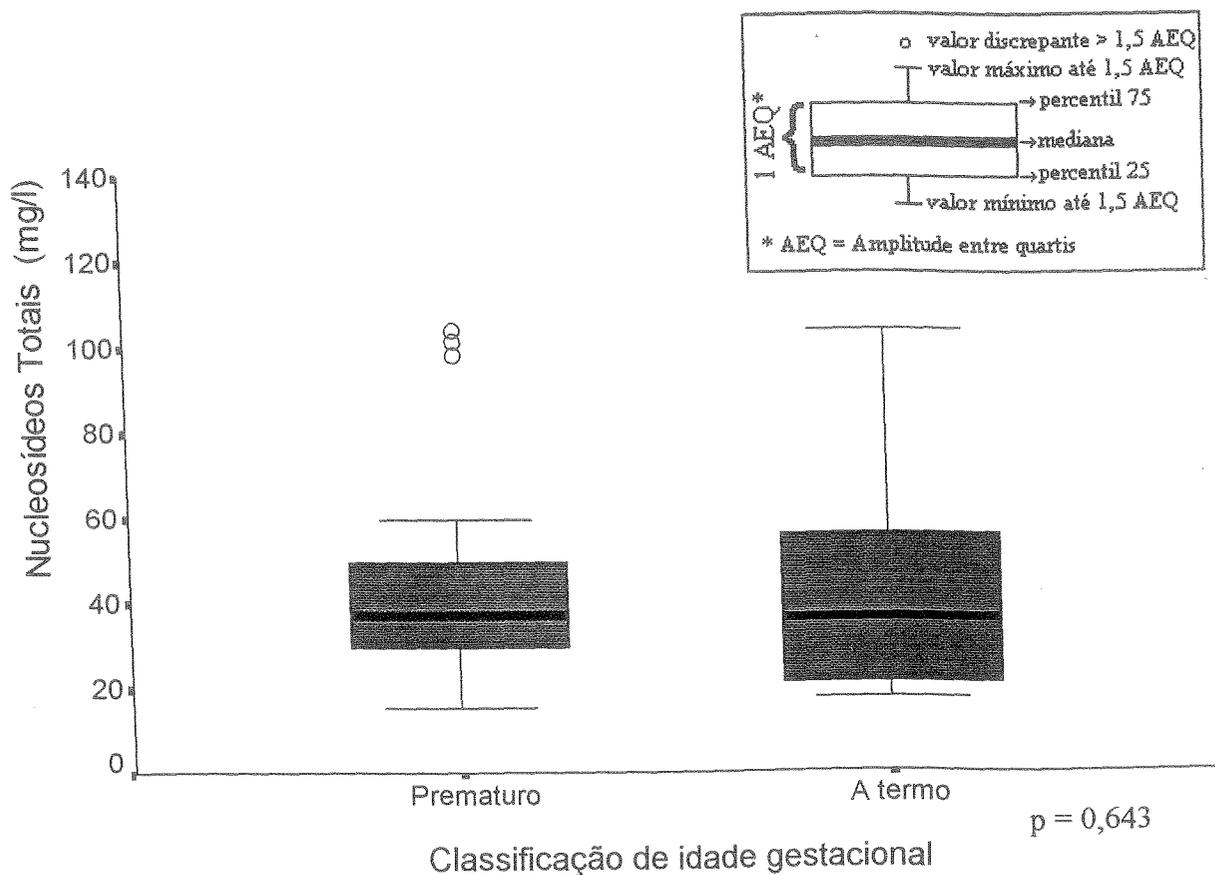


Fig. 6 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no leite de transição de acordo com a classificação de idade gestacional

5.2.4 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite Maduro de Mães de PMTs e de Mães de RNs AT

As concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite maduro de mães de PMTs e de mães de RNs AT podem ser visualizadas na tabela 9, apresentadas como mediana e amplitude de variação (mínimo e máximo).

Não foi detectada diferença estatisticamente significativa para cada um dos índices bioquímicos avaliados em relação ao leite maduro de mães de PMTs e o de mães de RNs AT ($p > 0,05$).

TABELA 9
Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite maduro de mães de PMTs e de mães de RNs AT

Índices bioquímicos*	Mães de PMTs (n=25)		Mães de RNs AT (n=14)		p**
NSs	3,91	(0,00 - 12,13)***	4,42	(1,14 - 22,67)	0,671
NTs	21,89	(7,49 - 61,90)	23,65	(9,93 - 50,99)	0,539
RNA	0,87	(0,00 - 14,91)	1,12	(0,00 - 7,46)	1,000
Aductos	4,58	(0,00 - 26,34)	9,39	(0,00 - 18,57)	0,235
NSsT	40,55	(16,37 - 90,89)	41,28	(21,22 - 68,50)	0,930

* Os valores estão expressos em mg/l

** Teste U de Mann-Whitney

*** Os valores estão expressos como mediana (mínimo-máximo)

Na figura 7, apresentamos a distribuição das concentrações de nucleosídeos totais presentes no leite maduro de acordo com a classificação de idade gestacional. Aqui estão representados valores de mediana, percentis 25 a 75, valores mínimos e máximos até 1,5 AEQ e valores discrepantes acima de 1,5 AEQ.

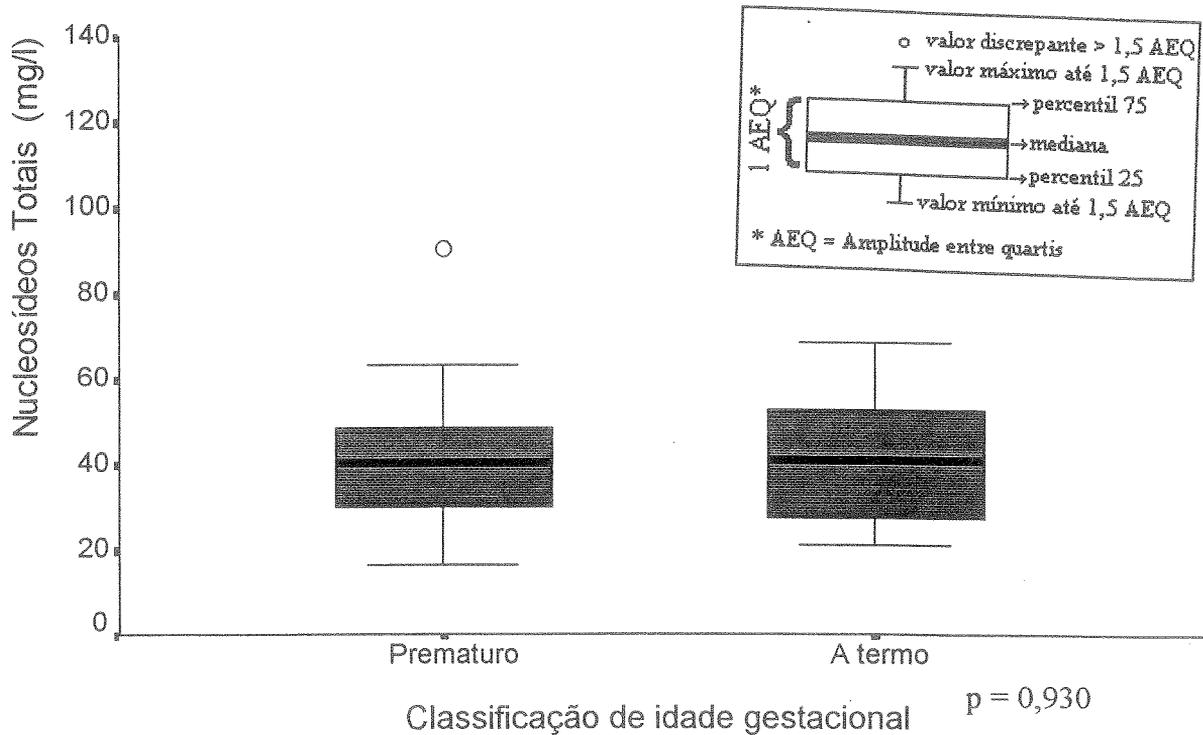


Fig. 7 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no leite maduro de acordo com a classificação de idade gestacional

5.2.5 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite de Mães de PMTs nos Três Estágios da Lactação

As concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de mães de PMTs nos três estágios da lactação podem ser vistas na tabela 10, indicadas como mediana e amplitude de variação (mínimo e máximo).

Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de mães de PMTs nos três estágios da lactação

Índices bioquímicos *	Colostro (n = 29)	Leite de transição (n=31)	Leite maduro (n=25)	p**
NSs	4,96(1,33- 6,46)***	5,38 (0,00 - 26,74)	3,91 (0,00 - 12,13)	0,220
NTs	14,43(6,13 -78,11)	20,64 (5,94 - 92,50)	21,89 (7,49 - 61,90)	0,060
RNA	2,57(0,00 -10,57)	4,73 (0,00 - 28,67)	0,87 (0,00 - 14,91)	0,034
Aductos	1,25(0,00 -17,87)	4,00 (0,00 - 33,64)	4,58 (0,00 - 26,34)	0,113
NSsT	28,61(14,42 -99,95)	37,41 (15,47 -125,49)	40,55 (16,37 - 90,89)	0,060

* Os valores estão expressos em mg/l

** Teste de Kruskal-Wallis

*** Os valores estão expressos como mediana (mínimo-máximo)

Com base na tabela 10, podemos considerar que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de NSs no leite de mães de PMTs nos três estágios da lactação avaliados, o mesmo ocorrendo com relação aos aductos ($p > 0,05$).

No que diz respeito aos NTs e NSsT no leite de mães de PMTs, parece existir diferença entre os grupos, mas não foi atingido o nível de significância estatística estabelecido ($\alpha = 0,05$). Entretanto, para um nível um pouco mais flexível (de $\alpha = 0,10$), poderíamos considerar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Prosseguindo na análise dos dados com a utilização do teste Q para comparações múltiplas pós Kruskal-Wallis, encontramos uma diferença estatisticamente significativa (considerando $\alpha = 0,10$) entre colostro e leite maduro para os NTs, ou seja, os valores de NTs no colostro são significativamente menores do que no leite maduro ($p = 0,075$). Já em relação aos NSsT, após a localização das

do que no leite maduro ($p = 0,075$). Já em relação aos NSsT, após a localização das diferenças entre os grupos, obtivemos $p = 0,115$, ou seja, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de NSsT no leite de mães de PMTs nos três estágios da lactação.

Quanto ao RNA, observamos uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,034$), localizada entre o leite de transição e o leite maduro, isto é, foi vista uma redução estatisticamente significativa na concentração do RNA no leite maduro em relação ao leite de transição.

Na figura 8, podemos observar a distribuição das concentrações dos NSsT presentes no leite de mães de PMTs nos três estágios da lactação. Os valores estão representados como mediana, percentis 25 a 75, valores mínimos e máximos até 1,5 AEQ e valores discrepantes acima de 1,5 AEQ.

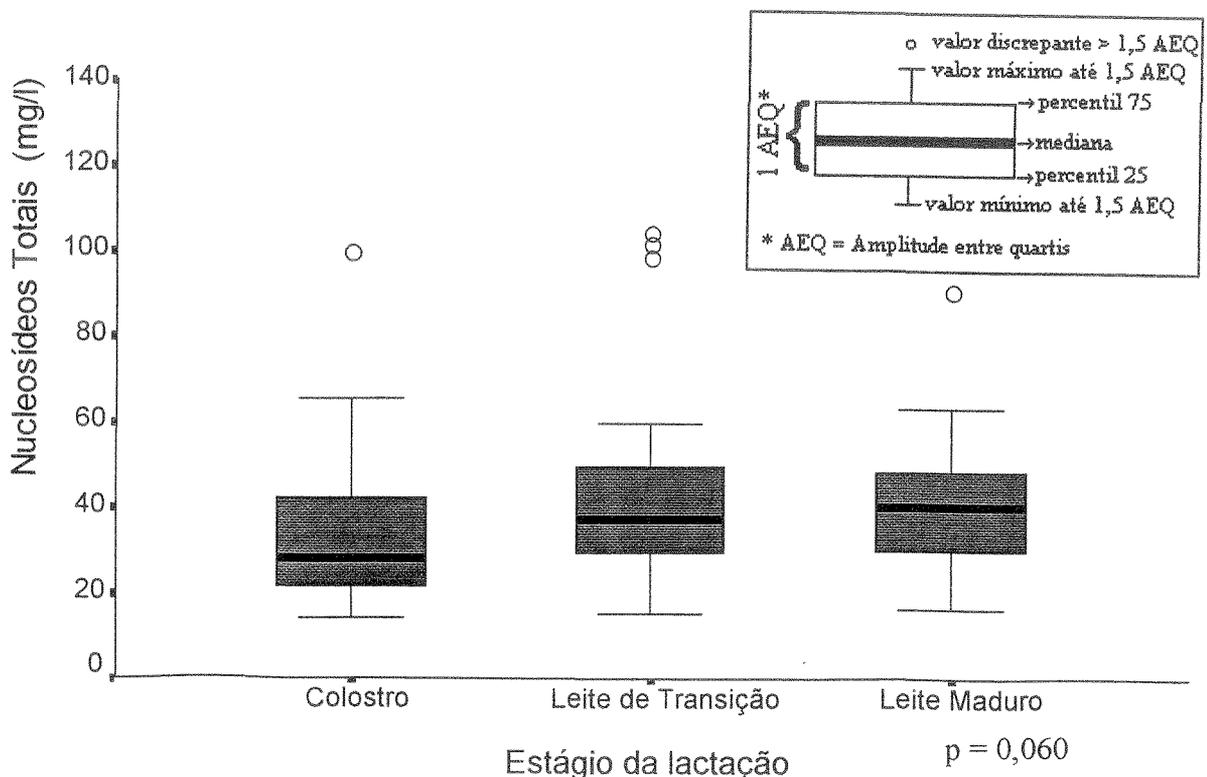


Fig. 8 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no leite de mães de prematuros de acordo com o estágio da lactação

5.2.6 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite de Mães de RNs AT nos Três Estágios da Lactação

As concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de mães de RNs AT nos três estágios da lactação encontram-se expressas na tabela 11, na forma de mediana e amplitude de variação (mínimo e máximo).

TABELA 11
Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de mães de RNs AT nos três estágios da lactação

Índices bioquímicos *	Colostro (n = 25)	Leite de transição (n=17)	Leite maduro (n=14)	p**
NSs	5,07 (0,45- 23,16)***	4,26 (0,39 - 25,72)	4,42 (1,14 - 22,67)	0,639
NTs	15,27 (3,08 -41,02)	24,66 (5,43 - 73,47)	23,65 (9,93 - 50,99)	0,085
RNA	3,07 (0,00- 21,90)	3,00 (0,00 - 14,24)	1,12 (0,00 - 7,46)	0,545
Aductos	0,13 (0,00- 12,88)	2,83 (0,00 - 21,75)	9,39 (0,00 - 18,57)	0,002
NSsT	29,36 (14,21-72,82)	36,20 (17,87 - 104,08)	41,27 (21,22 - 68,50)	0,103

* Os valores estão expressos em mg/l

** Teste de Kruskal-Wallis

*** Os valores estão expressos como mediana (mínimo-máximo)

Pelos dados da tabela 11, podemos reconhecer que não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de NSs no leite das mães de RNs AT nos três estágios da lactação estudados, o mesmo ocorrendo em relação ao RNA e aos NSsT ($p > 0,05$).

No tocante aos NTs no leite de mães de RNs AT, parece existir diferença entre os grupos, embora não tenha sido atingido o nível de significância estatística estabelecido ($\alpha = 0,05$). Nesse caso, mesmo se considerássemos um nível um pouco mais flexível (de $\alpha = 0,10$), na realização do teste Q para comparações múltiplas pós Kruskal-Wallis também não seria encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,130$).

Quanto aos aductos, encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre colostro e leite maduro ($p = 0,002$), isto é, a concentração de aductos no colostro foi significativamente menor do que no leite maduro de mães de RNs AT.

Na Figura 9, podemos observar a distribuição das concentrações de NSsT presentes no leite de mães de RNs AT nos três estágios da lactação. Os valores estão representados como mediana, percentis 25 a 75, valores mínimos e máximos até 1,5 AEQ e valores discrepantes acima de 1,5 AEQ.

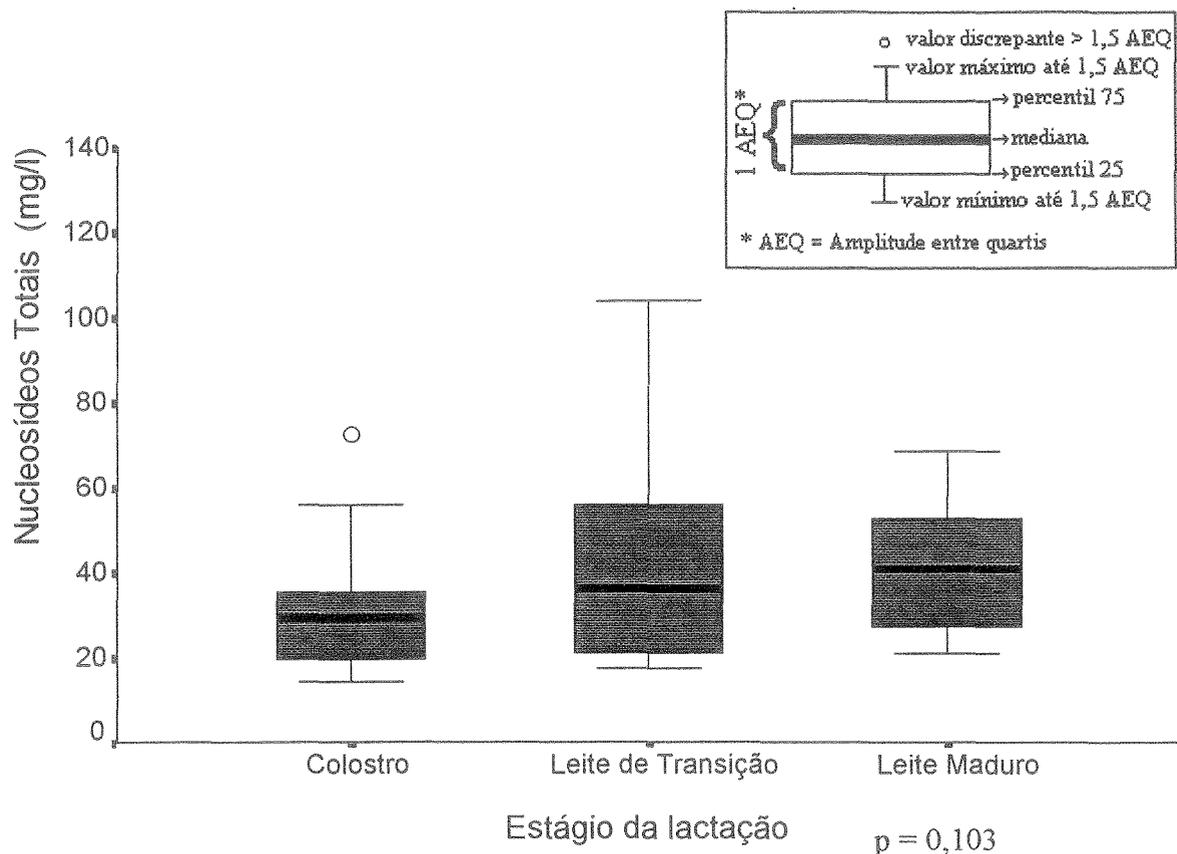


Fig. 9 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no leite de mães de recém-nascidos a termo de acordo com o estágio da lactação

5.2.7 - Concentrações de NSs, NTs, RNA, Aductos e NSsT no Leite de Puérperas nos Estágios da Lactação

A partir dos resultados apresentados nas tabelas 7, 8 e 9, é possível perceber não terem sido detectadas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de NSS, NTs, RNA, aductos e NSsT entre o leite de mães de PMTs e o leite de mães de RNs AT nos três estágios da lactação considerados.

Sendo assim, optamos por agrupar os resultados obtidos para os leites tanto das mães de PMTs como das mães de RNs AT e reavaliá-los novamente conforme os três estágios da lactação estudados. Obtivemos, então, 54 (38,3%) colostros, 48 (34,0%) leites de transição e 39 (27,7%) leites maduros, perfazendo um total de 141 amostras de leite (100%) estudadas.

Na tabela 12, apresentamos as concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT das amostras de leite de puérperas nos três estágios da lactação avaliados, expressas como mediana e amplitude de variação (mínimo e máximo).

TABELA 12
Concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de puérperas nos três estágios da lactação

Índices bioquímicos *	Colostro (n = 54)	Leite de transição (n=48)	Leite maduro (n=39)	p**
NSs	5,02 (0,45 - 26,46)***	4,55(0,00 - 26,74)	3,91 (0,00 -22,67)	0,269
NTs	14,89 (3,08 - 78,11)	21,28(5,43 - 92,50)	21,96 (7,49 -61,90)	0,006
RNA	2,59 (0,00 - 21,90)	4,45(0,00 - 28,67)	0,87 (0,00 -14,91)	0,060
Aductos	0,86 (0,00 - 17,87)	3,41(0,00 - 33,64)	8,49 (0,00 -26,34)	0,001
NSsT	28,93 (14,21 - 99,95)	36,81(15,47 -125,49)	40,55 (16,37 -90,89)	0,006

* Os valores estão expressos em mg/l

** Teste de Kruskal-Wallis

*** Os valores estão expressos como mediana (mínimo-máximo)

Os dados da tabela 12, permitem-nos dizer não terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de NSs no leite de puérperas nos três estágios da lactação estudados ($p > 0,05$).

Com relação ao RNA, parece existir diferença entre os grupos, mas não foi atingido o nível de significância estatisticamente estabelecido ($\alpha = 0,05$).

Entretanto, para um nível um pouco mais flexível (de $\alpha = 0,10$), poderíamos considerar uma diferença estatisticamente significativa entre o leite de transição e o leite maduro, ou seja, a concentração de RNA seria significativamente maior no primeiro do que no segundo ($p = 0,06$).

Quanto aos NTs, aductos e NSsT, foi registrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p < 0,05$).

Ao localizarmos as diferenças pós Kruskal-Wallis, verificamos que a concentração de NTs no colostro foi significativamente menor do que no leite de transição ($p = 0,01$) e no leite maduro ($p = 0,006$).

Em relação aos aductos, os valores foram significativamente menores no colostro do que no leite maduro ($p = 0,001$). Se o nível de significância fosse de $\alpha = 0,10$, teríamos encontrado, também, valores significativamente menores no colostro do que no leite de transição ($p = 0,07$).

Quanto aos NSsT, obtivemos valores significativamente menores no colostro do que no leite de transição ($p = 0,02$) e no leite maduro ($p = 0,006$).

As figuras 10 a 14, mostram a distribuição das concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT presentes no leite de puerperas nos três estágios da lactação. Os valores estão representados como mediana, percentis 25 a 75, valores mínimos e máximos até 1,5 AEQ e valores discrepantes acima de 1,5 AEQ.

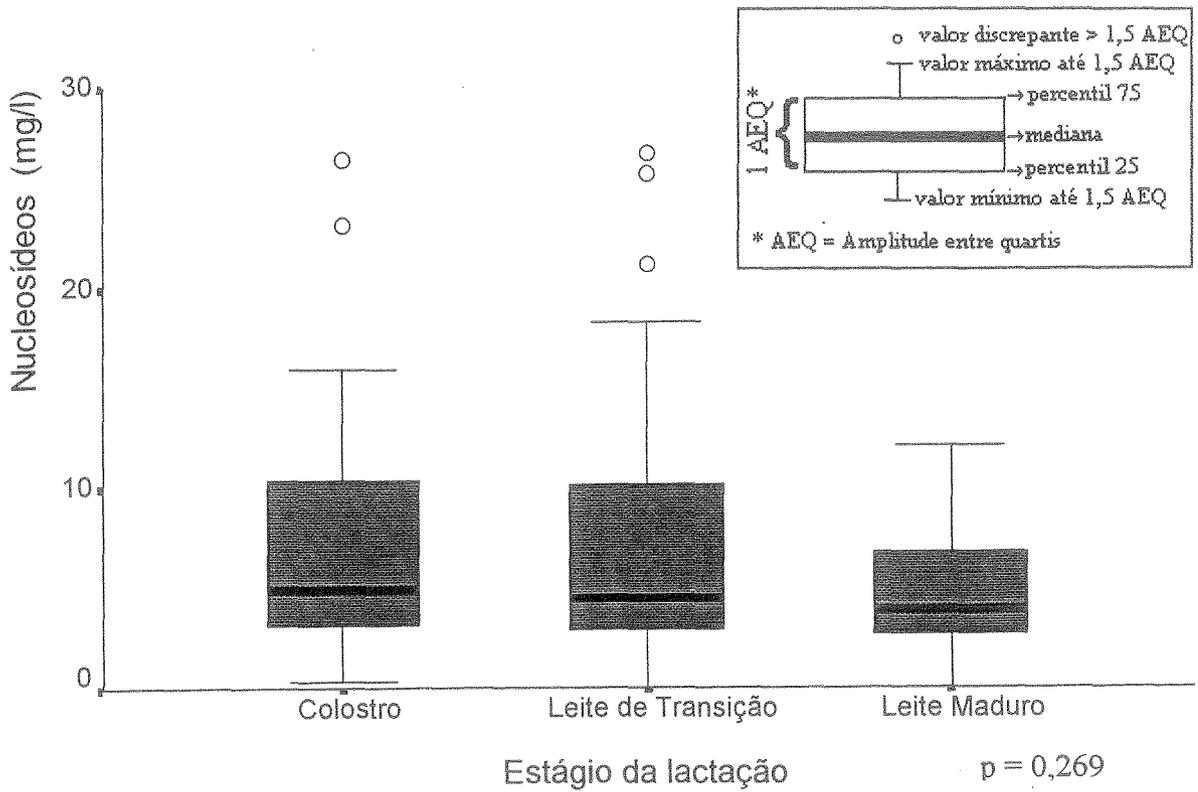


Fig. 10 - Concentração de nucleosídeos presentes no leite de puérperas de acordo com o estágio da lactação

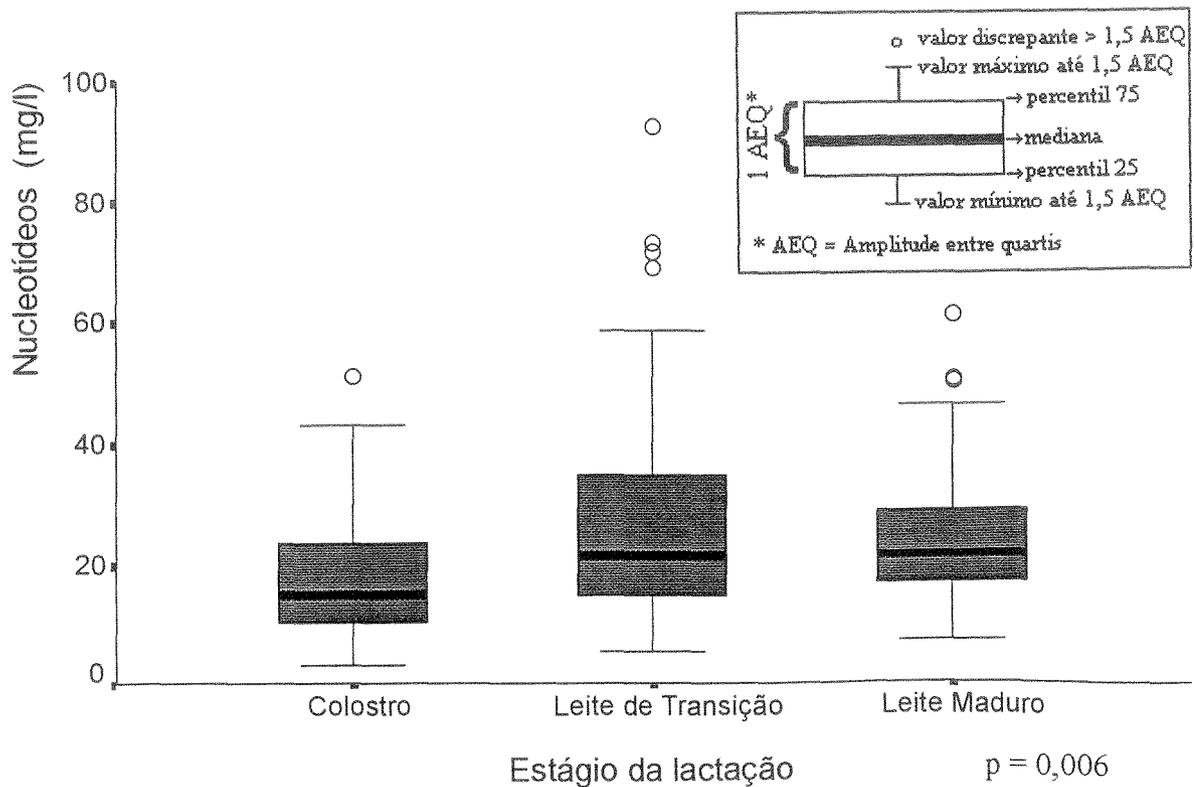


Fig. 11 - Concentração de nucleotídeos presentes no leite de puérperas de acordo com o estágio da lactação

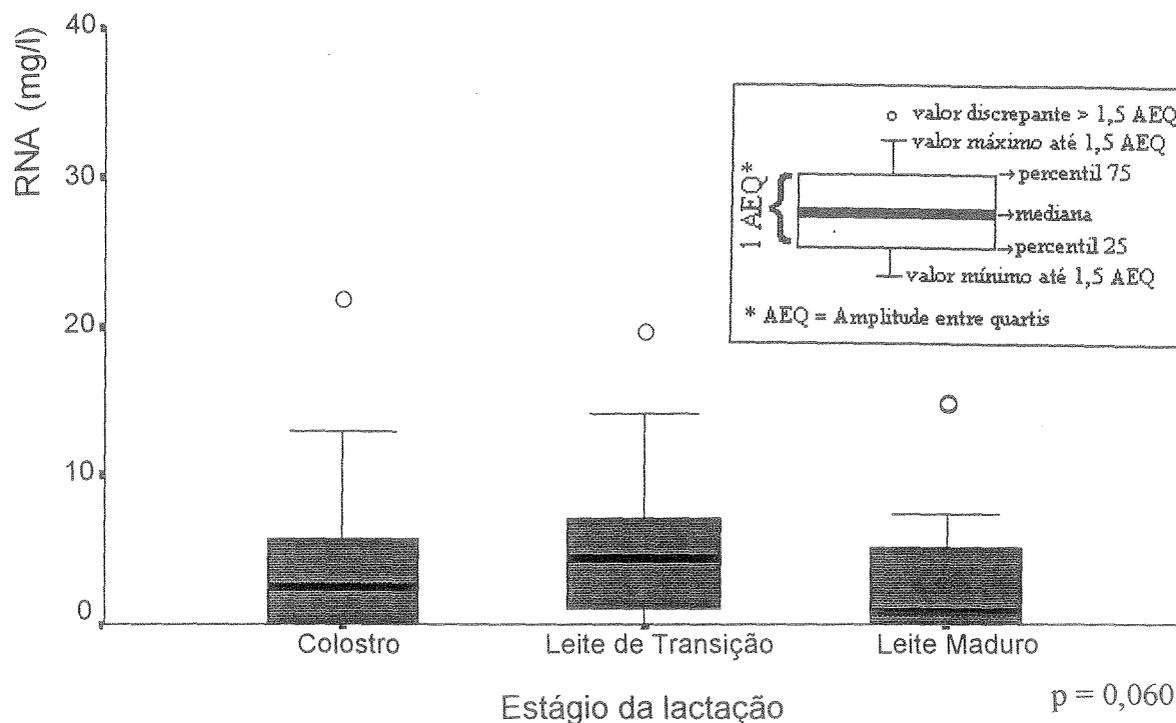


Fig. 12 - Concentração de RNA presente no leite de puérperas de acordo com o estágio da lactação

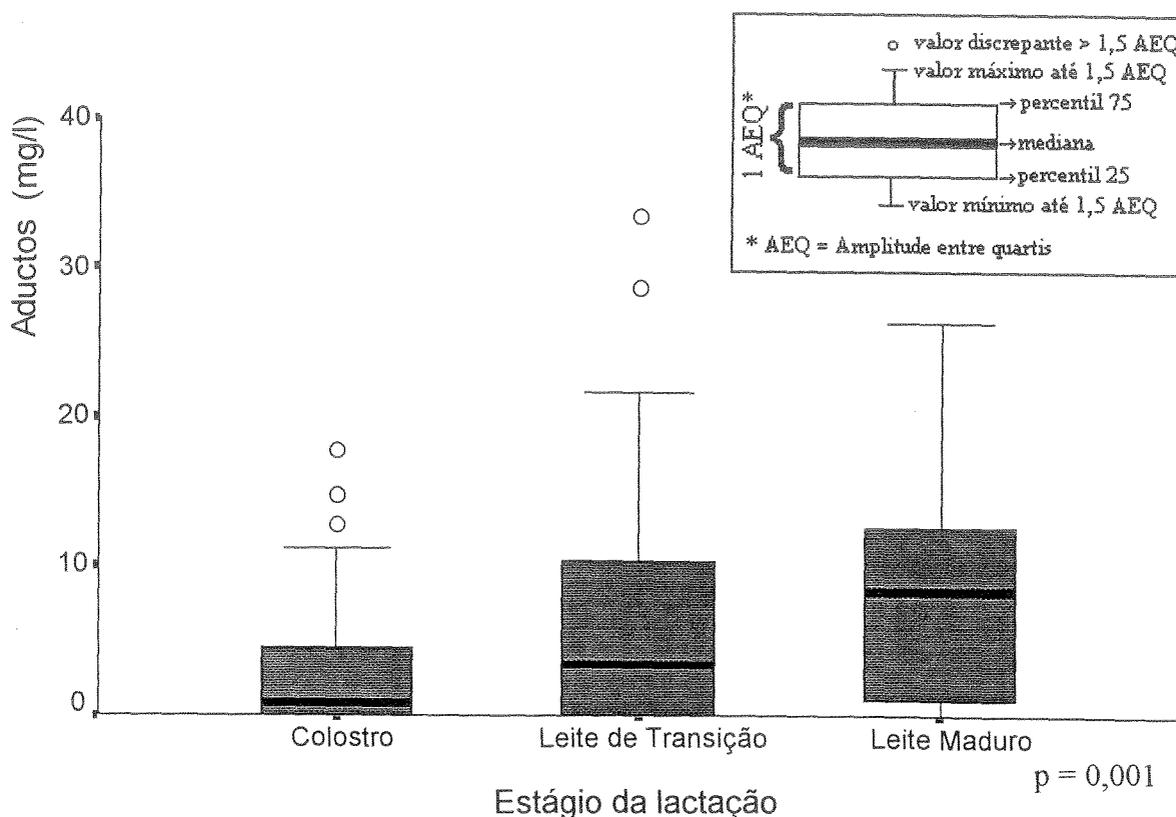


Fig. 13 - Concentração de aductos presentes no leite de puérperas de acordo com o estágio da lactação

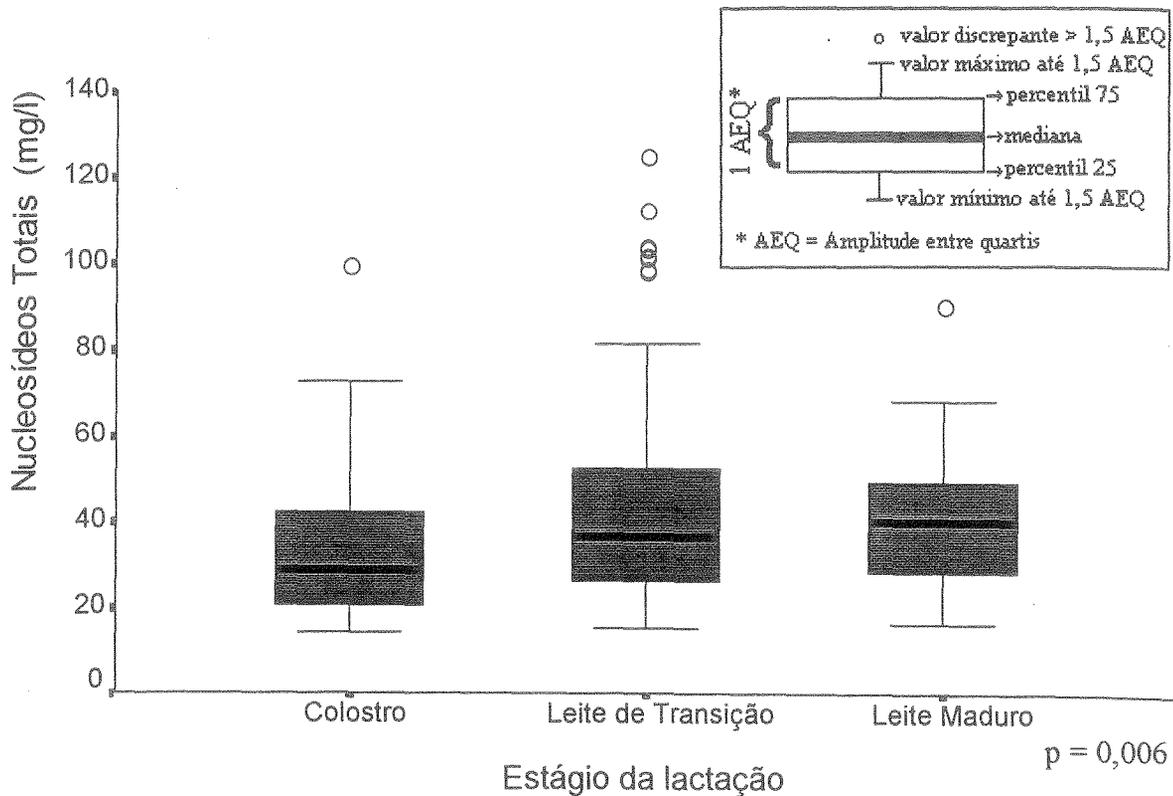


Fig. 14 - Concentração de nucleosídeos totais presentes no leite de púerperas de acordo com o estágio da lactação

5.3 - PORCENTAGENS DE NSs, NTs, RNA E ADUCTOS EM RELAÇÃO AOS NSsT

Na tabela 13, estão expressas porcentagens de NSs, NTs, RNA e aductos em relação aos NSsT de acordo com cada estágio da lactação e nos três estágios em conjunto.

TABELA 13

Porcentagens de NSs, NTs, RNA e aductos em relação aos NSsT de acordo com cada estágio da lactação e nos três estágios em conjunto

Índices bioquímicos	Colostro (%)	Leite de transição (%)	Leite maduro (%)	Três estágios em conjunto (%)	p*
NSs	20,64	15,60	12,63	16,35	0,366
NTs	58,58	59,65	60,58	59,57	0,985
RNA	11,91	11,16	7,07	10,23	0,509
Aductos	8,87	13,59	19,72	13,85	0,122

* Teste qui-quadrado

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas porcentagens de NSs, NTs, RNA e aductos, em relação aos NSsT, entre os estágios da lactação estudados, nem mesmo quando os três grupos foram avaliados em conjunto ($p > 0,05$). Sendo assim, é possível nos referirmos às porcentagens de cada um dos compostos acima em relação aos NSsT, no LH, independentemente do estágio da lactação, ou seja, nas amostras de LH coletadas de puérperas entre 1 e 30 dias pós-parto, os NSsT obtidos resultaram de 16,35% de NSs, 59,57% de NTs, 10,23% de RNA e 13,85% de aductos.

A figura 15 apresenta as porcentagens de NSs, NTs, RNA e aductos em relação aos NSsT de acordo com cada estágio da lactação e nos três estágios em conjunto.

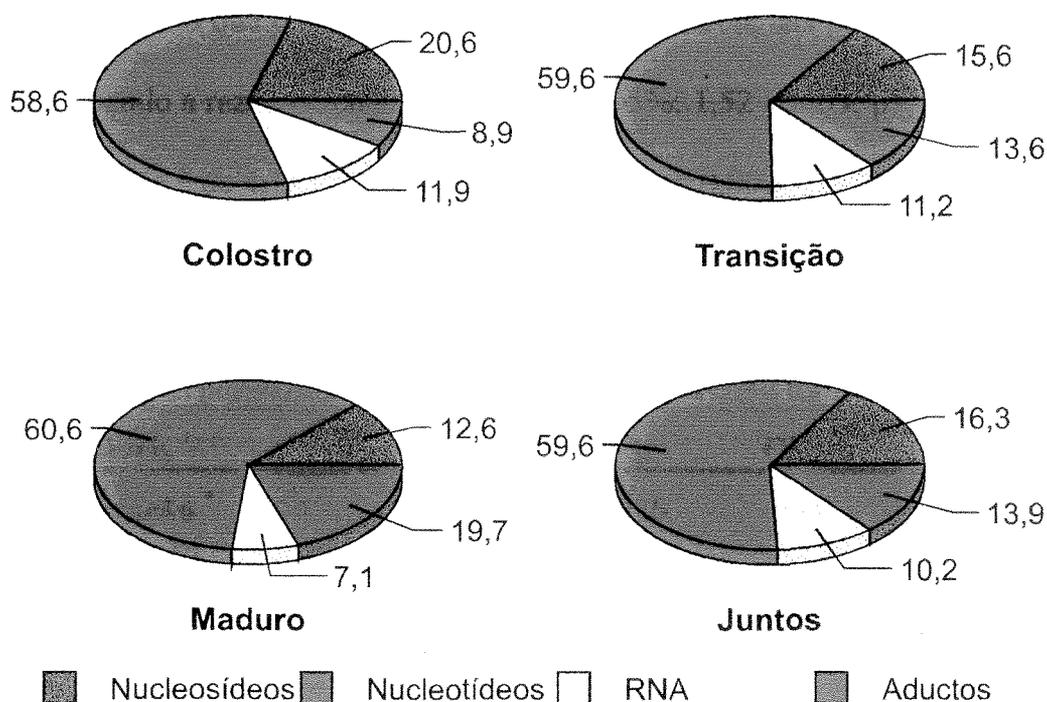


Fig. 15 - Porcentagens de nucleosídeos, nucleotídeos, RNA e aductos em relação aos nucleosídeos totais de acordo com cada estágio da lactação e nos três estágios em conjunto

5.4 - REGRESSÃO LOGÍSTICA

A tabela 14 apresenta o modelo de regressão logística multivariada sobre a concentração de NSsT no LH. Os dados mostram que, após o controle das variáveis idade gestacional, idade das puérperas, grau de nutrição, renda *per capita* e fumo na gestação, ainda encontramos diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de NSsT no leite das nutrizes conforme o estágio da lactação ($p < 0,05$) e considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%.

O leite de transição e o leite maduro apresentaram maior chance de ter NSsT acima da mediana do que o colostro, mesmo após o controle das possíveis variáveis de confusão, sendo a razão de chance de 3,62 (IC 95%: 1,52 – 8,63; $p = 0,004$) para o leite de transição e de 4,16 (IC 95%: 1,66 – 10,38; $p = 0,002$) para o leite maduro.

TABELA 14

Regressão logística multivariada sobre a concentração de NSsT no leite humano (variável dependente: concentração de NSsT acima da mediana)

Variáveis	Coefficiente	p	OR ^{*7}	IC 95% ^{*8}
Estágio da lactação ^{*1}	—	0,0026	1,00	—
leite de transição	1,2858	0,0037	3,62	1,52 - 8,63
leite maduro	1,4245	0,0023	4,16	1,66 - 10,38
Classificação da idade gestacional ^{*2}				
prematividade	0,3819	0,3249	1,46	0,68 - 3,13
Idade da puérpera ^{*3}	—	0,5125	1,00	—
20 a 34 anos	- 0,0109	0,9810	0,99	0,40 - 2,42
acima de 34 anos	0,5843	0,3354	1,79	0,55 - 5,89
Grau de nutrição ^{*4}	—	0,5657	1,00	—
normal	- 0,5500	0,3316	0,58	0,19 - 1,75
sobrepeso/obesidade	- 0,2669	0,6873	0,76	0,21 - 2,81
Renda ^{*5}				
≥ 2 salários-mínimos	0,5583	0,1550	1,75	0,81 - 3,77
Fumo ^{*6}				
sim	0,4087	0,4267	1,50	0,55 - 4,12
Constante	- 1,0510			

* 1 referência: colostro

* 2 referência: a termo

* 3 referência: menos de 20 anos

* 4 referência: baixo peso

* 5 referência: menos de 2 salários mínimos

* 6 referência: não fuma

* 7 OR: razão de chance

* 8 IC: intervalo de confiança

6 - DISCUSSÃO

Considerando a importância dos NTs e NSs para vários processos bioquímicos e biológicos e levando em conta que o LH é a melhor fonte desses compostos para os lactentes (106,111,112,113,114), na impossibilidade do aleitamento materno, uma fórmula contendo NTs em concentrações semelhantes às presentes no LH seria a melhor alternativa para oferecer artificialmente esses compostos tão importantes. A escolha do que administrar, em que quantidades e para que grupos de crianças é difícil, pois as evidências são incompletas, embora estudos em animais e em humanos sejam muito sugestivos sobre as potenciais vantagens de incluir NTs na dieta de crianças pequenas (1, 3, 4). O mais desejável seria uma suplementação seguindo o modelo do perfil de NTs encontrado no LH. Esse perfil é muito diferente do existente em fórmulas com leites artificiais oriundas de outras espécies animais, com predomínio do leite de vaca (103,104,105,106,107,108,109,110). Acreditamos que, quando as incertezas sobre o conteúdo de NSsT potencialmente disponíveis para serem absorvidos pelo intestino, incluindo aí os NTs, NSs, ácidos nucleicos e aductos presentes no LH forem melhor elucidadas, poderemos enriquecer as fórmulas infantis com as quantidades mais adequadas desses compostos.

Em razão da ausência de referências na literatura, até o momento, relativas às concentrações dos elementos acima mencionados no leite de mães de PMTs, optamos por explorar esse aspecto em nosso trabalho, esperando estar contribuindo com uma informação inédita sobre o tema e considerando que o leite de mães de PMTs apresenta diferenças, já estudadas, em outros componentes, como por exemplo mais proteínas, lipídios, calorias, lactoferrina e IgA e menos lactose do que o de mães de RNs AT (123,124,125,126,127).

Também não encontramos estudos bem definidos, mas apenas suposições sobre alguns dos fatores que poderiam ter influência sobre as concentrações de NSs e NTs no LH, como por exemplo, idade, grau de nutrição, nível sócio-econômico e fumo, avaliados em nossa pesquisa.

Durante a última década, vem sendo estudado o papel que os NTs poderiam desempenhar na dieta, especialmente em crianças pequenas (1,2,3,4,5,6). Recentemente, tem sido sugerido que NSs na dieta também seriam importantes (66, 108, 111, 112). Entretanto, ainda são poucos os trabalhos sobre o conteúdo de NTs e NSs no LH.

Os valores dos nutrientes do LH mudam durante a lactação. Existe uma variabilidade substancial de mulher para mulher e de dia para dia nos nutrientes individuais do LH (100,101,102).

Conforme já referido na Introdução, em todas as células, as concentrações de RNA são maiores do que as de DNA e relativamente constantes, enquanto as de DNA variam com o estágio do ciclo celular, constituindo apenas 5% a 10% do total de ácidos nucléicos (11). Sanguansermri e colaboradores (12), em 1974, relataram níveis de DNA de 10-20 mg/l e de RNA de 100-600 mg/l no LH coletado entre o 5º dia e a 8ª semana de lactação. Contudo, esses valores foram considerados pouco específicos, já que os métodos de análise não envolveram isolamento seletivo dos ácidos nucléicos antes das determinações. Até o momento, todos os outros autores que pesquisaram NTs e/ou NSs no leite, na realidade, avaliaram RiboNTs e RiboNSs. Como todas as pesquisas sobre NTs metabolicamente ativos têm se restringido aos compostos contendo ribose, os com deoxirribose também não foram considerados em nosso trabalho. Desta forma, os termos NS e NT referem-se somente aos compostos contendo ribose, ou seja, RiboNTs e RiboNSs, assim como nos demais estudos.

Kobata e colaboradores (103), em 1962, foram os primeiros a determinar o conteúdo de NTs no leite bovino e no humano, utilizando cromatografia de troca de íons e eletroforese para isolar cada NT. Devido à baixa sensibilidade do método, foram necessários dois litros de leite, e as mudanças na sua composição durante a lactação não puderam ser analisadas.

Após esse estudo, surgiram outros trabalhos sobre o conteúdo e a composição dos NTs no LH. Existem variações nos valores apresentados, sendo difícil definir

quanto dessas variações poderia ser atribuído aos métodos de coleta e preparação das amostras ou aos procedimentos analíticos (106,111,112,113,114).

Investigações iniciais determinaram NTs a partir de repetidas cromatografias de troca de íons de amostras de LH desproteínizado e deslipidizado (104,105,115, 116). Mais recentemente, alguns pesquisadores passaram a avaliar NTs usando HPLC (111,112,114,118,120,121). Outros procuraram determinar níveis de NTs no LH por radioimunoensaio de amostras desproteínizadas e deslipidizadas (107,113). O ideal seria utilizar uma metodologia *standard* tanto para coletar quanto para analisar com clareza as características dos NTs no LH.

Avaliando os trabalhos anteriores e, na impossibilidade de abranger muitos dos aspectos ainda obscuros com relação ao tema da pesquisa, optamos por estabelecer algumas prioridades.

Dada a importância da biossíntese de NTs para a proliferação celular e considerando que o gasto energético da síntese “de novo” das bases nitrogenadas requer significativamente mais energia do que a rota “de salvamento” (5 mols de ATP contra 1 mol de ATP para cada MNT produzido), do ponto de vista evolutivo, esta última teria uma vantagem seletiva para o rápido crescimento dos organismos (9, 10). Como os NTs e os NSs são necessários para o desenvolvimento e a maturação do trato gastrointestinal e do sistema imunológico, entre outros, e levando em conta que esses sistemas falham ou têm uma capacidade limitada para a síntese “de novo” das bases nitrogenadas (29, 30), a fonte real dessas bases é

particularmente importante. Desta forma, os NTs e NSs poderiam ser considerados como nutrientes “condicionalmente” essenciais (2,5,6,7). Já que mais de 90% dos NTs ingeridos são absorvidos como NSs (21,22), interessou-nos a abordagem de Leach e colaboradores (111), em um trabalho realizado em 1995, avaliando a quantidade de NTs, NSs, ácidos nucleicos (foi estudado apenas o RNA) e aductos presentes no LH e que poderiam ser absorvidos como NSs durante a digestão, ou seja, o total de NSs potencialmente disponíveis para absorção.

Sendo assim, em nosso estudo optamos por avaliar a concentração dos NSsT do LH, que seriam aqueles potencialmente disponíveis para absorção, a partir da obtenção das concentrações de RNA, NTs monoméricos, NSs livres e aductos encontrados no leite humano de uma amostra de nutrizes do HCPA.

A escolha do HCPA para sede do estudo foi motivada pelo fato de esse ser um hospital preocupado com o aleitamento materno, contando com uma equipe que o incentiva e dispendo de um Banco de Leite que funciona durante as 24 horas do dia e que possui máquinas para extração mecânica do leite e condições adequadas para coleta e conservação das amostras. Além disso, a população atendida pelo HCPA é mista, tanto previdenciária, como privada, tornando possível uma análise das condições sócio-econômicas e nutricionais, já que nos propusemos a avaliar se esses fatores poderiam influenciar na concentração dos NSsT disponíveis para absorção.

Optamos por concentrar nosso estudo nas nutrízes entre 1 e 30 dias pós-parto e, a partir daí, comparar a concentração de NSsT nas amostras de leite coletadas entre as mães de PMTs e as mães de RNs AT, dados estes não disponíveis na literatura até o momento. Assim como Leach e colaboradores (111), nos propusemos a avaliar a concentração de NSsT de acordo com o estágio da lactação, sendo que, como não há um critério bem definido para delimitar cada estágio (123, 124), estabelecemos que as amostras de leite coletadas do 1º ao 5º dia pós-parto seriam consideradas como colostro, do 6º ao 14º dia, como leite de transição e, a partir do 15º dia pós-parto, como leite maduro. Janas e Picciano (114) avaliaram amostras de leite entre a 2ª e a 12ª semana pós-parto, com intervalos de duas em duas semanas (não avaliaram colostro). Gil e Sánchez-Medina (113) analisaram as amostras de leite com 48 e 72 horas, com 6 e 15 dias e com 1 e 3 meses pós-parto, não especificando a divisão entre colostro, leite de transição e leite maduro. Seus resultados compararam colostro e leite maduro (com 1 mês de lactação).

Quinty e colaboradores (120) coletaram amostras de leite maduro e não compararam estágios da lactação, assim como Thorell e colaboradores (121). Sugawara e colaboradores (112) avaliaram o conteúdo de NTs e NSs no leite conforme o estágio da lactação, mas iniciaram a partir do 3º dia pós-parto (colostro foi considerado de 3º ao 5º dia pós-parto, leite de transição do 6º ao 15º dia e leite maduro a partir do 16º até 482 dias pós-parto). Leach e colaboradores (111) dividiram as amostras de leite em quatro estágios: colostro (até 2 dias pós-parto),

leite de transição (3 a 10 dias pós-parto), leite maduro precoce (1 mês pós-parto) e leite maduro tardio (3 meses pós-parto).

Com relação ao tamanho da amostra, obedecemos ao cálculo do tamanho mínimo ($n = 10$ amostras de leite por grupo), com base nos dados estatísticos (130). Janas e Picciano (114) coletaram 16 amostras de leite de cada uma das 5 mulheres do estudo; Gil e Sánchez-Medina (113) coletaram leite de 4 mulheres em 6 períodos diferentes (conforme já descrito anteriormente), ou seja, 4 amostras de leite para cada período estabelecido, num total de 24 amostras. Quinty e colaboradores (120) coletaram 18 amostras de leite maduro, comparando a concentração de NTs no início, meio ou final da mamada e conforme o horário das coletas (manhã, meio-dia e tarde). Thorell e colaboradores (121) coletaram amostras de leite de 14 mulheres entre 3 a 24 semanas pós-parto (1 amostra de cada nutriz, ou seja, 14 amostras no total). Leach e colaboradores (111) coletaram amostras de 100 mulheres de três países da Europa e as agruparam conforme os quatro estágios da lactação por eles estabelecidos, comparando-as também com 11 amostras de leite maduro de mulheres americanas, para avaliar eventuais efeitos da cultura e da dieta.

Em nosso estudo, foram necessários 12 meses para que se completasse a coleta das amostras de LH no Banco de Leite do HCPA. Na realidade, coletamos 150 amostras de leite, tentando reunir ao menos 20 em cada grupo estudado (PMT/colostró, PMT/leite de transição, PMT/leite maduro, RN AT/colostró, RN AT/leite de transição, RN AT/leite maduro), mas tivemos 9 perdas (3 amostras de

leite de transição de mães de RNs AT e 6, de leite maduro de mães de RNs AT), resultando assim em 141 amostras efetivamente analisadas.

Embora o Banco de Leite do HCPA funcione durante as 24 horas do dia, tivemos o cuidado de fazer as coletas sempre no turno da manhã e sempre pela mesma funcionária, sob supervisão da autora do trabalho, para que todas as amostras fossem coletadas exatamente da mesma forma e porque há relatos na literatura de variações na concentração de NTs conforme o horário da coleta, com aumento à tarde em relação às coletas da manhã (111).

Além disso, se a nutriz apresentasse alguma patologia ou estivesse utilizando alguma medicação no período da coleta, seu leite também não era aproveitado, já que não há dados conclusivos na literatura a respeito de patologias ou medicações que possam alterar a concentração de NTs e NSs no LH (1, 3, 4, 27, 111).

Nossas maiores dificuldades foram relacionadas às amostras de leite de transição e, principalmente, de leite maduro de mães de RNs AT, pois a grande maioria das nutrizes que frequenta o Banco de Leite do HCPA está com seus filhos internados na Unidade de Neonatologia, sendo que os RNs AT em geral têm alta hospitalar antes de 15 dias de vida (quando iniciaria o período de leite maduro). Nos casos com internação mais prolongada ou baixas externas, as mães em geral não estavam presentes no turno da manhã e muitas nem vinham ao hospital. Sendo assim, com exceção do colostro, foi mais fácil coletar o leite de mães de PMTs do que o de mães de RNs AT.

Nos estudos anteriores, não houve a preocupação em avaliar as condições das nutrizes que talvez pudessem influenciar na concentração dos NSsT no leite. Em nosso trabalho, optamos por avaliar algumas dessas condições, quais sejam, idade, grau de nutrição, nível sócio-econômico (incluindo renda *per capita* e saneamento básico) e fumo, além do estágio da lactação e idade gestacional já citados anteriormente. Apenas no estudo de Sugawara e colaboradores (112) foi citada a idade das nutrizes.

Avaliamos também cor, paridade, tipo de parto, peso no início da gestação, altura e ganho ponderal na gestação, comparando essas características das nutrizes em relação à distribuição nos grupos conforme a idade gestacional e o estágio da lactação, para afastarmos possíveis fatores de confusão que poderiam interferir nos resultados encontrados.

Com relação aos resultados de nossa pesquisa, inicialmente houve a preocupação em avaliar as características gerais da população para, em seguida, comparar essas características entre os grupos divididos conforme o estágio da lactação e a idade gestacional em relação ao parto.

Cabe comentar que, no tocante aos aspectos sócio-econômicos da população estudada, encontramos apenas 4 (3,6%) puérperas com renda abaixo da linha de pobreza (abaixo de 0,5 SM *per capita*) e apenas 2 (1,8%) que residiam em condições de habitação inadequadas. Conforme a *Pesquisa Nacional de Amostragem de Domicílios* (139), as condições de saneamento básico da população

brasileira estão intimamente ligadas à renda familiar, sendo que mais de 50% da população brasileira vive abaixo da linha de pobreza e em condições de habitação inadequadas. Logo, a população em estudo apresentou uma situação sócio-econômica superior à esperada, indicando que o HCPA possivelmente atenda uma população um pouco mais diferenciada do que a que procura outros hospitais que prestam atendimento pelo SUS.

Quanto ao uso de álcool ou de drogas durante a gestação, todas as nutrizes responderam não ter feito uso dos mesmos nesse período. Isso pode ser explicado pelo fato de as mulheres com patologias possíveis de serem transmitidas através do leite humano (como síndrome de imunodeficiência adquirida, hepatite e citomegalovirose) assim como as com outras infecções terem sido excluídas da pesquisa, já que o uso de álcool e, principalmente, de drogas encontra-se mais freqüentemente associado a essas patologias (123, 126).

Ao avaliarmos as características da população de acordo com a idade gestacional por ocasião do parto, encontramos uma diferença estatisticamente significativa com relação à média de peso no início da gestação entre mães de PMTs e mães de RNs AT ($p = 0,019$). Essa diferença, contudo, não se refletiu no IMC ou no grau de nutrição das puérperas no início da gestação, ou seja, não detectamos diferenças estatisticamente significativas no IMC e no grau de nutrição entre os dois grupos estudados ($p > 0,05$).

Da mesma forma, não verificamos diferenças estatisticamente significativas com relação a idade, altura, cor, tipo de parto, paridade, fumo na gestação, procedência, ganho ponderal na gestação e renda *per capita* entre as mães de PMTs e as de RNs AT ($p > 0,05$).

Como nos dois grupos as características das nutrizes não diferiram estatisticamente, foi possível compará-los quanto à concentração de NSsT nas amostras de leite coletadas.

Quando agrupamos as puérperas conforme o estágio da lactação, não registramos diferenças estatisticamente significativas com relação a todas as características avaliadas ($p > 0,05$), com exceção do fumo na gestação, que mostrou uma diferença estatística limítrofe ($p = 0,049$) entre os grupos estudados, localizada entre as mães com leite de transição e as mães com colostro, as quais fumavam significativamente mais do que as primeiras ($p = 0,028$). Não há referências na literatura sobre esse dado, que foi encontrado ao acaso. Posteriormente essa variável foi reavaliada na regressão logística, que será comentada mais adiante.

Antes de discutirmos os resultados obtidos, é importante que façamos alguns comentários sobre a metodologia adotada. O levantamento bibliográfico mostrou que os trabalhos apresentados até o momento com relação às concentrações de NTs e NSs no LH utilizaram metodologias diferentes tanto para coletar quanto para analisar os resultados.

Janas e Picciano (114), em 1982, avaliaram o conteúdo de nitrogênio total e NTs no decorrer da 2^a a 12^a semana pós-parto, com a utilização de HPLC. Embora tenham determinado o conteúdo de NTs, nada mencionaram sobre NSs. Observaram variações nos NTs individualmente com o avanço da lactação, mas os níveis totais de NTs permaneceram constantes, em torno de 1.850 a 2.100 mg/100 ml.

Gil e Sánchez-Medina (113), em 1982, avaliaram os NTs no LH por análises enzimáticas e cromatografia com troca de íons nos diferentes estágios da lactação. Embora o método seja bastante sensível para cada NT, para obter um perfil completo dos NTs seria necessária uma quantidade grande de leite e o procedimento seria demorado. O padrão de NTs encontrado no leite maduro foi qualitativamente similar ao do colostro, mas a concentração de NTs no leite maduro foi menor do que no colostro e diminuiu com o avanço da lactação. Os autores encontraram valores de 13,3 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ de NTs no colostro e de 10 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ no leite maduro (com 3 meses de lactação).

Quinty e colaboradores (120), em 1992, quantificaram níveis de MNTs, utilizando HPLC, e não encontraram variações nos valores em relação ao início, meio ou final da mamada e mínimas variações (não significativas estatisticamente) entre as coletas da manhã, meio-dia e tarde. Observaram que os níveis de MNTs tenderam a ser constantes para cada uma das 18 doadoras, mas que havia substanciais diferenças entre elas. O valor médio de MNTs encontrado foi de $30,9 \pm 8,3\ \mu\text{g/l}$.

Sugawara e colaboradores (112), em 1995, avaliaram o conteúdo de NTs e NSs do LH por HPLC, agrupando as amostras conforme a estação do ano, a área geográfica e o estágio da lactação (a partir do 3º dia pós-parto). Constataram que a quantidade total de NSs e NTs foi maior no inverno do que no verão e, embora as razões para isso sejam desconhecidas, questionaram se isso seria devido a uma maior necessidade desses compostos pelas crianças nessa estação do ano. Sugeriram também que os hábitos alimentares das nutrizes poderiam afetar as concentrações de NTs e NSs no LH, mas, para comprovar essas observações, seriam necessárias maiores informações sobre as diferenças de hábitos alimentares nas diversas áreas do Japão, onde o trabalho foi realizado.

Os resultados apresentados por Sugawara e colaboradores (112) foram os seguintes, em relação às amostras coletadas no inverno:

- NSs (em $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$) – 3 a 5 dias: 5,27; 6 a 10 dias: 3,06; 11 a 15 dias: 5,37; 16 a 30 dias: 6,60.
- NTs (em $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$) – 3 a 5 dias: 11,50; 6 a 10 dias: 9,98; 11 a 15 dias: 2,62; 16 a 30 dias: 3,83.

Já nas amostras coletadas no verão, os resultados foram:

- NSs (em $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$) – 3 a 5 dias: 4,00; 6 a 10 dias: 3,70; 11 a 15 dias: 3,47; 16 a 30 dias: 3,12.

- NTs (em $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$) – 3 a 5 dias: 3,06; 6 a 10 dias: 1,66; 11 a 15 dias: 1,65; 16 a 30 dias: 1,66.

Leach e colaboradores (111), em 1995, avaliaram o TNPd do LH, de acordo com o estágio da lactação. Tanto os RiboNSs livres originais quanto os liberados enzimaticamente foram quantificados por HPLC, para determinar o TNPd, sendo que a metodologia simulou a digestão *in vivo*. A concentração média do TNPd foi de $189 \pm 70 \mu\text{mol/l}$ (com uma variação de 82 a $402 \mu\text{mol/l}$). Esses autores também observaram uma variação substancial na concentração do TNPd em cada estágio e durante toda a lactação entre as amostras de leite individuais. Como a dieta varia com a nacionalidade, não consideraram a dieta materna individual como fator de influência nessa variação. Também não foi encontrada relação consistente entre a concentração de TNPd e o país no qual as mulheres residiam. Nesse estudo, as amostras de colostro apresentaram níveis mais baixos do TNPd ($137 \mu\text{mol/l}$) do que as amostras de leite maduro ($240 \mu\text{mol/l}$). Os pesquisadores avaliaram também a porcentagem de cada uma das frações estudadas em relação ao TNPd e verificaram predomínio de NTs monoméricos ou livres ($36 \pm 10\%$) e poliméricos ou RNA ($47 \pm 8\%$). NSs livres ($8 \pm 6\%$) e NSs provenientes dos aductos ($9 \pm 4\%$) tiveram uma pequena mas significativa contribuição.

Thorell e colaboradores (121), em 1996, analisaram amostras de leite, após a lactação já estabelecida, com relação à concentração dos ácidos nucleicos e metabólitos dos RiboNTs, também utilizando HPLC. Expressos como NTs

equivalentes, $68 \pm 55 \mu\text{mol/l}$ estavam presentes como ácidos nucleicos (mais especificamente RNA), $84 \pm 25 \mu\text{mol/l}$ como NTs e $10 \pm 2 \mu\text{mol/l}$ como NSs.

Feitos os comentários acima, podemos observar que há poucos trabalhos especificamente sobre a concentração de NSs e NTs no LH, sendo que cada um deles apresenta um enfoque diferente, inclusive com diferenças nas próprias unidades de referências. Janas e Picciano (114) utilizaram $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$; Gil e Sánchez-Medina (113), Kobata e colaboradores (103) e Sugawara e colaboradores (112) usaram $\mu\text{mol}/100 \text{ ml}$; Quilty e colaboradores (120), $\mu\text{g}/\text{l}$; Leach e colaboradores (111) e Thorell e colaboradores (121), $\mu\text{mol}/\text{l}$.

Após avaliação desses trabalhos, aquele que nos pareceu contribuir com mais informações e estar mais próximo ao que pretendíamos realizar foi o de Leach e colaboradores (111), fornecendo o TNPD, ao considerar todas as fontes de NSs e NTs que podem ser absorvidas durante a digestão.

Esse estudo avaliou o TNPD em relação aos estágios da lactação e possíveis efeitos da cultura e da dieta em quatro diferentes locais da Europa. Em nossa pesquisa, procuramos avaliar a concentração de NSsT e suas frações também em relação aos estágios da lactação, mas incluímos ainda a avaliação quanto à idade gestacional, considerando que existem algumas outras diferenças entre o leite de mães de PMTs e o de mães de RNs AT (123,124,125,126,127). Além disso,

investigamos possíveis influências da idade, do grau de nutrição, da renda e do fumo no tocante às concentrações de NSsT no leite das nutrizes.

Ao compararmos as concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT tanto no colostro quanto no leite de transição e no leite maduro entre mães de PMTs e mães de RNs AT, não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$), ou seja, as concentrações desses compostos não variaram entre o leite de mães de PMTs e o de mães de RNs AT. Não há, até o momento, publicações na literatura com este enfoque, portanto, os dados não podem ser comparados com os de outros estudos. Obtivemos, no que diz respeito aos NSsT, valores de 28,61 mg/l (mães de PMTs) e de 29,36 mg/l (mães de RNs AT) em relação ao colostro; 37,41 mg/l (mães de PMTs) e 36,20 mg/l (mães de RNs AT) em relação ao leite de transição; 40,55 mg/l (mães de PMTs) e 41,28 mg/l (mães de AT) em relação ao leite maduro.

Ao avaliarmos as concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT no leite de mães de PMTs nos três estágios de lactação, encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos apenas quanto ao RNA ($p = 0,034$), localizada entre o leite de transição e o leite maduro, achado que não se repetiu no leite de mães de RNs AT.

No que tange ao leite de mães de RNs AT, observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos apenas em relação aos aductos

($p = 0,002$), localizada entre o colostro e o leite maduro, e que não se manifestou no leite de mães de PMTs.

Revisando a literatura disponível, não encontramos justificativa para esses achados. Além disso, quando comparamos as concentrações de NSs, NTs, RNA, aductos e NSsT entre o leite de mães de PMTs e o de mães de RNs AT, não registramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

Com relação aos NTs e NSsT tanto no leite de mães de PMTs quanto no de mães de RNs AT, parece existir diferença entre os estágios da lactação, embora não tenha sido atingido o nível de significância estatística estabelecido ($\alpha = 0,05$). Observando os valores obtidos nessas variáveis, julgamos que, se aumentássemos o tamanho da amostra, provavelmente seria detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Como não havíamos constatado diferenças estatisticamente significativas entre o leite de mães de PMTs e o de mães de RNs AT em relação aos índices bioquímicos examinados, optamos por reunir os dois grupos e reavaliar novamente as amostras conforme os três estágios da lactação estudados, na tentativa de uma melhor definição para os resultados anteriormente encontrados.

Detectamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p < 0,05$) em relação aos NTs, aductos e NSsT. Observamos que a concentração de NTs no colostro foi significativamente menor do que no leite de transição ($p = 0,01$)

e no leite maduro ($p = 0,006$). Em relação aos aductos, os valores foram significativamente menores no colostro do que no leite maduro ($p = 0,001$). Quanto aos NSsT, obtivemos valores significativamente menores no colostro do que no leite de transição ($p = 0,02$) e no leite maduro ($p = 0,006$).

Outros autores não compararam as frações dos NSsT entre os estágios da lactação, mas sim os NSs individualmente, como uridina, citidina, guanosina e adenosina e a soma deles como NSs e/ou NTs totais.

Kobata e colaboradores (103), Quinty e colaboradores (120) e Thorell e colaboradores (121) não avaliaram o estágio da lactação em seus trabalhos. Janas e Picciano (114) encontraram variações nos NTs individualmente com o avanço da lactação, mas os níveis totais permaneceram constantes. Gil e Sánchez-Medina (113) e Sugawara e colaboradores (112) encontraram valores de NTs e de NSs maiores no colostro, diminuindo no decorrer da lactação.

Já Leach e colaboradores (111) encontraram valores de TNPD menores no colostro (considerado a partir do 1º dia pós-parto, assim como em nosso trabalho), aumentando no decorrer da lactação.

A metodologia que adotamos foi similar à de Leach e colaboradores (111), e os resultados tiveram a mesma tendência.

Para podermos comparar os valores obtidos com os de estudos anteriores, tivemos de procurar equivalências entre as unidades de referência citadas.

Considerando os pesos moleculares dos NSs (uridina: 0,244 mg/l = 1 μ mol/l; citidina: 0,243 mg/l = 1 μ mol/l; guanosina: 0,283 mg/l = 1 μ mol/l; adenosina: 0,267 mg/l = 1 μ mol/l), a média dos valores, assumindo uma equivalência entre purinas e pirimidinas, seria de 0,260 mg/l = 1 μ mol/l.

Desta forma, teríamos os seguintes valores encontrados por Leach e colaboradores (111) em relação ao TNPD: 35,62 mg/l (137 μ mol/l) no colostro, 46,02 mg/l (177 μ mol/l) no leite de transição e 62,40 mg/l (240 μ mol/l) no leite maduro. Em nosso trabalho, encontramos em relação aos NSsT: 28,93 mg/l (111,3 μ mol/l) no colostro, 36,81 mg/l (141,6 μ mol/l) no leite de transição e 40,55 mg/l (156 μ mol/l) no leite maduro.

Thorell e colaboradores (121) analisaram o LH maduro quanto às concentrações de RNA, NSs e NTs, denominando a soma desses valores de NTs equivalentes. As concentrações encontradas podem ser comparadas às do leite maduro de nosso trabalho e do de Leach e colaboradores (111). Eles detectaram 17,68 mg/l (68 μ mol/l) de RNA, 21,84 mg/l (84 μ mol/l) de NTs e 2,6 mg/l (10 μ mol/l) de NSs e uma quantidade total de NTs equivalentes de 42,12 mg/l (162 μ mol/l).

Na tabela 15, podemos ver uma comparação entre as porcentagens de NSs, NTs, RNA e aductos em relação aos NSsT em nosso trabalho, ao TNPD no de

Leach e colaboradores (111) e ao total de NTs equivalentes no de Thorell e colaboradores (121), lembrando que estes últimos não dosaram os aductos.

TABELA 15
Porcentagens de NSs, NTs, RNA e aductos em relação aos NSsT e comparação com dados de literatura

Índices bioquímicos	Leach e colaboradores (111) (%)	Thorell e colaboradores (121) (%)	Presente trabalho (%)
NSs	8,0	6,2	16,3
NTs	36,0	51,8	59,6
RNA	47,0	42,0	10,2
Aductos	9,0	-	13,9
Total	100 (TNPD)	100 (NTs equivalentes)	100 (NSsT)

Nessa tabela, podemos observar que nossa porcentagem e, conseqüentemente, nossas dosagens de RNA foram mais baixas do que as da literatura, ao passo que as de NTs e NSs foram um pouco mais altas. Isso poderia ter ocorrido porque o RNA sofre uma rápida hidrólise por intermédio das nucleases, sendo que sua ação começa a ocorrer em aproximadamente 15 minutos. Portanto, pode não ter havido um congelamento suficientemente rápido para evitar a ação dessas enzimas, havendo uma transformação de RNA para NTs livres antes que esses compostos pudessem ser analisados.

Outros estudos que dosaram apenas o conteúdo de NTs e/ou NSs livres no LH (sem considerar RNA e aductos) subestimaram o total de NSs disponíveis para absorção em 24% (no presente trabalho) a 57% (Leach e colaboradores – 111).

É importante comentar que todos os trabalhos (103,111,112,113,114,120, 121) referem uma grande variabilidade nas concentrações dos compostos estudados no leite de mulher para mulher, considerando tal fato como uma propriedade do LH. Assim como ocorreu com nossa amostra e observando as amplitudes de variação descritas nos resultados obtidos pelos autores mencionados, provavelmente esses valores devam ter seguido uma curva de distribuição assimétrica. Sendo assim, do ponto de vista estatístico, teria sido mais adequada a utilização de valores de mediana, amplitude de variação e AEQ para descrever os resultados encontrados. Também consideramos interessante adotar a técnica gráfica de *boxplot* nas figuras, por ilustrar de forma mais abrangente os resultados obtidos (142,143,144). Tukey (143), ao descrever essa técnica, comenta que, se os dados tivessem uma distribuição normal, o valor de 1,5 AEQ corresponderia ao percentil 95, sendo essa a justificativa para estabelecer o limite acima, a partir do qual os valores seriam considerados discrepantes.

Cabe ainda algum comentário a respeito do modelo de regressão logística sobre a concentração de NSsT no LH que realizamos em nosso trabalho. Nesse modelo, colocamos as variáveis idade gestacional, estágio da lactação, idade das puérperas, grau de nutrição, renda *per capita* e uso de fumo na gestação. Após o

controle dessas variáveis, encontramos diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de NSsT no leite das nutrizas apenas com relação ao estágio da lactação, ou seja, em nosso estudo, a idade das mulheres, o grau de nutrição, a renda *per capita* e o fumo na gestação, além da idade gestacional por ocasião do parto (já comentada anteriormente) não mostraram influência na concentração de NSsT do LH. Com relação a esses dados, também não encontramos referências na literatura até o momento.

Paralelamente ao que já foi discutido, trabalhos avaliando o leite bovino e as fórmulas infantis (feitas com leite de vaca) não detectaram NSs nesses leites, os quais apresentavam também uma quantidade muito menor de NTs do que o LH (103,107,108,109,110,112,121). A partir disso, tem sido sugerido que os NTs e os NSs encontrados no LH poderiam desempenhar importante papel no desenvolvimento da criança. Entretanto, até o momento, ainda permanecem dúvidas sobre serem os NSs e os NTs no LH ativamente secretados em resposta a uma demanda nutricional do lactente ou como resultado de eventos metabólicos dentro das células secretórias mamárias (108, 119, 121).

Há um grande interesse em pesquisas clínicas sobre a nutrição infantil e, mais especificamente, sobre a quantidade de RiboNTs e RiboNSs no LH para uso em fórmulas infantis. A digestão enzimática *in vitro*, demonstrada na figura 3, se aproxima da digestão *in vivo*. NTs monoméricos foram obtidos a partir da transformação de RNA e aductos pela ação de nucleases e pirofosfatases,

respectivamente. NTs livres e liberados enzimaticamente foram hidrolisados para NSs, a forma mais freqüente de absorção intestinal, pela ação de fosfatases (3,4). A mensuração dos NSs livres seguida pela aplicação seqüencial das três hidrólises enzimáticas estimou as concentrações de NSsT e de suas frações sob forma de RNA, NTs, NSs e aductos, sendo que essas medidas puderam simular com acurácia o processo digestivo *in vivo*.

Para avaliar a capacidade endógena dos RNs em metabolizar RNA e NTs, Thorell e colaboradores (121) analisaram o intestino delgado de um feto de 22 semanas de idade gestacional em relação às enzimas digestivas e observaram que ocorreu transformação do RNA em citidina, uridina e ácido úrico *in vitro*. Esses resultados sugerem que o intestino dos PMTs poderia ter capacidade de digerir RNA, assim como NTs e NSs e que, portanto, a suplementação de fórmulas infantis com esses compostos ou com uma combinação deles deveria ser considerada. Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer se os processos digestivos do RN têm suficiente capacidade ou se RNA, NTs, NSs e aductos presentes no LH têm o objetivo de auxiliar a baixa capacidade digestiva endógena. Sendo assim, naquelas situações em que o uso de LH não for possível, cabe considerar a importância da adição desses compostos nas fórmulas infantis em quantidades comparáveis às concentrações de NSsT encontradas no LH.

7 - CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos a que nos propusemos e pela análise dos dados obtidos de 141 amostras de leite de puérperas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, podemos estabelecer as conclusões abaixo.

- A concentração de nucleosídeos totais apresentou uma mediana de $33,18 \pm 22,58$ mg/l, independentemente do estágio da lactação.
- Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na concentração de nucleosídeos totais de acordo com a idade gestacional.
- Foi observada diferença estatisticamente significativa na concentração de nucleosídeos totais de acordo com o estágio da lactação. Os valores obtidos no colostro (28,93 mg/l) foram significativamente menores do que no leite de transição (36,81 mg/l) e no leite maduro (40,55 mg/l).
- Não foi detectada variação na concentração de nucleosídeos totais de acordo com a idade das nutrizes.

-
- Não foi verificada variação na concentração de nucleosídeos totais de acordo com o grau de nutrição das lactantes.
 - Não foi observada variação na concentração de nucleosídeos totais conforme a renda *per capita* das nutrizes.
 - Não foi encontrada variação na concentração de nucleosídeos totais entre as nutrizes fumantes e as não-fumantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quan R, Barness LA, Uauy R. Do infants need nucleotides supplemented formula for optimal nutrition? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 11: 429-37.
2. Carver JD, Walker WA. The role of nucleotides in human nutrition. *J Nutr Biochem* 1995; 6: 58-72.
3. Gil A, Uauy R. Dietary nucleotides and infant nutrition. *J Clin Nutr Gastroenterol* 1989; 4: 145-53.
4. Uauy R. Dietary nucleotides and requirements in early life. In: Lebenthal E, editor. *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy*. New York: Raven Press; 1989. p. 265-80.
5. Leleiko NS, Bronstein AD, Baliga S, Munro HN. De novo purine nucleotide synthesis in the rat small and large intestine: effect of dietary protein and purines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983; 2: 313-9.
6. Leleiko NS, Bronstein AD, Munro HN. Effect of dietary purines on de novo synthesis of purine nucleotides in the small intestinal mucosa [abstract]. *Pediatr Res* 1979; 13: 403.

-
7. Mackinnon AM, Deller DJ. Purine nucleotide biosynthesis in gastrointestinal mucosa. *Biochem Biophys Acta* 1973; 319: 1-4.
 8. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. Purines and pyrimidines. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 1989. p. 965-1126.
 9. Lehninger AL. *Principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers; 1982.
 10. McGilvery RW. Turnover of nucleotides. In: *Biochemistry: a functional approach*. Philadelphia: WB Saunders; 1983. p. 674-94.
 11. Barness LA. Dietary sources of nucleotides – From breast milk to weaning. *Symposium: Nucleotides and Nutrition*, 1994; 128S-30S.
 12. Sanguanserm Sri J, György P, Zilliken F. Polyamines in human and cow's milk. *Am J Clin Nutr* 1974; 27: 859-65.
 13. Rudolph FB. The biochemistry and physiology of nucleotides. *J Nutr* 1994; 124: 124S-7S.
 14. Quan R, Uauy R. Nucleotides and gastrointestinal development. *Sem Pediatr Gastr Nutr* 1991; 2: 3-11.
 15. Cory JG. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism. In: Devlin TM, editor. *Textbook of Biochemistry*. New York: Wiley-Liss; 1992. p. 529-71.
 16. Martin DW. Nucleotides. In: Martin DW, editor. *Harpers Review of Biochemistry*. Los Angeles: Lange Medical Publications; 1989. p. 323-30.

-
17. Martin DW. Metabolism of purine and pyrimidine nucleotides. In: Martin DW, editor. *Harpers Review of Biochemistry*. Los Angeles: Lange Medical Publications; 1989. p. 357-75.
 18. Henderson JF, Patterson ARP. *Nucleotide metabolism: an introduction*. New York: Academic Press; 1973.
 19. Munro HN. Differences in metabolic handling of orally versus parenterally administered nutrients. In: Green M, Greene HL, editors. *The role of the gastrointestinal tract in nutrient delivery*. New York: Academic Press; 1984. p. 183-96.
 20. Sonoda T, Tatibana M. Metabolic fate pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *Biochem Biophys Acta* 1978; 521: 55-66.
 21. Savaiano DA, Clifford AJ. Absorption, tissue incorporation and excretion of free-purine bases in rat. *Nutr Rep Int* 1978; 17: 551-6.
 22. Harms VH, Stirling CE. Transport of purine nucleotides and nucleosides by "in vitro" rabbit ileum. *Am J Physiol* 1977; 233: E47-E55.
 23. Van Buren CT, Kulkarni AD, Schandle VB, Rudolph FB. The influence of dietary nucleotides on cell-mediated immunity. *Transplantation* 1983; 36: 350-2.
 24. Iijima S, Tsujinaka T, Kido Y, Hayashida Y, Ishida H, Homma T, et al. Intravenous administration of nucleosides and a nucleotide mixture diminishes intestinal mucosal atrophy induced by total parenteral nutrition. *J*

-
- Parenter Enter Nutr 1993; 17: 265-70.
25. He Y, Chu SW, Walker WA. Nucleotide supplements alter proliferation and differentiation of cultured human (Caco-2) and rat (IEC-6) intestinal epithelial cells. *J Nutr* 1993; 123: 1017-27.
26. György P. The uniqueness of human milk. Biochemical aspects. *Am J Clin Nutr* 1971; 24: 970-5.
27. Uauy R, Quan R, Gil A. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. Symposium: Dietary nucleotides. American Institute of Nutrition, 1994; 1436S-41S.
28. Witte DP, Wiginton AD, Hutton JJ, Aronow BJ. Coordinate development regulation of purine catabolic enzyme expression in gastrointestinal and postimplantation reproductive tracts. *J Cell Biol* 1991; 115: 179-90.
29. Roux JM. Nucleotide supply of the developing animal: role of the so-called "salvage pathways". *Enzyme* 1973; 15: 361-77.
30. Ho CY, Miller KV, Savaiano DA, Crane RT, Ericson KA, Clifford AJ. Absorption and metabolism of orally administered purines in fed and fasted rats. *J Nutr* 1979; 109: 1377-82.
31. Leleiko NS, Martin BA, Walsh MJ, Kazlow P, Rabinowitz S, Sterling K. Tissue-specific gene expression results from a purine and pyrimidine-free diet and 6-mercaptopurine in the rat small intestine and colon. *Gastroenterology* 1987; 93: 1014-20.

-
32. Walsh MJ, Sánchez-Pozo A, Leleiko NS. A regulatory element is characterized by purine-mediated and cell-type-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4356-64.
 33. Walsh MJ, Tsao KL, Leleiko NS. Characterization of DNA-protein interactions within a distal regulatory element upstream of a mammalian housekeeping gene promoter. *J Biol Chem* 1992; 267: 7026-35.
 34. Leleiko NS, Walsh MJ. O papel da glutamina, ácidos graxos de cadeia curta e nucleotídeos na adaptação intestinal à doença gastrointestinal. In: Lebenthal E, editor. *Clin Ped Am N* 1996; 2: 439-56.
 35. Bounous G, Kongshavn PA. Influence of dietary proteins on the immune system of mice. *J Nutr* 1982; 112: 1747-55.
 36. Zoppi G, Mantovanelli F, Pittschieller K. Response to RIT 4237 oral rotavirus vaccine in human milk, adapted, and soy-formula fed infants. *Acta Paediatr Scand* 1989; 78: 759-62.
 37. Nauss KM, Mark DA, Suskind RM. The effect of vitamin A deficiency on the in vitro cellular response of rats. *J Nutr* 1979; 109: 1815-23.
 38. Haynes DC, Gershwin ME, Golub MS. Studies of marginal zinc deprivation in rhesus monkeys: influence on the immunohematology of infants in the first year. *Am J Clin Nutr* 1985; 42: 252-62.
 39. Spallholz JE, Boylan LM, Larsen HS. Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Ann NY Acad Sci* 1990; 587: 123-39.

-
40. Pabst HF, Spady DW. Effect of breast-feeding on antibody response to conjugate vaccine. *Lancet* 1990; 336: 269-70.
 41. Hahn-Zoric M, Fulconis F, Minoli I. Antibody responses to parenteral and oral vaccines are impaired by conventional and low protein formulas as compared to breast-feeding. *Acta Paediatr Scand* 1990; 79: 1137-42.
 42. Van Buren CT, Kim E, Kulkarni AD, Fanslow WC, Rudolph FB. Nucleotide-free diet and supression of immune response. *Transplantation Proceedings* 1987; 19(4 Suppl 5):57-9.
 43. Giblett ER, Anderson JE, Cohen F, Pollara B, Meuwissen HJ. Adenosine-deaminase deficiency in two pacients with severaly impaired cellular immunity. *Lancet* 1972; 2: 1067-70.
 44. Brunser O, Espinoza J, Araya M, Cruchet S, Gil A. Effect of dietary nucleotide supplementation on diarrhoeal disease in infants. *Acta Paediatr* 1994; 83: 188-91.
 45. Kulkarni AD, Fanslow WC, Rudolph FB, Van Buren CT. Effect of dietary nucleotides on response to bacterial infections. *J Parenter Enter Nutr* 1986; 10: 169-71.
 46. Kulkarni AD, Fanslow WC, Drath D, Rudolph FB, Van Buren CT. Influence of dietary nucleotide restriction on bacterial sepsis and phagocytic cell function in mice. *Arch Surg* 1986; 121: 169-72.

-
47. Fanslow WC, Kulkarni AD, Van Buren CT, Rudolph FB. Effect of nucleotide restriction and supplementation on resistance to experimental murine candidiasis. *J Parenter Enter Nutr* 1988; 12: 49-52.
 48. Carver JD, Cox WI, Barness LA. Dietary nucleosides effects upon murine natural killer activity and macrophage activation. *J Parenter Enter Nutr* 1990; 14: 18-22.
 49. Rudolph FB, Kulkarni AD, Schandle VB, Van Buren CT. Involvement of dietary nucleotides in T lymphocyte function. *Adv Exp Med Biol* 1984; 165: 175-8.
 50. Carver JD, Pimentel B, Cox WI, Barness LA. Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. *Pediatrics* 1991; 88: 359-63.
 51. Pizzini RP, Saroj Kumar BS, Kulkarni AD, Rudolph FB, Van Buren CT. Dietary nucleotides reverse malnutrition and starvation-induced immunosuppression. *Arch Surg* 1990; 125: 86-90.
 52. Van Buren CT. Role of dietary nucleotides in non-specific immune function. *AIN Symposium on Dietary Nucleotides. J Nutr (Suppl)*, 1994.
 53. Aguiar ER, Brandão MR, Boente PC. Podem os suplementos nutricionais específicos melhorar a eficácia da terapia anti-câncer? *Revista Brasileira de Nutrição Clínica* 1997; 12(2): 60-5.
 54. Pickering LK, Granoff DM, Erickson J, Masor ML, Hilty MD. Dietary modulation of the immune system by human milk (HM) and infant formula

-
- containing HM levels of nucleotides. *Pediatr Res* 1995; 37: 131A.
55. Wheeler JG, Steiner D. Evaluation of humoral responsiveness in children. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 304-310.
56. Buescher ES, Pickering LK. Polymorphonuclear leucocytes in human colostrum and milk. In: Howell RR, Morriss RH, Pickering LK, editors. *Human milk in infant nutrition and health*. Springfield; 1986.
57. Valdés V, Pérez-Sánchez A, Labbok M. Manejo clínico da lactação: assistência à nutriz e ao lactente. Revinter Ltda.; 1996. p. 29-40.
58. Braun OH. Effect of consumption of human milk and other formulas on intestinal bacterial flora in infants. In: Lebenthal E, editor. *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy*. New York: Raven Press; 1989. p. 247-53.
59. Gylleberg H, Carlberg C. The nutritional characteristics of the bifid bacteria (*Lactobacillus bifidus*) of infants. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1958; 44: 287-92.
60. Tanaka R, Mutai M. Improved medium for selective isolation and enumeration of bifido bacterium. *Appl Environ Microbiol* 1980; 40: 866-9.
61. Gil A, Corral E, Martinez A, Molina JA. Effects of dietary nucleotides on the microbial pattern of feces of at term newborn infants. *J Clin Nutr Gastroenterol* 1986; 1: 34-8.

-
62. Quan R. Dietary nucleotides: potential for immune enhancement. In: Paubert-Braquet M, Dupont CH, Paoletti R, editors. *Foods, nutrition and immunity*. Basel: S Karger; 1992. p. 13-21.
 63. Malo C, Menard D. Influence of epidermal growth factor on the development of the suckling mouse intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1982; 83: 28-35.
 64. Núñez MC, Ayudarte MV, Morales D, Suárez MD, Gil A. Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with experimental chronic diarrhea. *J Parenter Enter Nutr* 1990; 14: 598-604.
 65. Johnson LR. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *Physiol Rev* 1988; 68: 456-502.
 66. Uauy R, Stringel G, Thomas R, Quan R. Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 10: 497-503.
 67. Quan R, Gil A, Uauy R. Effect of dietary nucleosides on intestinal growth and maturation after injury from radiation [abstract]. *Pediatr Res* 1991; 29: 111A.
 68. Espinoza J, Araya M, Cruchet S, Pacheco I, Brunser O. Nucleotide-enriched milk and diarrheal disease in infants [abstract]. *Pediatr Res* 1992; 32: 739A.
 69. Ogoshi S, Iwasa M, Kitagawa S, Ohomory Y, Mizobuchi S, Iwasa Y, Tamiya T. Effects of total parenteral nutrition with nucleosides and nucleotide mixture on D-galactosamina-induced liver injury in rats. *J Parenter Enter Nutr* 1988;12:53-7.

-
70. Daly JM, Lieberman MD, Goldfine J. Enteral nutrition with supplemental arginine, RNA and omega-3 fatty acids in patients after operation: immunologic, metabolic and clinical outcome. *Surgery* 1992; 112: 56-67.
 71. McMillan JA, Oski FA, Lourie G, Tomarelli RM, Landaw SA. Iron absorption from human milk, simulated human milk and proprietary formulas. *Pediatrics* 1977; 60(6): 896-900.
 72. Cheney B, Finch CA. Effect of inosine on iron absorption in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960; 103: 37-8.
 73. Faelli A, Esposito G. Effect of inosine and its metabolites on intestinal iron absorption in the rat. *Biochem Pharmacol* 1970; 19: 2551-4.
 74. Zikakis JP, Dougherty TM, Biasotto NO. The presence and some properties of xanthine oxidase in human milk and colostrum. *J Food Sci* 1976; 41: 1408-9.
 75. Saarinen UM. Need for iron supplementation in infants on prolonged breast feeding. *J Pediatr* 1978; 93(2): 177-80.
 76. Gil A, Pita ML, Martínez A, Molina JA, Sánchez-Medina F. Effects of dietary nucleotides on the plasma fatty acids in at-term neonates. *Hum Nutr Clin Nutr* 1986; 40(3): 185-95.
 77. De Lucchi C, Pita ML, Faus MJ, Molina JA, Uauy R, Gil A. Effect of dietary nucleotides on the fatty acid composition of erythrocyte membrane lipids in term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1987; 6: 568-74.

-
78. Uauy R, Gil A. Fatty acid metabolism in the neonate: effect of age, diet and nucleotide. In: Proceedings of the III International Symposium on Infant Nutrition and Gastrointestinal Disease. Belgium: Brussels; 1985. p. 65-75.
 79. Sánchez-Pozo A, Pita ML, Martínez A, Molina JA, Sánchez-Medina F, Gil A. Effects of dietary nucleotides upon lipoprotein pattern of newborn infants. *Nutr Res* 1986; 6: 763-71.
 80. Gil A. Human milk nucleotides: influences on the lipid metabolism of newborn infants. Symposium S82: Human milk recent knowledge. XVII International Congress of Pediatrics. Manila; 1983.
 81. Durschlag RP, Robinson JL. Orotic acid-induced metabolic changes in the rat. *J Nutr* 1980; 110: 816-21.
 82. Roheim PS, Switzer S, Girard A, Eder HA. The mechanism of inhibition of lipoprotein synthesis by orotic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1961; 20: 416-21.
 83. Martínez A. Influencia de la adición de nucleótidos presentes en la leche humana a una fórmula láctea: repercusión sobre parámetros nutricionales y metabólicos en recién nacidos. [tesis]. Granada: Universidad de Granada; 1983.
 84. Gall G, Sturman JA, Raiha NCR. Development of mammalian sulfur metabolism: absence of cyathionase in human fetal tissues. *Pediatr Res* 1972; 6: 538-47.

-
85. Villarroel P, Jury G, Cassorla X, Saitúa MT. Adición de nucleótidos a una fórmula láctea adaptada: efecto sobre los niveles séricos de colesterol de las lipoproteínas en el recién nacido. *Rev Chil Nutr* 1987; 15(3): 179-84.
 86. Uauy R, Saitúa MT, Cassorla X, Duque C, Gil A. Fatty acid profile of RBC membrane phospholipids: effects of diet and postnatal age. *Pediatr Res* 1984; 18: 215A.
 87. Uauy R, Saitúa MT, Cassorla X, Gil A. Efectos de la dieta, nucleótidos y edad postnatal sobre la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana del recién nacido. *Advances en Nutrición de la Infancia*. Granada: Uniasa-Edda; 1985. p. 133-46.
 88. Sánchez-Pozo A, Morillas J, Moltó L, Robles R, Gil A. Dietary nucleotides influence lipoprotein metabolism in newborn infants. *Pediatr Res* 1994; 35(1): 112-6.
 89. Ramirez M, Hortelano P, Boza J, Jimenez J, Gil A, Pita ML. Effect of dietary nucleotides and orotate on the blood levels of prostacyclin and thromboxane in the weanling rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1991; 43: 49-54.
 90. Warshaw JB, Uauy R. Fatty acid metabolism during development. In: Ballabriga A, editor. *Advances in Infant Nutrition*. Granada: Uniasa-Edda; 1987.

-
91. Pita ML, Fernandez MR, De-Lucchi C, Medina A, Martínez-Valverde A, Uauy R, Gil A. Changes in fatty acids pattern of red blood cell phospholipids induced by type of milk, dietary nucleotide supplementation and postnatal age in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988; 7: 740-7.
 92. Crawford MA, Hassam AG, Williams G. Essential fatty acids and fetal brain growth. *Lancet* 1976; 28: 452-3.
 93. Sato N, Murakami Y, Nakamo T, Sugawara M, Kawakami H, Idota T, Nakajima I. Effects of dietary nucleotides on lipid metabolism and learning ability of rats. *Biosci Biotech Biochem* 1995; 59(7): 1267-71.
 94. Gasser T, Moyer JD, Handschumacher RE. Novel single-pass exchange of circulating uridine in rat liver. *Science* 1981; 213: 777-8.
 95. Ohyanagi H, Nishimatsu S, Kambara Y, Usami M, Saitoh Y. Effects of nucleosides and a nucleotide on DNA and RNA syntheses by the salvage and de novo pathway in primary monolayer cultures of hepatocytes and hepatoma cells. *J Parenter Enter Nutr* 1989; 13: 51-8.
 96. Skold O. Enzymes of uracil metabolism in tissues with different growth characteristics. *Biochem Biophys Acta* 1960; 44: 1-12.
 97. Ogoshi S, Iwasa M, Yonezawa T, Tamiya T. Effect of nucleotide and nucleoside mixture on rats given total parenteral nutrition after 70% hepatectomy. *J Parenter Enter Nutr* 1985; 9: 339-42.

-
98. Jin MB, Oka T. Influence of nucleoside-nucleotide mixture infusion on hepatic energy metabolism of 70% hepatectomized rabbits in a postoperative phase. *J Parenter Enter Nutr* 1994; 18: 24S.
 99. Novak DA, Carver JD, Barness LA. Dietary nucleotides affect hepatic growth and composition in the weanling mouse. *J Parenter Enter Nutr* 1994; 18: 62-6.
 100. Benson JD, Masor ML. Infant formula development: past, present and future. *Endocrin Regul* 1994; 28: 9-16.
 101. Dewey KG, Heinig J, Nommsen-Rivers LA. Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants. *J Pediatr* 1995; 126: 696-702.
 102. Greer FR. Formulas for the healthy term infant. *Pediatr Rev* 1995; 16: 107-12.
 103. Kobata A, Ziro S, Kida M. The acid-soluble nucleotides of milk. I. Quantitative and qualitative differences of nucleotide constituents in human and cow's milk. *J Biochem* 1962; 51: 277-87.
 104. Deutsch A, Nilsson R. The acid-soluble nucleotides of human milk. *J Physiol Chem* 1960; 321: 246-51.
 105. Johke T. Acid-soluble nucleotides of colostrum, milk and mammary gland. *J Biochem* 1963; 54: 388-97.
 106. Kobata A. The acid-soluble nucleotides of human milk. *J Biochem* 1963; 53: 167-75.
 107. Gil A, Sánchez-Medina F. Acid-soluble nucleotides of cow's, goat's and sheep's milk at different states of lactation. *J Dairy Res* 1981; 48: 35-44.

-
108. Schlimme E, Raezke KP, Ott FG. Ribonucleosides as minor milk constituents. *Z Ernährungswisse* 1991; 30: 138-52.
 109. Deutsch A, Mattsson S. Acid-soluble nucleotides in cow's milk and colostrum. *Milk and dairy research*. Sweden: Alnarp; 1960.
 110. Denamur R, Fauconneau G, Guntz G. Les nucléotides acido-solubles des laits de brebis, vache, chèvre et truie. *Revista Española de Fisiologia* 1959; 15: 301-10.
 111. Leach JL, Baxter JH, Molitor BE, Ramstack MB, Masor ML. Total potentially available nucleosides of human milk by stage of lactation. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 1224-30.
 112. Sugawara M, Sato N, Nakano T, Idota T, Nakajima I. Profile of nucleotides and nucleosides of human milk. *J Nutr Sci Vitaminol* 1995; 41: 409-18.
 113. Gil A, Sánchez-Medina F. Acid-soluble nucleotides of human milk at different stages of lactation. *J Dairy Res* 1982; 49: 301-7.
 114. Janas LM, Picciano MF. The nucleotide profile of human milk. *Pediatr Res* 1982; 16: 659-62.
 115. Hurlbert RB, Schmitz H, Brumm AF, Potter VR. Nucleotide metabolism. Chromatographic separation of acid-soluble nucleotides. *Biol Chem* 1954; 209: 23-39.
 116. Kobata A. The acid-soluble nucleotides of milk. II. Isolation and identification of two novel uridine nucleotide oligosaccharide conjugates from

-
- human milk and colostrum. *Biochemistry* 1963; 53: 167-75.
117. Skala JP, Koldvsky O, Hahn P. Cyclic nucleotides in breast milk. *Am J Clin Nutr* 1981; 34: 343-50.
118. Brown PR. Stability of nucleotide solutions on storage as determined by high pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 1971; 43: 305-6.
119. Ho FCS, Wong RLC, Lawton JWM. Human colostrum and breast milk cells: a light and electron microscopic study. *Acta Paediatr Scand* 1979; 68: 389-96.
120. Quinty RH, Lien EL, Marraffa LA, Kuhlman CF. Nucleotide monophosphate levels in human milk [abstract]. *The FASEB Journal*. Anaheim, California, 1992; 6(4): A1115.
121. Thorell L, Sjöberg LB, Hernell O. Nucleotides in human milk: sources and metabolism by the newborn infant. *Pediatr Res* 1996; 40: 845-52.
122. Scott ML. *Nutrition of humans and selected animal species*. New York: John Wiley & Sons; 1986.
123. Riordan J. The biological specificity of breast milk. In: Riordan J, Auerbach KG. *Breast-feeding and human lactation*. Jones and Bartlett Publishers, Boston; 1989. p. 105-6.
124. Humenick SS. The clinical significance of breast milk maturation rates. *Birth* 1987; 14(4): 174-81.
125. Hartmann P. Lactation and reproduction in western australian women. *J Repro Med* 1987; 32(7): 543-7.

-
126. Lawrence RA. Biochemistry of human milk. In: Breast-feeding – a guide for the medical profession. St. Louis; 1985. p. 65-116.
 127. Casey CE, Hambidge KM. Nutritional aspects of human lactation. In: Neville MC, Neifert MR, editors. Lactation, physiology, nutrition and breast feeding. New York: Plenum Press; 1983. p. 199-201.
 128. UNICEF, OMS. Manejo e promoção do aleitamento materno num hospital amigo da criança; 1993. p. 14-21.
 129. King SF. Como ajudar as mães a amamentar. Ministério da Saúde, Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno. Brasília; 1994. p. 24-35.
 130. Norman GR, Streiner DL. More than two groups. In: Norman GR, Streiner DL, editors. Biostatistics – The Bare Essentials. London: Mosby; 1994. p. 64-72.
 131. Capurro H, Konichewzky S, Fonseca D. Simplified method for diagnosis of gestacional age in the newborn infant. *J Pediatr* 1979; 93: 120-2.
 132. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Ellers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991; 119: 417-23.
 133. World Health Organization, Expert Committee on Maternal and Child Health. Public health aspects of low birth weight. Geneva: WHO Tech Rep Ser; 1961; 217: 1.

-
134. Ministério da Saúde (Brasil). Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. Pesquisa nacional sobre saúde e nutrição; condições nutricionais da população brasileira. Brasília: Ministério da Saúde; 1991.
 135. McAnarney ER, Stevens-Simon C. First, do not harm (low birth weight and adolescent obesity). *Am J Dis Child* 1993; 147: 983-5.
 136. Dawes MG, Grudzinskas JG. Patterns of maternal weight gain in pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1991; 98: 195-201.
 137. Williams SR. Guia nutricional no pré-natal. In: Worthington BS, Vermeersch J, Williams SR, editors. *Nutrição na gravidez e na lactação*; 1980. p. 46-74.
 138. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 1991 - Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro: Fundação IBGE; 1991.
 139. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Questionário do censo demográfico; décimo recenseamento geral do Brasil 1990. Rio de Janeiro: Fundação IBGE; 1990.
 140. Silva RMR, Saboia AL, Cervini RA. Crianças e adolescentes: indicadores sociais. Rio de Janeiro: Fundação IBGE; 1991.
 141. Perret D, Bhusate L, Patel J, Herbert K. Comparative performance of ion exchange and ion-paired reversed phase high performance liquid chromatography for the determination of nucleotides in biological samples. *Biomed Chromatogr* 1990; 5: 207-11.

-
142. SPSS. Base system syntax reference guide. Release 6.0. Chicago: SPSS; 1993.
 143. Tukey JW. Schematic summaries. In: Tukey JW. Exploratory data analysis. Addison-Wesley Publishing Company; 1977. p. 39-42.
 144. Campbell MJ, Machin, D. Data description. In: Campbell MJ, Machin D, editors. Medical Statistics – a Commonsense Approach. London: Champman and Hall; 1994. p. 45-60.
 145. Norman GR, Streiner DL. Elements of statistical inference. In: Norman GR, Streiner DL, editors. Biostatistics – The Bare Essentials. London: Mosby; 1994. p. 48-9.

ANEXOS

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Estamos realizando um trabalho de avaliação da concentração de nucleosídeos totais no leite humano e gostaríamos de contar com sua colaboração.

Nucleosídeos são compostos intracelulares, presentes no leite humano, e que desempenham importantes papéis em funções fisiológicas e biológicas. Entre os potenciais benefícios desses compostos para a nutrição infantil, podemos destacar: melhora na recuperação da injúria intestinal e da função hepática após dano, aceleração do desenvolvimento normal do trato gastrointestinal e da função imunológica, aumento da resistência do hospedeiro em pacientes imunodeprimidos.

O leite humano tem sido reconhecido como o alimento ideal e a melhor fonte de nucleosídeos e nucleotídeos para o lactente, tanto sob o aspecto nutricional quanto imunológico, sendo que ainda não foi possível fazer uma fórmula artificial idêntica a ele. À medida que pesquisas demonstram diferenças bioquímicas entre o leite humano e o de outras espécies animais, modificações nas fórmulas infantis começam a ser consideradas.

Tendo em vista a importância dos nucleosídeos e nucleotídeos para vários processos bioquímicos e biológicos e considerando que o leite humano é a melhor fonte desses compostos para a criança pequena, surgiu a motivação da autora em realizar este Projeto de Pesquisa, com o propósito de verificar a concentração de nucleosídeos totais no leite humano e sua variação com a idade gestacional e o estágio da lactação.

Gostaríamos de contar com sua colaboração no sentido de autorizar a coleta de uma pequena quantidade de leite (10 ml) que, sem dúvida, não fará falta a seu filho, mas que poderá proporcionar um maior conhecimento a respeito das qualidades do leite humano. Cabe salientar que cada mãe coletará no máximo 3 amostras de leite, uma em cada estágio da lactação: colostro, leite de transição e leite maduro.

Eu,, fui informada dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre os procedimentos previstos, tanto quanto sobre os benefícios esperados. As minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que novas informações, obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa se assim o quiser.

Assinatura da nutriz:

Assinatura do investigador:

Assinatura do orientador:

ANEXO 2 - PROTOCOLO DO PROJETO DE PESQUISA

Concentração de nucleosídeos totais no leite humano e avaliação de sua variação com a idade gestacional e o estágio da lactação:

Número: Registro (Prontuário):
 Mãe internada: Leito:
 RN internado: Leito:
 Data: Nome:
 Idade: Cor: Paridade:
 Idade Gestacional Obstétrica: Pediátrica:
 Tipo de parto: Dias pós-parto:
 Data do parto:
 Fumo: Nº de cigarros/dia: Tempo:
 Álcool: Tempo: Tipo: Quantidade:
 Drogas: Tempo de uso: Tipo: Frequência:
 Endereço:
 Transporte ao hospital no dia da coleta:
 Última refeição antes da coleta:
 Horário da última refeição:
 Grau de nutrição:
 Baixo peso
 Normal IMC =
 Sobrepeso
 Obesidade
 Peso no início da gestação: Altura:
 Ganho ponderal na gestação:
 Nível sócio-econômico:
 Renda: menos de 0,25 SM (salário mínimo)
 de 0,25 SM a menos de 0,5 SM
 de 0,5 SM a menos de 2,2 SMs
 superior ou igual a 2,2 SMs
 Escolaridade (último ano escolar com aprovação):
 1ª série () 2ª série () 3ª série () 4ª série ()
 5ª série () 6ª série () 7ª série () 8ª série ()
 2º ciclo () superior () nenhum ()

Abastecimento de água:

Com canalização interna:

 Rede geral Poça ou nascente Outra forma

Sem canalização interna:

 Rede geral Poça ou nascente Outra forma

Destino do lixo:

Coletado: Diretamente Indiretamente QueimadoJogado: Enterrado Terreno baldio Outro

Escoadouro (esgoto):

rede geral fossa séptica fossa rudimentar vala negra outro não sabe não tem

Horário da coleta:

Pasteurizado Não pasteurizado Congelamento: - 4°C - 20°C

ANEXO 3

Número da amostra	Grupo*	Idade gestacional	Estágio da lactação	Número da coleta	Idade	Cor	Paridade	Tipo de parto	Fumo	Número de cigarros	Tempo de fumo em anos	Álcool	Drogas	Procedência	Grau de nutrição
1	1	36	5	1	37	1	3	2	2	999	999	2	2	3	2
2	2	32	13	1	24	2	2	2	2	999	999	2	2	2	2
3	2	31	7	1	29	1	4	2	2	999	999	2	2	1	2
4	2	31	10	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
5	3	31	38	3	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
6	2	35	8	1	26	1	2	2	2	999	999	2	2	1	1
7	3	35	32	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
8	5	41	10	1	28	2	1	1	2	999	999	2	2	1	2
9	6	41	16	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
10	1	33	3	1	22	1	1	1	2	999	999	2	2	2	2
11	3	33	15	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
12	1	35	2	1	21	2	1	1	2	999	999	2	2	2	2
13	1	33	3	1	20	1	1	2	1	2	4	2	2	1	1
14	2	33	6	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
15	1	32	1	1	14	3	1	1	2	999	999	2	2	1	1
16	2	32	6	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
17	6	40	16	1	18	2	2	1	2	999	999	2	2	1	3
18	4	37	3	1	24	1	1	1	1	10	9	2	2	2	1
19	1	31	2	1	23	1	4	1	2	999	999	2	2	2	2
20	2	31	11	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
21	4	40	2	1	21	3	1	2	2	999	999	2	2	1	1
22	4	37	2	1	33	1	6	2	2	999	999	2	2	1	3
23	5	37	7	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
24	1	33	4	1	37	1	2	2	2	999	999	2	2	1	2
25	3	33	9	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
26	3	33	17	3	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
27	4	41	3	1	19	1	1	1	1	15	5	2	2	1	2
28	5	41	6	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
29	2	31	6	1	26	1	2	2	2	999	999	2	2	1	2
30	4	40	4	1	16	3	2	2	2	999	999	2	2	1	2
31	5	41	6	1	24	1	2	1	2	999	999	2	2	2	2
32	4	38	3	1	21	1	1	2	2	999	999	2	2	1	2
33	2	36	6	1	28	1	2	2	2	999	999	2	2	1	3
34	4	40	5	1	38	1	4	1	2	999	999	2	2	2	3
35	1	32	5	1	29	1	4	2	2	999	999	2	2	2	2
36	3	32	15	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
37	5	40	6	1	19	1	1	2	2	999	999	2	2	1	2
38	4	41	3	1	19	1	3	1	2	999	999	2	2	2	3
39	2	33	13	1	42	1	3	2	2	999	999	2	2	2	2

* 1 = PMT/coloostro 4 = AT/coloostro
2 = PMT/leite de transição 5 = AT/leite de transição
3 = PMT/leite maduro 6 = AT/leite maduro

Número da amostra	Índice de massa corporal	Peso inicial	Altura	Ganho ponderal na gestação	Renda	Escolaridade	Água	Lixo	Esgoto	Nucleosídeos	Nucleotídeos	Ácido ribonucléico	Aductos
1	23,20	55,000	1,54	19,000	2	4	4	3	7	6,68	42,58	0,00	5,99
2	24,79	58,000	1,53	6,000	4	5	1	1	1	7,88	23,31	3,58	9,63
3	20,42	59,000	1,70	15,000	4	10	1	1	1	2,93	13,83	0,20	1,46
4	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	3,22	23,46	0,05	4,54
5	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	2,81	28,16	0,00	3,15
6	19,47	51,000	1,62	15,000	4	11	1	1	1	8,19	92,50	19,82	4,98
7	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	5,26	45,40	3,71	9,15
8	20,34	47,000	1,52	12,000	4	10	1	1	1	4,43	24,66	5,48	0,52
9	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	3,12	25,70	7,06	0,10
10	21,25	51,000	1,55	10,000	4	5	1	1	1	4,35	21,37	5,15	0,00
11	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	2,44	18,97	2,93	1,51
12	22,06	60,000	1,65	10,000	4	10	1	1	2	6,62	13,31	8,09	4,62
13	18,97	48,000	1,59	8,000	4	10	1	1	1	5,08	17,11	5,55	0,00
14	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	6,75	69,25	28,67	0,00
15	19,75	55,700	1,68	6,300	3	4	4	1	4	8,06	19,58	0,00	17,87
16	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	2,46	16,87	0,00	13,59
17	25,28	68,000	1,64	7,000	4	8	1	1	1	6,05	18,39	0,34	0,00
18	19,33	52,000	1,64	13,000	4	6	1	1	1	3,63	6,01	8,81	0,00
19	21,20	53,000	1,58	7,000	4	4	1	1	1	3,66	8,66	0,00	9,49
20	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	6,62	21,00	4,61	0,00
21	19,85	52,000	1,62	8,800	4	10	1	1	1	6,98	18,26	3,79	3,87
22	25,37	69,000	1,65	11,900	4	10	1	1	1	7,26	3,29	3,67	0,00
23	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	3,40	19,95	3,66	0,00
24	20,26	62,000	1,75	13,000	4	12	1	1	1	3,27	6,13	2,60	5,33
25	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	3,09	17,42	2,60	13,31
26	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	1,73	17,85	0,87	2,07
27	24,81	65,000	1,62	18,000	4	10	1	1	1	5,07	41,02	0,85	0,00
28	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	7,35	40,44	2,50	5,50
29	21,95	54,000	1,57	14,000	3	8	1	1	1	4,67	26,50	7,94	0,94
30	23,83	61,000	1,60	11,000	3	5	1	1	1	1,90	11,33	2,20	5,10
31	21,99	62,000	1,68	12,000	4	10	1	1	1	4,01	17,51	0,00	0,00
32	24,44	65,000	1,63	15,000	1	8	1	1	1	3,92	10,29	0,00	0,00
33	29,11	62,000	1,46	12,700	3	8	1	1	1	5,38	20,64	0,00	0,00
34	25,19	66,000	1,62	14,000	3	10	1	1	1	5,75	23,68	0,00	0,13
35	24,05	57,000	1,54	12,000	3	9	1	1	2	2,86	14,43	0,00	1,00
36	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	4,34	19,45	0,00	0,00
37	24,61	63,000	1,60	9,000	3	4	1	1	1	2,77	7,18	0,00	11,22
38	27,10	71,000	1,62	13,200	4	10	1	1	1	3,17	14,98	1,89	0,87
39	21,92	64,000	1,71	17,000	3	5	1	1	1	2,86	32,19	1,46	2,10

Número da amostra	Grupo*	Idade gestacional	Estágio da lactação	Número da coleta	Idade	Cor	Paridade	Tipo de parto	Fumo	Número de cigarros	Tempo de fumo em anos	Álcool	Drogas	Procedência	Grau de nutrição
40	3	33	18	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
41	1	36	3	1	24	1	2	2	1	10	4	2	2	1	2
42	4	40	3	1	26	1	2	1	2	999	999	2	2	1	2
43	4	41	4	1	36	1	1	1	2	999	999	2	2	1	2
44	5	41	6	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
45	4	38	5	1	35	1	4	2	2	999	999	2	2	2	4
46	1	34	3	1	17	2	1	1	2	999	999	2	2	1	3
47	2	34	11	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
48	3	34	15	3	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
49	4	39	5	1	27	1	2	2	2	999	999	2	2	3	1
50	1	34	2	1	36	1	4	2	1	10	18	2	2	1	3
51	5	40	7	1	33	2	3	2	2	999	999	2	2	1	3
52	6	40	15	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
53	4	40	3	1	22	1	2	1	2	999	999	2	2	1	1
54	1	33	3	1	25	1	1	1	2	999	999	2	2	1	2
55	4	41	2	1	32	2	2	2	2	999	999	2	2	1	3
56	5	40	9	1	21	1	1	1	2	999	999	2	2	3	2
57	1	34	2	1	32	1	3	2	2	999	999	2	2	2	2
58	3	34	20	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
59	4	41	5	1	24	1	6	1	1	5	6	2	2	2	4
60	1	34	3	1	25	1	2	2	2	999	999	2	2	3	3
61	1	32	4	1	30	1	2	1	2	999	999	2	2	1	2
62	3	32	19	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
63	1	30	3	1	18	1	2	1	2	999	999	2	2	2	2
64	4	37	3	1	25	1	1	1	1	6	6	2	2	1	3
65	1	36	3	1	29	1	1	1	2	999	999	2	2	3	2
66	4	39	4	1	23	1	1	1	2	999	999	2	2	1	2
67	5	39	12	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
68	6	39	23	3	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
69	2	33	14	1	39	1	1	2	2	999	999	2	2	3	2
70	3	33	22	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
71	4	38	1	1	37	2	4	1	1	20	15	2	2	1	3
72	2	34	6	1	29	1	3	2	2	999	999	2	2	2	2
73	5	39	6	1	26	1	2	2	2	999	999	2	2	2	3
74	4	40	4	1	28	1	4	1	1	12	16	2	2	1	2
75	4	41	5	1	30	1	2	1	2	999	999	2	2	2	3
76	1	35	4	1	31	1	2	2	2	999	999	2	2	1	2
77	2	35	11	2					999	999	999	999	999	999	999
78	4	38	3	1	29	1	3	1	2	999	999	2	2	1	2
79	1	30	4	1	16	1	1	2	2	999	999	2	2	1	2
80	1	33	5	1	30	1	3	1	1	20	10	2	2	1	2

* 1 = PMT/coloostro 4 = AT/coloostro
2 = PMT/leite de transição 5 = AT/leite de transição
3 = PMT/leite maduro 6 = AT/leite maduro

Número da amostra	Índice de massa corporal	Peso inicial	Altura	Ganho ponderal na gestação	Renda	Escolaridade	Água	Lixo	Esgoto	Nucleosídeos	Nucleotídeos	Ácido ribonucleico	Aductos
40	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	2,87	30,94	0,22	0,76
41	20,23	53,000	1,62	15,000	3	5	1	1	1	6,42	78,11	0,65	14,77
42	21,86	61,000	1,67	12,800	4	9	1	1	1	1,88	14,79	2,25	0,85
43	20,21	57,000	1,68	15,000	4	10	1	1	1	5,90	22,49	0,00	0,97
44	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	3,85	29,81	7,92	0,00
45	35,80	101,000	1,68	18,000	4	8	1	1	1	10,40	32,41	13,05	0,00
46	25,82	79,000	1,75	3,000	2	5	1	1	1	5,41	12,65	0,00	8,97
47	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	3,21	45,19	4,51	0,00
48	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	3,16	36,77	14,91	0,00
49	19,38	53,500	1,66	19,100	4	5	1	1	1	2,25	15,71	3,07	7,90
50	26,56	68,000	1,60	6,000	3	10	1	1	1	2,63	9,07	0,01	2,71
51	25,64	66,400	1,61	7,700	3	4	1	1	1	3,49	17,28	0,78	0,00
52	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	1,99	18,03	0,00	6,16
53	17,97	46,000	1,60	7,000	3	13	1	1	1	4,18	16,27	11,16	0,00
54	22,14	58,000	1,62	7,500	3	8	1	1	1	12,53	42,16	2,57	0,00
55	27,86	73,000	1,62	7,000	3	12	1	1	1	6,84	15,27	1,34	7,70
56	20,80	52,000	1,58	14,000	3	8	1	1	1	4,26	9,18	2,21	2,92
57	23,60	59,000	1,58	9,600	3	10	1	1	1	4,96	15,26	0,00	0,77
58	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	2,77	21,89	0,00	0,00
59	33,75	80,000	1,54	15,000	3	5	1	1	1	2,34	12,05	2,50	0,00
60	27,78	65,000	1,53	6,000	3	5	1	1	1	4,96	29,41	0,00	3,35
61	20,83	50,000	1,55	8,000	3	8	1	1	1	4,22	11,36	1,04	1,25
62	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	3,91	28,84	14,79	0,00
63	21,34	54,000	1,59	5,000	3	5	1	1	1	3,27	9,64	7,45	0,00
64	26,00	65,000	1,58	17,000	3	8	1	1	1	6,22	17,46	11,67	0,00
65	22,66	58,000	1,60	10,000	3	8	1	1	1	3,28	11,35	2,83	0,00
66	20,46	53,000	1,61	15,000	4	10	1	1	1	12,55	21,38	21,90	0,00
67	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	3,54	34,03	0,89	0,00
68	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	22,67	24,90	2,63	9,79
69	20,30	54,000	1,63	8,000	4	12	1	1	1	3,21	31,23	3,37	0,00
70	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	1,15	29,51	0,00	14,88
71	25,69	65,000	1,59	13,000	3	5	1	1	1	11,35	13,89	3,74	2,83
72	23,55	61,000	1,61	28,000	4	10	1	1	1	3,05	15,28	7,00	3,20
73	29,17	70,000	1,55	20,000	4	8	1	1	1	6,64	26,80	4,46	3,62
74	23,40	66,000	1,68	16,500	3	8	1	1	1	1,12	33,25	5,79	3,72
75	25,00	69,000	1,66	16,000	3	6	1	1	1	0,97	12,07	4,48	0,13
76	23,68	54,000	1,51	10,500	4	12	1	1	1	3,01	32,55	10,57	0,00
77	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	6,42	19,08	5,84	6,07
78	22,92	55,000	1,55	8,500	4	8	1	1	1	2,23	10,26	2,37	1,80
79	20,45	55,000	1,64	5,000	3	4	1	1	1	12,89	8,33	0,00	7,71
80	21,43	57,000	1,63	8,000	4	10	1	1	1	11,35	12,72	4,33	0,00

Número da amostra	Grupo*	Idade gestacional	Estágio da lactação	Número da coleta	Idade	Cor	Paridade	Tipo de parto	Fumo	Número de cigarros	Tempo de fumo em anos	Álcool	Drogas	Procedência	Grau de nutrição
81	3	33	16	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
82	5	37	6	1	39	1	1	2	2	999	999	2	2	1	3
83	6	37	15	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
84	1	33	2	1	19	1	2	1	1	10	6	2	2	1	1
85	4	39	3	1	29	3	3	2	2	999	999	2	2	1	3
86	2	35	10	1	33	1	2	1	2	999	999	2	2	3	2
87	1	32	5	1	39	3	3	2	2	999	999	2	2	2	3
88	3	32	19	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
89	3	33	25	1	27	1	5	1	1	4	2	2	2	3	1
90	6	40	19	1	17	1	1	2	2	999	999	2	2	3	2
91	1	36	4	1	16	2	1	1	2	999	999	2	2	2	3
92	2	33	7	1	22	1	1	2	2	999	999	2	2	2	2
93	3	33	15	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
94	2	35	7	1	17	1	1	1	1	4	3	2	2	1	2
95	2	31	6	1	25	1	1	2	2	999	999	2	2	1	2
96	3	31	26	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
97	1	32	4	1	17	1	1	2	2	999	999	2	2	3	2
98	5	37	9	1	18	1	1	2	2	999	999	2	2	2	2
99	2	31	9	1	24	1	3	2	2	999	999	2	2	2	3
100	2	34	6	1	21	3	3	1	2	999	999	2	2	1	2
101	3	35	17	1	31	1	2	2	2	999	999	2	2	3	2
102	6	41	27	1	17	1	1	1	2	999	999	2	2	2	1
103	2	34	11	1	40	1	6	1	2	999	999	2	2	1	3
104	2	31	12	1	20	1	2	2	2	999	999	2	2	3	2
105	5	37	6	1	37	1	4	1	2	999	999	2	2	1	2
106	4	40	3	1	16	1	1	1	2	999	999	2	2	1	2
107	2	33	10	1	20	2	2	1	2	999	999	2	2	1	1
108	1	32	3	1	16	1	1	2	1	20	2	2	2	2	2
109	3	34	16	1	28	1	6	2	2	999	999	2	2	1	3
110	3	33	30	1	18	1	1	2	2	999	999	2	2	3	2
111	4	40	4	1	31	1	1	1	2	999	999	2	2	1	4
112	5	40	8	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
113	2	33	11	1	36	1	2	2	2	999	999	2	2	1	3
114	2	34	6	1	20	1	2	1	2	999	999	2	2	1	2
115	3	35	23	1	15	3	1	1	2	999	999	2	2	1	2
116	6	38	19	1	32	1	5	2	1	5	15	2	2	1	2
117	1	34	5	1	32	1	6	2	2	999	999	2	2	1	2
118	6	40	15	1	17	1	1	1	2	999	999	2	2	3	2
119	2	34	12	1	19	1	1	2	2	999	999	2	2	1	2
120	2	36	8	1	14	1	1	1	2	999	999	2	2	1	1
121	1	33	3	1	18	1	1	1	1	20	4	2	2	2	2

* 1 = PMT/coloostro 4 = AT/coloostro
2 = PMT/leite de transição 5 = AT/leite de transição
3 = PMT/leite maduro 6 = AT/leite maduro

Número da amostra	Índice de massa corporal	Peso inicial	Altura	Ganho ponderal na gestação	Renda	Escolaridade	Água	Lixo	Esgoto	Nucleosídeos	Nucleotídeos	Ácido ribonucléico	Aductos
81	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	4,60	21,96	4,99	6,98
82	29,32	69,500	1,54	10,500	3	6	1	1	1	25,72	56,55	3,00	18,81
83	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	7,07	27,42	0,00	12,08
84	19,42	46,600	1,55	4,700	3	5	1	1	1	14,54	8,52	1,07	1,57
85	25,28	68,000	1,64	7,000	4	6	1	1	1	15,38	3,08	4,06	0,00
86	23,83	61,000	1,60	12,000	3	6	1	1	1	26,74	49,52	5,84	19,63
87	28,81	70,000	1,56	9,000	3	5	1	1	1	10,80	15,42	2,22	0,00
88	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	1,48	19,49	7,26	14,57
89	18,97	48,000	1,59	10,700	4	5	1	1	1	11,80	12,21	0,00	7,75
90	24,51	62,000	1,59	15,000	3	8	1	1	1	11,26	23,20	4,89	8,49
91	25,60	64,000	1,58	10,600	3	3	1	1	1	26,46	9,27	6,51	0,00
92	21,48	55,000	1,60	10,000	3	8	1	1	1	10,85	14,11	8,22	0,00
93	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	6,49	13,79	6,50	1,43
94	24,22	62,000	1,60	10,000	3	8	1	1	1	16,42	5,94	6,71	0,12
95	21,96	65,000	1,72	15,000	4	12	1	1	1	17,07	19,30	4,44	3,66
96	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	12,13	16,26	7,37	5,64
97	20,31	52,000	1,60	8,000	3	8	1	1	1	14,94	14,63	0,00	0,00
98	21,97	63,500	1,70	9,500	3	5	1	1	1	14,08	37,86	14,24	15,48
99	28,20	75,000	1,63	17,000	4	7	1	1	1	14,51	47,54	3,08	33,64
100	20,29	56,000	1,66	8,000	3	4	1	1	1	8,17	6,26	0,00	5,49
101	24,80	63,500	1,60	5,500	4	10	1	1	1	7,43	7,49	0,52	0,93
102	16,85	47,000	1,67	6,000	4	10	1	1	1	8,94	25,33	0,26	18,57
103	26,67	60,000	1,50	6,900	3	5	1	1	1	8,24	7,09	5,86	4,00
104	20,42	49,000	1,55	7,000	3	5	1	1	1	10,49	10,75	7,26	5,70
105	24,90	63,000	1,59	11,000	3	8	1	1	1	9,87	5,43	4,28	0,00
106	22,33	58,500	1,62	12,500	3	4	1	1	1	16,01	5,77	0,00	6,64
107	19,85	52,000	1,62	7,500	3	8	1	1	1	21,24	16,23	12,87	9,54
108	22,52	59,000	1,62	11,000	3	6	1	1	1	14,63	6,99	6,99	0,00
109	27,23	58,000	1,46	6,000	3	4	1	1	1	10,79	20,52	0,00	17,35
110	20,07	56,000	1,67	5,000	3	8	1	1	1	6,33	16,59	2,85	14,78
111	32,05	83,000	1,61	18,000	4	8	1	1	1	23,16	38,82	10,83	0,01
112	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	18,31	58,80	9,11	16,36
113	27,21	74,000	1,65	6,000	4	5	1	1	1	2,39	32,30	5,87	11,80
114	24,44	65,000	1,63	6,000	4	10	1	1	1	10,71	8,03	2,52	13,57
115	22,90	60,000	1,62	6,000	3	5	1	1	1	7,83	12,51	5,29	4,58
116	23,53	64,000	1,65	10,000	3	10	1	1	1	5,67	14,05	0,33	9,35
117	20,78	48,000	1,52	7,000	3	5	1	1	1	2,42	10,36	6,98	2,13
118	20,45	55,000	1,64	18,000	3	8	1	1	1	1,14	15,90	1,89	8,76
119	20,88	56,800	1,65	6,600	4	10	1	1	1	2,04	72,13	9,82	28,76
120	19,37	49,000	1,59	8,000	1	6	1	1	1	2,72	22,30	0,00	12,63
121	21,28	60,000	1,68	12,000	3	5	1	1	1	1,33	43,10	3,64	11,23

Número da amostra	Grupo*	Idade gestacional	Estágio da lactação	Número da coleta	Idade	Cor	Paridade	Tipo de parto	Fumo	Número de cigarros	Tempo de fumo em anos	Álcool	Drogas	Procedência	Grau de nutrição
122	2	34	6	1	41	1	2	1	2	999	999	2	2	1	3
123	6	40	23	1	36	1	5	1	2	999	999	2	2	2	2
124	4	41	5	1	20	1	1	1	2	999	999	2	2	1	4
125	2	36	12	1	15	3	1	1	2	999	999	2	2	2	2
126	6	40	17	1	20	1	1	1	2	999	999	2	2	2	1
127	3	35	18	1	23	1	2	1	1	2	8	2	2	2	2
128	2	35	8	1	16	1	1	1	2	999	999	2	2	2	2
129	5	39	10	1	20	2	1	1	2	999	999	2	2	2	2
130	6	40	25	1	27	1	2	1	2	999	999	2	2	3	2
131	5	41	9	1	26	1	1	2	2	999	999	2	2	1	2
132	1	31	3	1	27	1	2	1	2	999	999	2	2	3	1
133	2	35	8	1	14	3	1	2	2	999	999	2	2	1	2
134	3	35	16	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
135	5	38	13	1	29	1	4	1	2	999	999	2	2	1	3
136	1	34	5	1	22	1	1	2	2	999	999	2	2	3	1
137	6	39	15	1	18	1	1	1	2	999	999	2	2	1	2
138	3	35	17	1	22	1	1	2	1	10	9	2	2	1	2
139	6	41	30	1	26	1	1	2	2	999	999	2	2	1	2
140	3	30	15	1	21	1	2	1	1	10	3	2	2	1	1
141	3	34	16	1	24	1	4	1	1	20	5	2	2	1	2

* 1 = PMT/colostró 4 = AT/colostró
2 = PMT/leite de transição 5 = AT/leite de transição
3 = PMT/leite maduro 6 = AT/leite maduro

Número da amostra	Índice de massa corporal	Peso inicial	Altura	Ganho ponderal na gestação	Renda	Escolaridade	Água	Lixo	Esgoto	Nucleosídeos	Nucleotídeos	Ácido ribonucleico	Aductos
122	26,85	58,000	1,47	11,000	3	10	1	1	1	0,00	35,68	11,36	0,00
123	23,53	64,000	1,65	8,000	3	10	1	1	1	3,17	50,99	5,25	9,09
124	30,40	76,000	1,58	8,000	4	7	1	1	1	0,45	34,30	0,00	12,88
125	20,31	52,000	1,60	16,000	3	7	1	1	1	1,76	17,69	8,06	2,73
126	19,47	51,000	1,62	14,000	4	8	1	1	1	2,88	34,90	0,00	17,39
127	23,11	52,000	1,50	13,000	3	5	1	1	1	0,00	46,78	0,15	0,00
128	23,32	59,000	1,60	9,500	3	8	1	1	1	0,29	8,86	2,26	4,06
129	23,78	70,400	1,72	6,600	3	8	1	1	1	11,82	21,55	0,00	2,83
130	22,49	65,000	1,70	13,000	4	10	1	1	1	1,86	9,93	0,00	9,43
131	22,80	57,000	1,58	16,000	4	10	1	1	1	3,91	73,47	0,00	21,75
132	19,86	58,000	1,71	11,000	3	5	1	1	1	3,22	23,74	5,25	4,46
133	20,83	50,000	1,55	9,000	3	6	1	1	1	0,16	16,70	4,73	1,04
134	999,00	999,000	999,00	999,000	999	999	999	999	999	7,05	51,19	2,47	0,59
135	25,25	51,000	1,42	8,000	3	5	1	1	1	0,39	11,02	4,89	1,57
136	19,47	51,000	1,62	8,000	4	10	1	1	1	4,26	51,19	9,96	0,00
137	20,72	46,000	1,49	7,500	4	6	1	1	1	5,79	24,10	6,16	11,54
138	24,89	59,000	1,54	12,000	4	5	1	1	1	3,60	26,50	0,63	19,76
139	21,48	55,000	1,60	8,700	3	8	1	1	1	2,85	12,03	7,46	9,48
140	19,76	50,000	1,59	8,200	3	8	1	1	1	5,79	61,90	0,00	23,20
141	21,45	62,000	1,70	9,000	3	5	1	1	1	0,97	32,51	0,00	26,34