

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA ADMINISTRAÇÃO
OROFARÍNGEA DE COLOSTRO EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-
TERMO DE MUITO BAIXO PESO AO NASCER**

MARIA CAROLINA DE CAMPOS MARTINS

UBERLÂNDIA
2017

MARIA CAROLINA DE CAMPOS MARTINS

**AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA ADMINISTRAÇÃO OROFARÍNGEA DE
COLOSTRO EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO DE MUITO BAIXO PESO AO
NASCER**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.**

Área de Concentração: Ciências da Saúde.

**Orientadora: Profa. Dra. Vânia Olivetti
Steffen Abdallah**

**Co-orientadores: Prof. Dr. Luiz Ricardo
Goulart**

Profa. Dra. Daniela M. L. M. Ferreira

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- M386a
2017 Martins, Maria Carolina de Campos, 1980
 Ação anti-inflamatória da administração orofaríngea de colostro em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer / Maria Carolina de Campos Martins. - 2017.
 62 p. : il.
- Orientadora: Vânia Olivetti Steffen Abdallah.
 Coorientador: Luiz Ricardo Goulart.
 Coorientadora: Daniela M. L. M. Ferreira.
 Dissertação (mestrado) • Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
 Inclui bibliografia.
1. Ciências Médicas • Teses. 2. Colostro • Teses. 3. Infecções neonatais • Teses. 4. Biomarcadores • Teses. I. Abdallah, Vânia Olivetti Steffen. II. Goulart, Luiz Ricardo. III. Ferreira, Daniela M. L. M. IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. V. Título.

CDU: 61

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Carolina de Campos Martins

AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA ADMINISTRAÇÃO OROFARÍNGEA DE COLOSTRO EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO DE MUITO BAIXO PESO AO NASCER

Presidente da banca: Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde.

Banca Examinadora:

Titular: Profa. Dra. Ana Elisa Madalena Rinaldi

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Titular: Prof. Dra. Magda Regina Silva Moura

Instituição: Instituto Master de Ensino Presidente Antônio Carlos

Titular: Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Suplente: Profa. Dra. Cristiane Ribeiro Ambrósio

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

DEDICATÓRIA

“Pensar em algo interessante para ser a minha dedicatória”, foi essa frase que ficou estampada nesse local por muito tempo. Precisava de tempo para pensar em como agradecer enormemente as pessoas que conseguem trazer leveza para o meu cotidiano. No final só consigo pensar em dizer muito obrigada pai e mãe por simplesmente estarem aqui e agora comigo. ”

AGRADECIMENTOS

À Deus por nos dar o direito de livre arbítrio a fim de que aprendamos que não há salvação fora da caridade.

Às mães e seus bebês que colaboraram com a realização deste projeto.

À minha orientadora Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah na sutileza da orientação e bons conselhos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Daniela M. L. M. Ferreira pela contribuição na realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia, em especial, o Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho pela disposição em nos ajudar e guiar na busca de melhorias. Lembrando da ajuda indispensável da equipe na realização dos testes de captura imunoquímica, especialmente, à Patricia Terra, Larissa Prado e Aline Teodoro.

Aos colegas médicos e à equipe multidisciplinar do Serviço de Neonatologia pelo apoio.

Agradeço, em especial, à equipe de enfermagem cuja colaboração na administração orofaríngea foi essencial à realização do trabalho.

Aos professores participantes do exame de qualificação, Profa. Dra. Marília Martins Prado Bonini e Profa. Dra. Ana Elisa Madalena Rinaldi pelas sugestões e correções.

Aos professores participantes da banca examinadora, Profa. Dra. Ana Elisa Madalena Rinaldi, Profa. Dra. Magda Regina Silva Moura, Profa. Dra. Cristiane Ribeiro Ambrósio por aceitarem tal convite com tanto carinho e disposição.

Ao meu pai por sofrer e alegrar-se comigo durante toda o percurso.

À minha mãe por conseguir me mostrar que tudo pode ser melhor e mais fácil se você simplesmente tentar.

Às minhas irmãs e sobrinhos por me mostrarem novos caminhos a serem seguidos todos os dias.

A todos os amigos que direta e indiretamente contribuíram com esta conquista!

Sem vocês não teria sido possível...

*“Os únicos limites das nossas realizações
de amanhã são as nossas dúvidas e hesitações de hoje.”*

Franklin Roosevelt

RESUMO

Introdução e objetivo: As infecções constituem uma das principais causas de morbimortalidade em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer (RNPT MBP) e determinam uma resposta inflamatória sistêmica. A administração orofaríngea do leite humano da própria mãe, especialmente o colostro, tem sido sugerida como medida imunestimulatória para proteção contra sepse neonatal. Como os biomarcadores urinários têm sido estudados tanto na inflamação sistêmica quanto na sepse neonatal, nosso objetivo foi avaliar o efeito da administração orofaríngea de colostro na secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias na urina de RNPT MBP. **Método:** A partir de estudo clínico randomizado, duplo-cego, placebo controlado foram selecionadas aleatoriamente amostras de urina de 55 RNPT MBP dos quais 29 foram submetidos à administração orofaríngea de colostro da própria mãe e 26 de água destilada. As amostras de urina foram coletadas antes e 24 horas após o término da administração orofaríngea e analisadas por meio do kit Milliplex-27 no equipamento MagPix (Luminex). **Resultados:** Observou-se uma redução significativa das citocinas pró-inflamatórias [IFN – γ (35,8 para 24,1pg/ml; $p=0,005$), TNF – α (17,0 para 9,5pg/ml; $p=0,002$), IL – 8 (22,1 para 12,9pg/ml; $p=0,012$), IL – 9 (14,8 para 10,5pg/ml; $p=0,011$), IL – 15 (568,2 para 397,7pg/ml; $p=0,012$) e IL – 17a (1089,4 para 730,8pg/ml; $p=0,001$) e RANTES (6,7 para 5,4pg/ml; $p=0,018$)] no grupo de crianças submetidas a administração orofaríngea de colostro. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na incidência de sepse clínica e confirmada nos RNPT MBP submetidos à administração orofaríngea de colostro quando comparados com o grupo que recebeu água destilada. **Conclusão:** A administração orofaríngea de colostro promoveu um estado anti-inflamatório, caracterizado pela redução das citocinas pró-inflamatórias, o que pode contribuir para a redução da incidência de sepse neonatal.

Palavras-chave: colostro; administração orofaríngea; terapia imune; sepse neonatal; prematuros; biomarcadores.

ABSTRACT

Introduction and objective: Infections consist in one of the main causes of morbi-mortality in very low birth weight infants (VLBW). Oropharyngeal administration of own mother's milk (OMM), specially colostrum, has been prescribed as means of immunomodulatory protection against neonatal sepsis. As urine biomarkers, have been studied in systemic inflammation as well as in neonatal sepsis, our goal was to assess the effect of colostrum's oropharyngeal administration on secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines in VLBW infants' urine.

Method: From a randomized, double-blind, placebo controlled trial were randomly selected urine samples of 55 VLBW infants of which 29 received oropharyngeal administration of colostrum and 26 received only sterile water. Urine samples were collected before and 24 hours after the end of oropharyngeal administration and analyzed by means of Milliplex-27 kit using MagPix (Luminex) equipment. **Results:** A significant reduction of pro-inflammatory cytokines [IFN – γ (35.8 – 24.1pg/ml; $p=0.005$), TNF – α (17.0 – 9.5pg/ml; $p=0.002$), IL – 8 (22.1 – 12.9pg/ml; $p=0.012$), IL – 9 (14.8 – 10.5pg/ml; $p=0.011$), IL – 15 (568.2 – 397.7pg/ml; $p=0.012$) e IL – 17a (1089.4 – 730.8pg/ml; $p=0.001$) e RANTES (6.7 – 5.4pg/ml; $p= 0.018$)] was observed in the group submitted to oropharyngeal administration of colostrum. However, it was demonstrated no statistically significant difference in clinical and confirmed sepsis incidence in VLBW infants from both groups. **Conclusion:** Oropharyngeal administration of colostrum promoted an anti-inflammatory state, characterized by reduction of pro-inflammatory cytokines, which can result in a decrease of neonatal sepsis incidence.

Keywords: Colostrum; oropharyngeal administration; immune therapy; neonatal sepsis; premature infant; biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO

Figure 1. Flowdiagram of patient enrollment.	31
--	----

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1. Propriedades clinicas e laboratoriais de biomarcadores ideais.....	19
---	----

ARTIGO

Table 1. Baseline characteristics of VLBW infants who received oropharyngeal administration.....	34
Table 2. Occurrence of sepsis in VLBW infants who received oropharyngeal administration.....	35
Table 3. Dosage of urinary cytokines (pg/ml) before and 24 hours after the oropharyngeal administration.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

RNPT	Recém-nascido pré-termo
MBP	Muito baixo peso
UTIN	Unidade de terapia intensiva neonatal
LH	Leite humano
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
CARS	Síndrome da Resposta Anti-Inflamatória Compensatória
IL – 1 β	Interleucina 1 beta
IL – 1ra	Interleucina 1 receptor antagonista
IL – 2	Interleucina 2
IL – 4	Interleucina 4
IL – 5	Interleucina 5
IL – 6	Interleucina 6
IL – 7	Interleucina 7
IL – 8	Interleucina 8
IL – 9	Interleucina 9
IL – 10	Interleucina 10
IL – 12p70	Interleucina 12 porção 70
IL – 13	Interleucina 13
IL – 15	Interleucina 15
IL – 17a	Interleucina 17a
MIP – 1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MIP – 1 β	Proteína inflamatória de macrófago 1 beta
IFN – γ	Intérferon gamma
TNF – α	Fator de necrose tumoral alfa
RANTES	Regulador na ativação normal de células T expressa e segregada
Eotaxin	Eotaxina
IP – 10	Proteína quimiotática
MCP – 1	Fator de ativação de monócitos-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1. O Sistema Imune do RNPT	16
2.2. A resposta inflamatória na sepse neonatal.....	16
2.3. Biomarcadores – citocinas	18
2.4. O papel do LH para a prevenção de sepse no RNPT	19
2.5. Métodos alternativos para administração de colostro	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo Geral:	23
3.2. Objetivos específicos:	23
Artigo - Ação Anti-Inflamatória da Administração Orofaríngea de Colostro em Recém-Nascidos Pré-Termo de Muito Baixo Peso ao Nascer	24
ABSTRACT.....	27
LIST OF ACRONYMS AND SYMBOLS	28
1. Introduction	29
2. Method	30
2.1. Statistical Analysis.....	32
3. Results	33
4. Discussion	37
5. References	41
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	54
APÊNDICE B – INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS	56
ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	59
ANEXO 2 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	60
Conclusões Finais.....	61

1. INTRODUÇÃO

A sepse neonatal é uma importante causa de morbidade e mortalidade no período neonatal com incidência descrita na literatura de 20 a 30% nos recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer (RNPT MBP), especialmente, pela inabilidade do sistema imune em responder e proteger adequadamente contra as injúrias infecciosas (LEVY et al., 2007; HUANG et al., 2016). Além disso, os sinais e sintomas clínicos podem ser mínimos ou inespecíficos dependendo do desequilíbrio entre as respostas pró- e anti-inflamatórias frente ao dano causado por microrganismos patogênicos (LUSYATI et al., 2013; MACHADO et al., 2014).

Mesmo RNPT assintomáticos, mas com fatores de risco para o desenvolvimento de infecção, recebem na prática, tratamento empírico antimicrobiano com aumento do risco de seleção de flora bacteriana multirresistente (COLAIZY et al., 2016). Além do uso excessivo de antibióticos, a sepse determina também maior tempo de internação, e consequentemente maiores custos hospitalares, maior número de procedimentos invasivos e um nível considerável de estresse aos familiares (MUSSAP et al., 2013).

Devido ao impacto causado pela sepse neonatal, muitos estudos têm sido realizados, mundialmente, para sua detecção precoce e prevenção (NG; LAM, 2010; CAMACHO-GONZALEZ; SPEARMAN; STOLL, 2013; ANDRADE et al., 2015; FATTAH et al., 2017; GILFILLAN; BHANDARI, 2017). Dentre esses encontra-se o uso do leite humano (LH), principalmente o colostro, na proteção dos RNPT contra infecções em decorrência da presença de vários componentes bioativos e imunomoduladores (GAROFALO, 2010; KELLY; COUTTS, 2000; LAWRENCE; PANE, 2007; LEVY, 2007).

O LH contém vários fatores de nutrição assim como de proteção contra infecções para o RNPT MBP, especialmente devido a presença de várias citocinas e outros elementos capazes de atuar em tecidos linfoides específicos e refinar a resposta imune inata, diminuindo, consequentemente, a incidência de sepse e de sequelas a longo prazo (PATEL, A. B.; SHAIKH, 2007; SEIGEL et al., 2013; PLETSCHE et al., 2013; RODRIGUEZ; CAPLAN, 2015). Entretanto, um grande inconveniente no RNPT MBP é o atraso no início da dieta enteral devido à instabilidade hemodinâmica, sinais de intolerância alimentar e outras situações clínicas. Por isso, na literatura tem sido sugerido métodos alternativos de utilização do colostro, nas primeiras horas de vida, como forma de proteger contra as infecções até que a dieta enteral possa ser iniciada. Um dos métodos é a administração orofaríngea de colostro que consiste em instilar pequenas alíquotas de colostro da própria mãe em direção a orofaringe do RNPT a fim

de promover o encontro das citocinas e outros fatores do LH com tecidos linfoides, gerando uma sinalização célula a célula e amplificação da resposta imune (PATEL, A. B.; SHAIKH, 2007; RODRIGUEZ et al., 2010; PLETSCH et al., 2013; SEIGEL et al., 2013; RODRIGUEZ; CAPLAN, 2015; SOHN et al., 2016).

Do ponto de vista teórico, a proteção contra as infecções pela administração orofaríngea de colostro seria o resultado da promoção de um estado anti-inflamatório que poderia ser responsável pela alteração no perfil de citocinas no soro e urina de RNPT MBP. A utilização da urina para avaliação das citocinas, ainda que pouco estudada, é plausível pois o clearance das citocinas ocorre a nível renal mesmo no RNPT MBP, apesar de sua imaturidade. E além disso, tem a grande vantagem da urina poder ser obtida de forma segura e não invasiva (GRAZIANI et al., 2006; RODRIGUEZ et al., 2010; SUGUNA NARASIMHULU et al., 2013; SYLVESTER et al., 2014).

O Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HCU-UFU) é uma unidade de referência regional para atendimento de RNPT, em especial, de MBP e apresenta protocolos clínicos elaborados pela equipe multidisciplinar de acordo com as melhores práticas estabelecidas pela medicina baseada em evidência.

O uso do leite humano na alimentação do RNPT já faz parte do protocolo de assistência do Serviço de Neonatologia e o Banco de Leite Humano (BLH) do HCU-UFU garante sua disponibilidade durante a internação e incentiva a continuidade da amamentação após a alta hospitalar.

A administração orofaríngea de colostro pode ser iniciada mais precocemente do que a alimentação do RNPT e, teoricamente, poderia antecipar o efeito protetor contra infecções e funcionar como uma terapia imune reduzindo a morbi-mortalidade destes RNPT de risco.

O Laboratório de Nanobiotecnologia (NANOS) do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU é uma referência internacional para a pesquisa de novos biomarcadores na sepse e a parceria com o Serviço de Neonatologia possibilita a investigação desses biomarcadores na faixa etária neonatal.

A hipótese inicial que motivou este trabalho conjunto foi que a administração orofaríngea de colostro reduziria o número de casos de sepse neonatal e alteraria o padrão da excreção urinária de citocinas em RNPT MBP.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. O Sistema Imune do RNPT

O sistema imune inicia seu desenvolvimento a partir do final do 1º trimestre de gestação e estende-se até o final dos 10 anos de vida. Durante a gestação, o conceito mantém-se em contato com o líquido amniótico. Esse é responsável por estimular os tecidos linfoides pois contém várias citocinas e fatores de crescimento propícios para o desenvolvimento adequado da criança dentro do útero. O líquido amniótico favorece o melhor crescimento do feto buscando um estado anti-inflamatório ou homeostase (CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013; RODRIGUEZ; CAPLAN, 2015; CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017). O parto prematuro interrompe esse estado anti-inflamatório e o RNPT entra em contato com vários antígenos no meio externo causando uma desordem nas respostas anti- e pró-inflamatórias (KELLY; COUTTS, 2000; GLASS et al., 2015; GOMEZ-GALLEG0 et al., 2016).

A imunidade divide-se em adaptativa e inata (LEVY, 2007). A resposta imune adaptativa ou específica representa a imunidade adquirida após uma infecção ou exposição à um antígeno (vacinação) sendo capaz de gerar respostas mais rápidas e eficazes com menor sintomatologia quando o organismo é exposto novamente ao agente causador e é produzida por dois mecanismos: mediada por células (linfócitos T sensibilizados) e por anticorpos (linfócitos B – humoral). E em RNPT essa resposta é pouco expressiva e ineficaz devido a menor produção de células T e B, além de não gerar adequadamente memória imunológica (LEVY, 2007; YE et al., 2017). Desta forma, a defesa inicial RNPT MBP baseia-se na imunidade não específica, natural ou inata, ou seja, a primeira linha de defesa do organismo direcionada contra qualquer tipo de antígeno a fim de controlar a infecção compondo-se de neutrófilos e células apresentadoras de antígenos que são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e apresentá-los a receptores (RRP) dando início a resposta inflamatória (LEVY, 2007; MUSSAP et al., 2013; SUGITHARINI et al., 2014; WYNN; WONG, 2010; YE et al., 2017).

No ambiente extra-uterino, o RNPT está exposto a várias situações de estresse cuja sinalização para o sistema imune é a liberação de citocinas pró-inflamatórias que, mesmo em pequenas concentrações, são responsáveis pela amplificação e perpetuação da resposta imune (POLIN; RANDIS, 2010; WYNN; WONG, 2010; LUSYATI et al., 2013; SUGITHARINI; PREMA; BERLA THANGAM, 2013; MACHADO et al., 2014; WALKER; IYENGAR, 2015;

TREND et al., 2016; YE et al., 2017). A manutenção de um estado tendendo para o pró-inflamatório provoca atraso no crescimento e outras sequelas graves associadas a prematuridade (NG; LAM, 2010; MUSSAP et al., 2013; NG; MA; LAM, 2015).

2.2. A resposta inflamatória na sepse neonatal

A sepse é um desequilíbrio na habilidade do organismo em responder a uma injúria causada pela invasão e proliferação bacteriana (LEVY et al., 2007; NG; LAM, 2010; POLIN; RANDIS, 2010; MACHADO et al., 2014; DENNING et al., 2017; FATTAH et al., 2017; GILFILLAN; BHANDARI, 2017). A definição de sepse, mesmo no período neonatal, é baseada na *International Sepsis Definition Conference* (ISDC, 2001) que definiu sepse como uma síndrome clínica caracterizada por infecção acompanhada pela SIRS.

A resposta imune inata do RNPT MBP inicia-se após injúria tecidual ou quebra de barreira protetora permitindo contato entre o organismo e agentes patogênicos com ativação primária de células dendríticas e macrófagos que são os principais produtores de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1(IL-1) cujas ações voltam-se para os próprios macrófagos e determinam resposta autócrine com a produção e secreção de outras citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 e IFN- γ e outros fatores de crescimento). Além disso, o TNF- α e a IL-1 atuam sobre o endotélio vascular e produzem hipertemia, atração de novos polimorfonucleares com leucocitose, degranulação de neutrófilos que liberam óxido nítrico (NO) e outros derivados do oxigênio (intermediários reativos de oxigênio – reactive oxygen intermediates – ROI) que provocam vasodilatação local seguida de edema e perda do tônus vascular (hipotensão) (LEVY et al., 2007; CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013; MUSSAP et al., 2013; BHANDARI et al., 2014; ANDRADE et al., 2015; BARRERA; SANCHEZ, 2016; BAUMGARTEL et al., 2016). Desta forma inicia-se a atração de neutrófilos e outras células de defesa de primeira ordem proporcionando um aumento considerável nas citocinas pró-inflamatórias. Essa amplificação da resposta pró-inflamatória é conhecida como a resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (NG; LAM, 2010; NGUYEN et al., 2014; GLASS et al., 2015; SEGURA-CERVANTES et al., 2016; DENNING et al., 2017; FATTAH et al., 2017; GILFILLAN; BHANDARI, 2017; SHARMA et al., 2017; SITARIK et al., 2017). A ativação a nível sistêmico das citocinas pró-inflamatórias gera lesões em órgãos distantes e consumo de plaquetas durante a coagulação intravascular disseminada (CIVD) o que desencadeia a disfunção de múltiplos órgãos (DMO) (WYNN; WONG, 2010; SUGITHARINI et al., 2013; SUGUNA NARASIMHULU et al., 2013; MACHADO et al., 2014). Para contrabalancear a

resposta pró-inflamatória, inicia-se um aumento das citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4 e TGF- β) buscando a normalização do sistema como um todo conhecida com a síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (compensatory anti-inflammatory response syndrome – CARS) (MACHADO et al., 2014).

A manifestação clínica da sepse neonatal é bastante variável e inespecífica e os RNPT MBP podem apresentar-se com instabilidade térmica (hipo ou hipertermia); desconforto respiratório com aumento das necessidades de oxigênio suplementar ou outras modalidades de suporte ventilatório; labilidade hemodinâmica (hipotensão arterial e vasodilatação periférica); intolerância alimentar e outras. Todos esses sinais e sintomas também podem estar presentes em outras condições próprias desse período da vida, tais como imaturidade do centro regulador da temperatura podendo resultar em oscilações da temperatura; síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido que habitualmente requer suporte ventilatório podendo ou não progredir para a displasia broncopulmonar. O controle fino da pressão arterial em RNPT depende de vários fatores, mas sabe-se que a pressão arterial tende a hipotensão nos RNPT, especialmente, naqueles extremos de idade gestacional. Comumente apresentam persistência do canal arterial que leva a alterações no padrão respiratório e na dinâmica circulatória. O trato gastrointestinal é pouco desenvolvido levando em muitos casos a intolerância à dieta, resultando no aparecimento de vômitos e/ou resíduos gástricos. Assim as manifestações da SIRS confundem-se com situações comuns e particulares do período neonatal dificultando o diagnóstico preciso e rápido (WYNN; WONG, 2010; CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013; MACHADO et al., 2014; BHANDARI et al., 2014; GLASS et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; DENNING et al., 2017; GILFILLAN; BHANDARI, 2017).

Por isso, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos menos invasivos, sensíveis e específicos para o diagnóstico e prevenção da sepse neonatal. Essa condição é hoje a principal causa de morbimortalidade nesse período de vida sendo responsável por cerca de um milhão óbitos de RNPT, especialmente, MBP no mundo inteiro (WYNN; WONG, 2010; BHATIA et al., 2013; CHAUHAN et al., 2017).

Em adição à dificuldade diagnóstica, observa-se o crescente uso de antibióticos nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatais (UTIN) na tentativa de diminuir os efeitos nocivos que a sepse pode causar nessa população. Entretanto, o uso constante e frequente de antibióticos produz alterações na microbiota do RNPT, com repercussões importantes para seu organismo. A presença de microbiota patogênica selecionada pelo uso corriqueiro de antibióticos é uma das principais causas de desenvolvimento de novos casos de sepse neonatal pois além de modificar a flora do ambiente hospitalar, determina o aparecimento de cepas bacterianas cada

vez menos sensíveis aos antibióticos existentes (GEPHART; HANSON, 2013; PATEL, R. M.; DENNING, 2015; GOMEZ-GALLEGU et al., 2016; HODZIC; BOLOCK; GOOD, 2017).

2.3. Biomarcadores – citocinas

Os principais biomarcadores em estudo são as citocinas envolvidas tanto na resposta pró-inflamatória quanto na anti-inflamatória (AKDIS et al., 2011; BHANDARI et al., 2014; AKDIS et al., 2016; FATTAH et al., 2017). Estudos atuais tentam delimitar um único biomarcador confiável, mas encontram dificuldades, uma vez que a maioria das citocinas são produzidas logo após a injúria tecidual mas têm meia-vida muito curta, sendo que em torno de 6 a 8 horas já sofreram clearance da circulação periférica quando o RNTP MBP ainda não manifestou alterações clínicas (BHANDARI et al., 2014). Há uma tentativa do rim em eliminar o mais rápido possível essas citocinas do sangue periférico e mesmo no RNPT, apesar de sua imaturidade renal, existe uma concentração adequadas desses biomarcadores na urina nos casos de sepse (SUGUNA NARASIMHULU et al., 2013; SYLVESTER et al., 2014; PYNN et al., 2015).

Outra característica das citocinas é a não correlação com o prognóstico evolutivo do RNPT, ou seja, não foi encontrado ainda um biomarcador capaz de prever o prognóstico quanto ao desfecho e sequelas do RNPT (LEVY et al., 2007; CHAUHAN et al., 2017). Além disso, a utilização das citocinas como marcadores de sepse no período neonatal ainda não é habitual na prática clínica devido aos altos custos para sua detecção e também pela necessidade de mais pesquisas científicas estabelecendo valores normais para essa faixa etária. Vários estudos têm sido realizados para avaliação das dosagens dos biomarcadores no sangue, mas ainda existem poucos estudos utilizando amostras de urina. A grande vantagem da dosagem urinária consiste na possibilidade de obtenção das amostras de forma mais fácil, segura e menos invasiva (CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013; BHANDARI et al., 2014; HEDEGAARD; WISBORG; HVAS, 2015; CHAUHAN et al., 2017; FATTAH et al., 2017; GILFILLAN; BHANDARI, 2017).

As principais propriedades clínicas e laboratoriais de biomarcadores ideais estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades clínicas e laboratoriais de biomarcadores ideais.

Propriedades Clínicas	Propriedades Laboratoriais
Fornecer um algoritmo para iniciar e / ou parar o tratamento antimicrobiano.	Composto estável que permita a realização de testes laboratoriais dentro horas de trabalho normais e com armazenamento fácil.
Detectar infecção precocemente (ou seja, na apresentação clínica).	Determinação quantitativa da concentração de biomarcadores.
Identificar um patógeno específico ou uma categoria de agentes patogênicos (por exemplo, vírus, bactérias e fungos).	Método de medição automático e fácil com teste de baixo custo que pode ser usado como uma medida de rotina.
Monitorar o progresso da doença e orientar o tratamento antimicrobiano.	Tempo de resposta rápida (por exemplo, resultados aos clínicos dentro de 6 horas).
Prever a gravidade da doença no início da infecção.	Pequeno volume de amostra (ou seja, <0,5 ml de sangue).
Predizer o prognóstico (ou seja, a mortalidade).	Disponibilidade diária de testes em laboratórios clínicos.

(Modificado de NG et al., 2010)

2.4. O papel do LH para a prevenção de sepse no RNPT

O colostro tornou-se alvo de várias pesquisas atuais devido à grande quantidade de compostos celulares e bioativos vindos da circulação materna, já que as junções mamárias ainda se encontram abertas, que podem desempenhar papel ativo na imunomodulação dos RNPT (RODRIGUEZ et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2010; RODRIGUEZ; CAPLAN, 2015). Esses fatores presentes no LH são capazes de melhorar as defesas inatas contra as injúrias causadas por microrganismos patogênicos, pois agem refinando a resposta imune do RNPT MBP (RODRIGUEZ et al., 2009).

O colostro é capaz de estimular a defesa do organismo através de quatro componentes bioativos: fatores antimicrobianos, fatores anti-inflamatórios, fatores imuno-moduladores e

células de defesa (neutrófilos, macrófagos e linfócitos maternos ativados) (RODRIGUEZ et al., 2009).

Dentre os inúmeros componentes do LH com papel imuno-modulador destacam-se as citocinas pró- e anti-inflamatórias que são proteínas capazes de realizar a sinalização entre as células (LEVY et al., 2007; GAROFALO et al., 2010; FERREIRA; ABDALLAH, CAMELO JUNIOR, 2015; LEVY, 2007).

A interleucina 6 (IL-6) é uma das primeiras interleucinas descritas no colostro com papel de estimular o desenvolvimento e diferenciação das células produtoras de imunoglobulinas A (IgA), cuja principal função é a ligação a micro-organismos e macromoléculas evitando assim o contato de patógenos e o epitélio do RNPT (RODRIGUEZ et al., 2009; GAROFALO et al., 2010; BHATIA et al., 2013; BARRERA; SANCHEZ, 2016).

A interleucina 10 (IL-10) é outra citocina presente em grandes concentrações tanto na fase aquosa quanto na fase lipídica do colostro em grandes concentrações e com características anti-inflamatórias, uma vez que inibe a proliferação de linfócitos no sangue periférico (GAROFALO et al., 2010; BARRERA; SANCHEZ, 2016).

Ainda existem as quimiocinas, que são citocinas responsáveis pela atração de células específicas de defesa. São divididas em duas grandes famílias: CC e CXC quimiocinas. Diferem, estruturalmente, pela separação da cisteína por um aminoácido (CXC) ou não (CC), como também pela função desempenhada. A principal representante da família de quimiocinas CXC é a interleucina 8 (IL-8) responsável pela atração e degranulação de neutrófilos, envolvida nas fases iniciais dos pródromos inflamatórios. Já MCP-1, MIP-1 α e RANTES, representante da família das quimiocinas CC, atuam diretamente sobre basófilos, eosinófilos e monócitos (GAROFALO, 2010; PRIBYLOVA et al., 2012; STOJEWSKA et al., 2016). A presença dessas citocinas no colostro e sua função sobre a imunidade do RNPT ainda exigem maiores investigações.

Dentre os componentes bioativos presentes no colostro, salutar para a formação e crescimento da mucosa contra patógenos, destacam-se ainda o fator de crescimento TGF- β responsável pela homeostase intestinal através da proliferação de microbiota não patogênica intestinal, os oligossacarídeos que também modulam a microbiota intestinal e os anti-oxidantes α -tocoferol, β -caroteno e ácido ascórbico responsáveis pela diminuição dos radicais livres de oxigênio (LAWRENCE; PANE, 2007; CASTELLOTE et al., 2011; FERREIRA; ABDALLAH, CAMELO JUNIOR, 2015; TURFKRUYER; VERHASSELT, 2015; GOMEZ-GALLEGO et al., 2016; LEWIS et al., 2017).

Quando os componentes bioativos do colostro, especialmente, as citocinas, entram em contato com o trato gastrointestinal do RNPT, podem atuar diretamente no tecido linfoide associado a mucosa (MALT - mucosa-associated lymphoid tissue), especialmente, no tecido linfoide presente no trato gastrointestinal (GALT). (SEIGEL et al., 2014; UNDERWOOD et al., 2014; UNDERWOOD et al., 2015; RODRIGUEZ et al., 2015; LEWIS et al., 2017). O MALT também está presente na orofaringe (OFALT) e no trato respiratório (BALT) e juntamente com o GALT representam locais estratégicos para o encontro com antígenos vindos tanto da cavidade oral quanto da via aérea e são considerados uma segunda linha de defesa já que contêm células T e B maduras capazes de produzir uma resposta a qualquer injúria (LAWRENCE; PANE, 2007; GAROFALO et al., 2010; FERREIRA; ABDALLAH, CAMELO JUNIOR, 2015).

As citocinas presentes no colostro humano quando em contato com o MALT promovem o desenvolvimento da resposta inflamatória de forma organizada (IL – 1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IFN – γ , TNF – α , receptor R1 do TNF – α com grande predomínio do estado anti-inflamatório), melhoram a maturação de leucócitos (IL-1 β , IL-2, fatores de crescimento de colônias de granulócitos e de epiderma) e do trato gastrointestinal (IL – 8) e aumentam a produção de imunoglobulinas (IL – 6, IL-10 e TGF- β) (RODRIGUEZ et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2015).

Desta maneira, o uso do colostro da própria mãe é uma estratégia eficaz, de baixo custo e passível de aplicação em UTIN para diminuir os casos de sepse neonatal (RODRIGUEZ et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2015).

2.5. Métodos alternativos para administração de colostro

Um empecilho ao uso do leite humano na dieta enteral do RNPT MBP, estratégia eficaz para a redução de sepse neonatal, é a impossibilidade, em muitos casos, de início precoce da dieta enteral pela instabilidade clínica e evolução frequente com sinais de intolerância alimentar pela imaturidade (PATEL, A. B.; SHAIKH, 2007; RODRIGUEZ et al., 2010; PATEL, A. L. et al., 2013; SOHN et al., 2016). Com o intuito de solucionar essa dificuldade, tem descritos outros métodos de utilização do colostro como a lavagem gástrica com colostro nas primeiras horas de vida (PATEL, A. B.; SHAIKH, 2007), higiene oral com colostro (GEPHART; HANSON, 2013; GEPHART; WELLER, 2014) e administração orofaríngea de colostro (RODRIGUEZ et al., 2010; LEE et al., 2015).

Apesar da multiplicidade de métodos, o objetivo é o mesmo: estimular o sistema imune do RNPT MBP através da modulação das células dos tecidos linfoides associados à mucosa presentes na orofaringe (OFALT) e no trato gastrointestinal (GALT) e absorção por parte da mucosa de fatores que interferem na colonização intestinal (FERREIRA; ABDALLAH, CAMELO JUNIOR, 2015; RODRIGUEZ; CAPLAN, 2015).

Segundo Rodriguez et al. (2015), o colostro instilado na cavidade orofaríngea dos RNPT MBP pode atuar na prevenção de sepse tardia através dos seguintes mecanismos: (1) interação entre as citocinas do colostro com as células do tecido linfóide da orofaringe (OFALT); (2) absorção pela mucosa orofaríngea de fatores de proteção como lactoferrina e IgA que impedem a adesão de bactérias; (3) estímulo para a formação de uma barreira de proteção contra patógenos; (4) atuação local e sistêmica de oligossacarídeos que modulam a microbiota intestinal e (5) efeito protetor dos antioxidantes (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico, L-histidine e lactoferrina atuando na diminuição dos radicais livres de oxigênio (LAWRENCE; PANE, 2007; RODRIGUEZ et al., 2010; RODRIGUEZ et al., 2015; GOMEZ-GALLEGO et al., 2016; SITARIK et al., 2017).

A partir desses pressupostos, surgiram inicialmente estudos para assegurar a viabilidade da administração orofaríngea de colostro como um método seguro dentro das UTIN (RODRIGUEZ et al., 2010).

Posteriormente, foram realizados outros trabalhos para avaliar a eficácia da administração orofaríngea de colostro como terapia imune.

Rodriguez et al. (2011) estudaram 15 RNPT de extremo baixo peso ao nascer (EBP) que foram randomizados para receberem administração orofaríngea de colostro (9 RN) ou placebo (6 RN) e não encontraram diferenças significativas na dosagem de biomarcadores (IgA, lactoferrina e IL-10) no soro, urina e aspirado traqueal entre os grupos estudados.

Seigel et al. (2013) conduziram um coorte retrospectiva a partir da instituição da administração orofaríngea de colostro da própria mãe como protocolo na UTIN. Foram avaliados 280 RNPT EBP antes da instituição do protocolo e 89 RNPT EBP após. Não foram encontradas diferenças significativas na mortalidade, na incidência de ECN e perfuração intestinal espontânea.

Um estudo clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado com um número pequeno de RNPT EBP foi conduzido por Lee et al. (2015). Eles avaliaram 42 crianças sendo 21 do grupo tratado e 21 do grupo placebo e encontraram redução significativa na incidência de sepse clínica. Relataram ainda diferenças significativas nas dosagens dos biomarcadores no grupo que recebeu colostro: dosagens urinárias maiores de IgA com 1 e 2 semanas; dosagens

urinárias maiores de lactoferrina com 1 semana; dosagens urinárias menores de IL-1 β com 2 semanas; dosagens menores na saliva de TGF- β 1 e IL-8 com 2 semanas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Analisar o efeito da utilização orofaríngea de colostro na excreção urinária de biomarcadores inflamatórios de sepse neonatal em RNPT MBP nascidos no Serviço de Neonatologia do Hospital das Clínicas de Uberlândia, da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a segurança da administração orofaríngea de colostro em RNPT MBP;
- Comparar a dosagem de citocinas urinárias entre os RNPT MBP submetidos ou não a administração orofaríngea de colostro;
- Comparar a incidência de sepse neonatal entre os RNPT MBP submetidos ou não a administração orofaríngea de colostro.

Artigo - Ação Anti-Inflamatória da Administração Orofaríngea de Colostro em Recém-Nascidos Pré-Termo de Muito Baixo Peso ao Nascer

Artigo submetido para publicação para o período “Clinical Nutrition” (comprovante de submissão: anexo 2).

Anti-inflammatory role of colostrum's oropharyngeal administration in very low birth weight infants

Maria Carolina de Campos Martins, ^{1*} Daniela M. L. M. Ferreira, PhD,¹ Ângela M. M. Oliveira, MD,² Larissa Prado Maia, MD,³ Patrícia Terra Alves, MD,³ Aline Teodoro de Paula, PhD, ³ Mônica C. Sopelete, PhD,⁴ Francisco E. Martinez, PhD,⁵ Morun Bernardino Neto, PhD,⁶ Luiz Ricardo Goulart, PhD, ³ Vânia O. S. Abdallah, PhD¹.

1. Division of Neonatology, Department of Pediatrics, Federal University of Uberlândia; Uberlândia, Minas Gerais, Brazil
2. Human Milk Bank, Clinics Hospital, Federal University of Uberlândia; Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.
3. Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia; Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.
4. Laboratory of Immunology, Biological Science Institute, Federal University of Uberlândia; Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.
5. Division of Neonatology, Department of Pediatrics, University of São Paulo; Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
6. Engineering School, University of São Paulo; Lorena, São Paulo, Brazil

Corresponding author: Maria Carolina de Campos Martins

Division of Neonatology, Department of Pediatrics, Federal University of Uberlândia;
Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

Av. Pará 1720; Uberlândia, MG – Brazil / CEP 38405-320

Tel: (+55-34) 3218-2112 / (+55-34) 99196-7220

e-mail: m.carolinamartins@gmail.com

The authors thank the Brazilian funding agencies, CNPq, CAPES and FAPEMIG, for providing financial support to the National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology – INCT-TeraNano (CNPq/CAPES/FAPEMIG, Grant numbers CNPq-465669/2014-0 and FAPEMIG-CBB-APQ-03613-17).

Author Disclosure: No conflict of interest

Running title: Anti-inflammatory role of colostrum's oropharyngeal administration

ABSTRACT

Introduction and objective: Infections consist in one of the main cause of morbi-mortality in very low birth weight infants (VLBW). Oropharyngeal administration of own mother's milk (OMM), specially colostrum, has been prescribed as means of immunomodulatory protection against neonatal sepsis. As urine biomarkers, have been studied in systemic inflammation as well as in neonatal sepsis, our goal was to assess the effect of colostrum's oropharyngeal administration on secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines in VLBW infants' urine.

Method: From a randomized, double-blind, placebo controlled trial were randomly selected urine samples of 55 premature of which 29 received oropharyngeal administration of colostrum and 26 received only sterile water. Urine samples were collected before and 24 hours after the end of oropharyngeal administration and analyzed by means of Milliplex-27 kit using MagPix (Luminex) equipment. **Results:** A significant reduction of pro-inflammatory cytokines [IFN – γ (35.8 – 24.1pg/ml; $p=0.005$), TNF – α (17.0 – 9.5pg/ml; $p=0.002$), IL – 8 (22.1 – 12.9pg/ml; $p=0.012$), IL – 9 (14.8 - 10.5pg/ml; $p=0.011$), IL – 15 (568.2 – 397.7pg/ml; $p=0.012$) e IL – 17a (1089.4 – 730.8pg/ml; $p=0.001$) e RANTES (6.7 – 5.4pg/ml; $p= 0.018$)] was observed in the group submitted to oropharyngeal administration of colostrum. However, it was demonstrated no statistically significant difference in clinical and confirmed sepsis incidence in VLBW infants from both groups. **Conclusion:** Oropharyngeal administration of colostrum promoted an anti-inflammatory state, characterized by reduction of pro-inflammatory cytokines, which can result in a decrease of neonatal sepsis incidence.

Keywords: Colostrum; oropharyngeal administration; immune therapy; neonatal sepsis; premature infant; biomarkers.

LIST OF ACRONYMS AND SYMBOLS

VLBW	Very low birth weight
NICU	Neonatal Intensive Care Unit
IL – 1 β	Interleukin 1 beta
IL – 1ra	Interleukin 1 antagonist receptor
IL – 2	Interleukin 2
IL – 4	Interleukin 4
IL – 5	Interleukin 5
IL – 6	Interleukin 6
IL – 7	Interleukin 7
IL – 8	Interleukin 8
IL – 9	Interleukin 9
IL – 10	Interleukin 10
IL – 12p70	Interleukin 12 portion 70
IL – 13	Interleukin 13
IL – 15	Interleukin 15
IL – 17a	Interleukin 17a
MIP – 1 α	Macrophage 1 alpha inflammatory protein
MIP-1 β	Macrophage 1 beta inflammatory protein
IFN- γ	Gamma interferon
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and segregated
Eotaxin	Eotaxin
IP – 10	Chemotactic protein
MCP-1	Monocyte activation factor 1

1. Introduction

Neonatal sepsis is one of the main causes of morbidity and mortality during neonatal period and it is responsible for approximately one million VLBW infants' deaths worldwide.¹⁻³

The immune system of VLBW newborn has an immature and little effective innate immune response.⁴ Subsequent to bacterial invasion, there is a significant increase of pro-inflammatory cytokines and chemokines which are not only restricted to the inflamed area, and lead to dysfunctions in other tissues and distant organs, characterizing a multiple organ dysfunction.⁵⁻⁷

Soon after the increase of inflammatory interleukins, production and release of anti-inflammatory cytokines starts, triggering a response in the organism known as compensatory anti-inflammatory response syndrome – CARS.⁸ The unbalance between the production of pro-inflammatory cytokines and the anti-inflammatory response is the main responsible for the rapid clinical decline of VLBW infants during sepsis and septic shock, as well for the appearance of late sequelae.^{1, 5, 8}

Cytokines are, by definition, the most delicate and reliable communication mode between defense cells modulating the innate immune response, due to its fast increase early in the innate response followed by abrupt decline soon after.^{3, 5} Hence, it is little likely the election of only one cytokine for early diagnosis of neonatal sepsis.^{2, 5}

Human milk feeding in VLBW infants has been highlighted as a factor of protection against the risk of acquiring infections during hospitalization.⁹ However, clinical instability and immature gastrointestinal tract are responsible for early onset difficulty and progression of enteral diet, postponing the benefits of this protective effect.¹⁰⁻¹⁴

Consequently, with the aim of reducing cases of late onset sepsis and morbi-mortality during hospitalization of VLBW infants in NICU, it has been studied the role of own mother milk oropharyngeal administration, especially colostrum, as a factor of protection against inflammatory injuries caused by pathogenic microorganisms.^{9, 11, 15} This hypothesis is based on

the presence of high concentrations of bioactive components in colostrum such as cytokines, which could stimulate mucosa associated lymphoid tissue (MALT), present in oropharynx (OFALT) and intestine (GALT), with migration of lymphocytes to distant locations resulting in immune activation and amplified anti-inflammatory response.^{9, 13, 14, 16-24}

The role of kidney in plasma removal of some pro-inflammatory cytokines after the diagnosis of sepsis is very important, as it is responsible for the removal of these cytokines from plasma until diuresis is preserved.²⁵ Survival in patients with sepsis appears to be inversely related to plasma pro-inflammatory cytokines levels.^{25, 26} In this context, it was raised the hypothesis that urinary inflammatory biomarkers should be reduced in VLBW infants under oropharyngeal administration of colostrum, if there was a systemic anti-inflammatory action. Therefore, our objective was to evaluate the effect of oropharyngeal use of colostrum on urinary excretion of a biomarker's panel of inflammation sepsis in VLBW infants.

2. Method

This study is part of a broader one, randomized, double blind, placebo controlled, which evaluated the effect of oropharyngeal administration of colostrum on incidence of neonatal sepsis, and on nutritional evolution in 113 VLBW with gestational age less 34 than weeks and weight at birth less than 1500 g, born and hospitalized in a NICU from a Federal University Hospital in Brazil. The study was approved by the Ethics Committee in Research (CAAE 09199613.9.0000.5152) and registered on ClinicalTrials.gov (NCT02912585). For this study 55 VLBW infants were randomly selected, after analysis of sample size, being 29 VLBW infants from the study group who received own mother's colostrum and 26 VLBW infants from control group who received sterile water, according to Figure 1.

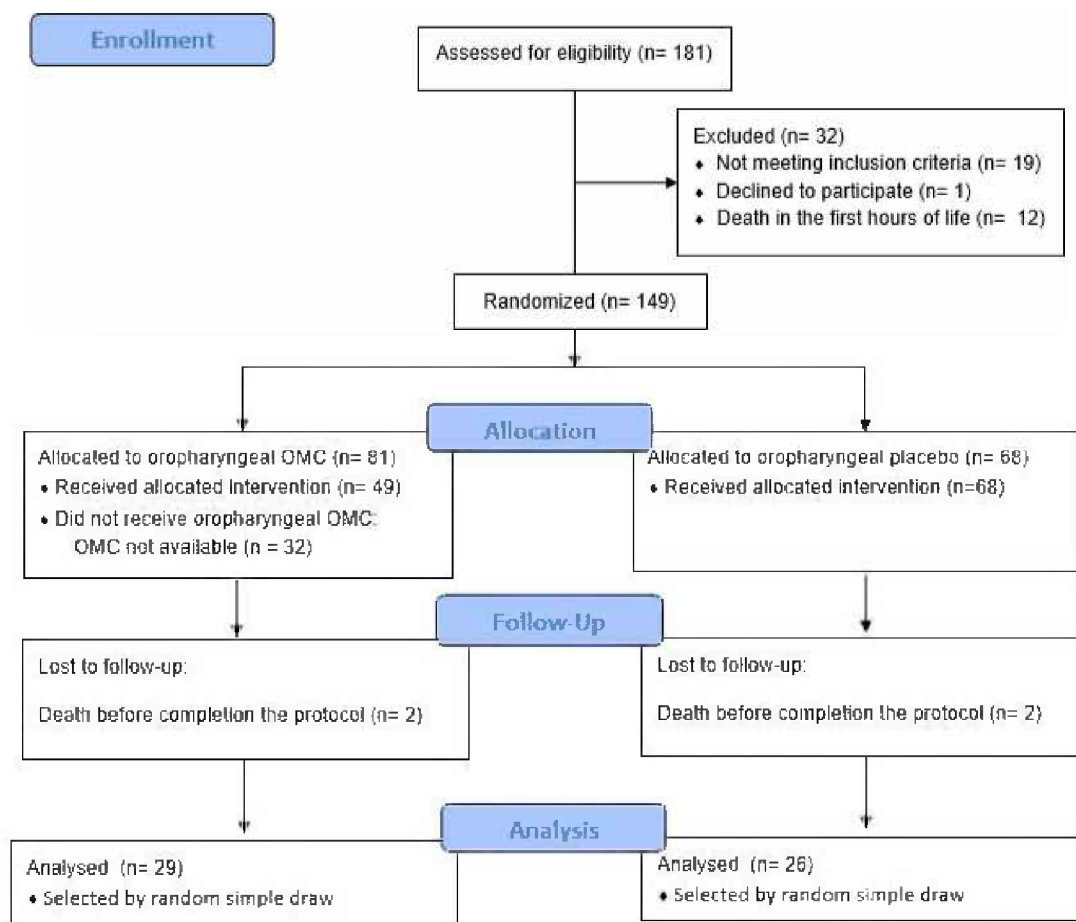


Figure 1. Flowdiagram of patient enrollment.

In the first 48 hours of the newborn's life, after informed consent all mothers were instructed to aseptically milk their breasts manually or with an electrical pump (Bomba Tira Leite Mini Eletric-Medela) in the Human Milk Bank, every 2 to 3 hours, under the supervision of an accredited professional. All the volume milked was identified and kept under refrigeration.

Oropharyngeal administration of colostrum or sterile water followed the protocol proposed by Rodriguez and colleagues.¹⁴ Colostrum or sterile water were fractioned in sterile 0.2 mL syringes (Disposable Syringe 100 UI), properly identified and occluded with opaque tape, and transported to the NICU for oropharyngeal administration, in the first 48-72 hours of life of VLBW infant. Oropharyngeal administration was conducted by a nursing technician responsible for the infant, according to the medical prescription in volumes of 0.2 mL every 2

hours for a period of 48 hours. The technique used for oropharyngeal administration consisted of the introduction of a syringe containing the colostrum or sterile water on the right-hand side of the mouth of the newborn and targeting to the oropharynx with subsequent injection of 0.1 ml. Then, the syringe was positioned on the left side of the mouth, directed to the oropharynx and injected 0.1 ml volume remaining in the syringe. Throughout the treatment protocol, infant's vital signs were monitored. Urine samples were collected before the beginning of oropharyngeal administration and 24 hours after the end of the protocol. Urinary cytokines of both groups were quantified by a multiplex system on a Bio-Plex MagPix analyzer (Luminex) using the Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay (Bio-Rad). Afterward the following cytokines were analyzed: eotaxin, IFN- γ , interleukins (IL) 1 beta, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17a, TNF- α , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES. Data analysis was made in the software of the equipment and the concentration of cytokines was obtained by comparison with the equivalent of each cytokine standard curve to obtain the value in pg/mL.

Clinical data from mother and from whole duration of VLBW infants' hospitalization were obtained through the analysis of medical records. Clinical sepsis was defined as the clinical manifestation of suggestive signs of infection associated with the treatment for, at least, three days with antibiotics and confirmed sepsis as clinical sepsis with positive blood culture.

All VLBW infants received own mother's milk or from donators, until the minimum volume of 100 mL/Kg/day. After this volume, human milk was fortified or the newborn received preterm formula depending on availability of human milk.

2.1. Statistical Analysis

The sample size of 39 subjects was established *a priori* to obtain maximum α of 0.05 and maximum estimate error of 8%.

Statistical analysis was done with software SPSS version 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) and Bioestat version 5.0 (MamirauáTM, Belém, PA, Brazil).

Descriptive analysis included frequencies, percentages and medians.

Comparison between groups was done using Odds ratio, Mann-Whitney's U test and Fisher's exact test, while Wilcoxon rank-sum test was used to compare inside the group itself.

Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

All VLBW infants tolerated the oropharyngeal administration of colostrum or sterile water without any adverse effects.

Birth weight and gestational age medians were, respectively, 1114 grams and 28 weeks in the study group and 1107.5 grams and 29 weeks in the control group. The beginning of the oropharyngeal administration protocol occurred with median age of 41 hours in the colostrum group and 44 hours in the control group and the median age of feeding's initiation was 3 days in both groups. Other basal characteristics of VLBW infants are listed in Table 1.

Table 1. Baseline characteristics of VLBW infants who received oropharyngeal administration.

Characteristics	Colostrum (n=29)	Control (n=26)	p-value
Gestational age (wk.) ¹	28 (27-30.5)	29 (27-31)	0.518
Weight (g)	1114 (848-1375)	1107.5 (970-1219.5)	0.827
Male sex (n/%) [*]	15(51.7)	17(65.3)	0.413
Apgar 1 min	6 (3.5-7)	6.5 (4.7-8)	0.121
Apgar 5 min	8 (8-9)	8 (7-9)	0.255
Cesarean delivery (n/%) [*]	22(75.8)	21(80.7)	0.751
Chorioamnionitis (n/%) [*]	5 (17.2)	4(15.3)	1.000
Antenatal steroid use (n/%) [*]	23(79.3)	21(80.7)	1.000
SNAP – PE	29 (13-44.5)	25 (18.5-43)	0.873
Start of protocol (h)	41 (37.5-49)	44 (35.7-51.2)	0.781
Day feedings initiation (d)	3 (2-5)	3 (2-4.2)	0.959
Length of stay (d)	66 (45.5-87)	64.5 (48.7-72)	0.549

SNAPPE: score of neonatal acute physiology – perinatal extension; g: grams; n: absolute number; %: percentage; d: days; h: hours.

¹Values expressed in median (inter-quartile interval); p-value: Mann-Whitney's U Test for comparison between interval variables; ^{*}: Fisher's exact test for comparison between nominal variables.

No statistically significant differences were observed in the occurrence of clinical sepsis and confirmed sepsis in groups that received oropharyngeal administration of colostrum or sterile water as shown in Table 2.

Table 2. Occurrence of sepsis in VLBW infants who received oropharyngeal administration.

	Colostrum (n=29)	Control (n=26)	Odds (CI 95%)	p-value
Clinical sepsis (n/%)	11(52.4)	10(47.6)	1.023 (0.344-3.040)	1.000
Confirmed sepsis (n/%)	7(50)	7(50)	1.158 (0.344-3.899)	1.000

CI: confidence interval of 95%; n/%: absolute number /percentage; p-value: Fisher's exact test

In the colostrum group, it was observed a reduction in the dosage of some pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-9, IL-15, IL-17a, and RANTES) 24 hours after oropharyngeal administration, which did not occur in the control group. There was no statistically significant difference in the comparison between groups before and 24 hours after oropharyngeal administration. The medians of urinary cytokine dosages during the evaluation periods are shown in table 3.

Table 3. Dosage of urinary cytokines (pg/ml) before and 24 hours after the oropharyngeal administration.

	Colostrum			Control				
	Before ¹	After ²	p-value ^a	Before ¹	After ²	p-value ^b	p-value ^c	p-value ^d
<i>Pro-inflammatory</i>								
TNF- α	17.00	9.50	0.002*	13.90	8.90	0.092	0.433	0.980
IFN- γ	35.80	24.10	0.005*	35.80	24.10	0.255	0.438	0.807
IL-1b	1.60	1.40	0.404	1.60	1.05	0.138	0.572	0.123
IL-1ra	6975.90	7254.50	0.422	3934.10	3688.70	0.434	0.125	0.121
IL-2	7.20	7.20	0.187	7.45	7.40	0.187	0.723	0.673
IL-5	3.50	1.90	0.003*	3.45	1.90	0.043*	0.348	0.745
IL-6	4.80	2.50	0.001*	4.80	2.30	0.001*	0.448	0.295
IL-7	6.50	3.80	0.001*	5.85	3.00	0.032*	0.251	0.457
IL-8	22.10	12.90	0.012*	23.20	12.75	0.089	0.527	0.960
IL-9	14.80	10.50	0.011*	11.45	6.60	0.142	0.049*	0.235
IL-12p70	1106.90	1162.10	0.459	955.00	996.15	0.301	0.046*	0.113
IL-15	568.20	397.70	0.012*	530.70	451.50	0.161	0.241	0.742
IL-17a	1089.40	730.80	0.001*	905.25	753.80	0.749	0.119	0.749
RANTES	6.70	5.40	0.018*	6.00	5.00	0.416	0.284	0.667
IP-10	59.00	142.60	0.025*	49.25	174.50	0.012*	0.987	0.281
MCP-1	106.30	80.00	0.090	70.65	77.85	0.427	0.102	0.686
MIP-1 α	1.20	0.70	<0.001*	1.15	0.65	0.007*	0.348	0.865
MIP-1 β	13.70	20.30	0.239	11.75	12.80	0.173	0.100	0.345
Eotaxin	685.50	695.60	0.450	572.45	807.30	0.007*	0.349	0.078
<i>Anti-inflammatory</i>								
IL-4	0.80	0.40	<0.001*	0.85	0.30	0.018*	0.357	0.832
IL-10	13.90	12.30	0.090	11.90	8.95	0.182	0.172	0.123
IL-13	101.70	101.50	0.274	106.50	96.10	0.168	0.761	0.361

^{1,2}: Values expressed as median; p-value^a: Wilcoxon's rank-sum test before and 24 hours after oropharyngeal administration of colostrum; p-value^b: Wilcoxon's rank-sum test before and 24 hours after oropharyngeal administration of sterile water; p-value^c: Mann-Whitney's U test for comparison between groups before

oropharyngeal administration of colostrum and sterile water; p-value^d: Mann-Whitney's U test for comparison between groups 24 hours after oropharyngeal administration of colostrum and sterile water.

4. Discussion

This study is, according to our current knowledge, the first to assess the urinary dosage of several inflammatory biomarkers in VLBW infants submitted to oropharyngeal administration of colostrum and demonstrated a decrease in urinary dosage of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-9, IL-15, IL-17a and RANTES) what may be the result of an anti-inflammatory state due to immune therapy with colostrum.^{23, 27, 28} The occurrence of an anti-inflammatory and anti-oxidative state has been described as beneficial for the development and growth of VLBW infants, in addition to correlate with the decrease in cases of neonatal sepsis.²⁹⁻³¹ Nevertheless, it was not observed a reduction in the incidence of confirmed sepsis in the study group.

Neonatal sepsis is initiated by a pathogen and mediated by cytokines that alter the immune homeostasis, anti-inflammatory properties and blood coagulation.^{4, 8, 32} The evolution of the disease and the clinical symptoms depend on a delicate and complex balance between pro- and anti-inflammatory factors and cytokines with multiple functions and effects on the immune system.^{1, 2, 4, 5, 8, 32-35}

Neonatal sepsis is a major challenge in NICU due to high prevalence and high morbidity-mortality.^{5, 36} The use of human milk in VLBW infants' nutrition has been described to be responsible for the protective effect against infections.^{11, 16, 23, 28, 31, 37} Therefore, it has been considered alternative methods of administration of human milk in VLBW infants, as oropharyngeal administration, due to immaturity and clinical instability, which delay the start and prevent the progression of enteral diet.^{9, 12, 13, 38}

Colostrum contains various bioactive components capable to act as the lymphoid tissues of oropharyngeal and gastrointestinal tract transforming the immune response of VLBW infants from inflammatory state to anti-inflammatory state.^{9, 23, 33, 39, 40}

Although this study did not demonstrate reduction in the incidence of sepsis in VLBW infants submitted to oropharyngeal administration of colostrum, it showed a reduction of urinary excretion of several pro-inflammatory cytokines. These cytokines play an important role in activation and intercellular communication and consequently, in neonatal sepsis and have been studied as markers for early diagnosis.^{27, 29, 30, 36, 37, 41, 42}

TNF- α and IFN- γ are among the most involved cytokines in the innate response of Th-1 type, particularly, pro-inflammatory with an almost immediate rise after tissue injury caused by pathogens.⁴³ TNF- α is a cytokine produced by macrophages and the biomarker released more rapidly into the bloodstream, being responsible for pyrogenesis, tissue injury by necrosis and vasodilation during septic shock.⁷ It is also related to the severity of the infection in VLBW infants.^{7, 44} Trying to counterbalance the inflammatory activity caused by TNF- α , colostrum contains the receptor R1 (TNF-R1) responsible for the inhibition of inflammatory and deleterious action of TNF- α , then the likely reduction of this cytokine in the group that received oropharyngeal administration of colostrum.²¹ IFN- γ is also released during the acute phase of inflammation by natural killer cells causing cell death.⁴⁵

IL-8, one of the chemokines that dropped after oropharyngeal administration of colostrum, is typically released after bacterial injury and is responsible for the attraction and neutrophil degranulation.^{43, 46, 47} According to current literature, it is considered a powerful chemokine and is associated with the prodromes of inflammation of the intestinal mucosa, specially in cases of necrotizing enterocolitis.^{48, 49} In experimental studies, colostrum was responsible for the suppression of IL-8 in epithelial cells of mucous, specially, immature cells.²⁰

RANTES is another chemokine that suffered a significant reduction in this study. It is responsible for the attraction of T-cells of large toxicity to the site of injury (T-cells -natural killer) besides stimulating the production of IgE and IgG.^{7, 50} However, its inflammatory action is still very little researched in neonatal period.

IL-9 is an interleukin associated with allergic diseases.⁵¹ It is also part of the Th-2 type response and can act as T-cells growth factor and mast cells.⁸ There are only very few studies in newborns to clarify its real function in cases of sepsis.⁴⁴

IL-17a is part of a recently discovered family (family 17 of interleukin with response Th17) with pro-inflammatory properties capable of increasing TNF- α production.⁵² It still does not have a specific role in sepsis during neonatal period.

IL-15, cytokine of IL-2 family, with cytolytic activity through the activation of natural-killer cells, is still little explored in neonatal period as biomarker of early or late onset sepsis.⁵¹

It is important to note that among 13 highly significant urinary markers in the study group, six also presented significance difference in the control group, except Eotaxin protein, which was only significant in the control group with increased levels. The significant difference of these six markers (IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IP-10 e MIP-1 α) suggests a probable association with immunological development of the infants, what could mean an expected reduction in the cytokines levels. However, the significance increase of Eotaxin in control group may be due to pulmonary immaturity without anti-inflammatory activity of colostrum therapy. It has also been described that many premature infants develop eosinophilia and abnormalities in eosinophils trafficking during the first period of postnatal life, and this can be explained by the ability of these eosinophils transigrate in vitro to chemotactic stimuli imitating bacterial infections or allergic inflammations in vivo.^{51, 53}

Currently, in the literature, it has been sought a reliable biomarker for diagnosis of neonatal sepsis in VLBW infant admitted to NICU, but there are few studies correlating cytokines in

urine samples and inflammatory state.^{6, 26, 54} The use of urine samples is quite promising as it is a non-invasive method with low impact on the care of the VLBW infants admitted to NICU. Moreover, our hypothesis that the urinary inflammatory markers should be reduced in VLBW infants due to systemic anti-inflammatory action of colostrum therapy was demonstrated with success. We could demonstrate the removal of pro-inflammatory cytokine from plasma in the colostrum group in contrast to the high and continuous levels of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IFN- γ , in VLBW infants that received placebo. VLBW infants under therapy exclusively presented reduced levels of 7 pro-inflammatory cytokines, which is corroborated by an investigation that demonstrated that pro-inflammatory cytokine levels in the urine of sepsis survivors appear to be related to levels of pro-inflammatory plasma cytokines.^{6, 25, 26, 54} Although this study can be considered as a pioneer in the use of urinary biomarkers to demonstrate the beneficial effect of colostrum's oropharyngeal administration, it still has some limitations due to the reduced number of participants, which can be extended to better understand its protective function in VLBW infants.

In conclusion, this study demonstrated that oropharyngeal administration promoted an anti-inflammatory state, characterized by a reduction of pro-inflammatory cytokines, which can contribute to the reduction of neonatal sepsis incidence.

5. References

1. Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60(2):367-89.
2. Chauhan N, Tiwari S, Jain U. Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview. *Microb Pathog.* 2017;107:234-42.
3. Ng PC, Lam HS. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: cytokines and beyond. *Clin Perinatol.* 2010;37(3):599-610.
4. Mussap M, Noto A, Cibecchini F, Fanos V. The importance of biomarkers in neonatology. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2013;18(1):56-64.
5. Bhandari V. Effective Biomarkers for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2014;3(3):234-45.
6. Sugitharini V, Prema A, Berla Thangam E. Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. *Inflamm Res.* 2013;62(12):1025-34.
7. Wynn JL, Wong HR. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. *Clin Perinatol.* 2010;37(2):439-79.
8. Machado JR, Soave DF, da Silva MV, de Menezes LB, Etchebehere RM, Monteiro ML, et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:269681.
9. Rodriguez NA, Meier PP, Groer MW, Zeller JM. Oropharyngeal administration of colostrum to extremely low birth weight infants: theoretical perspectives. *J Perinatol.* 2009;29(1):1-7.
10. Baumgartel KL, Groer MW, Cohen SM, Ren D, Spatz DL, Conley YP. Effect of Promoter Polymorphisms on Cytokine Concentration in Preterm Breast Milk and Subsequent Infant Outcomes. *J Hum Lact.* 2016;32(3):425-37.
11. Gephart SM, Weller M. Colostrum as oral immune therapy to promote neonatal health. *Adv Neonatal Care.* 2014;14(1):44-51.

12. Patel AB, Shaikh S. Efficacy of breast milk gastric lavage in preterm neonates. *Indian Pediatr.* 2007;44(3):199-203.
13. Pletsch D, Ulrich C, Angelini M, Fernandes G, Lee DS. Mothers' "liquid gold": a quality improvement initiative to support early colostrum delivery via oral immune therapy (OIT) to premature and critically ill newborns. *Nurs Leadersh (Tor Ont).* 2013;26 Spec No 2013:34-42.
14. Rodriguez NA, Meier PP, Groer MW, Zeller JM, Engstrom JL, Fogg L. A pilot study to determine the safety and feasibility of oropharyngeal administration of own mother's colostrum to extremely low-birth-weight infants. *Adv Neonatal Care.* 2010;10(4):206-12.
15. Sohn K, Kalanetra KM, Mills DA, Underwood MA. Buccal administration of human colostrum: impact on the oral microbiota of premature infants. *J Perinatol.* 2016;36(2):106-11.
16. Furman L, Taylor G, Minich N, Hack M. The effect of maternal milk on neonatal morbidity of very low-birth-weight infants. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2003;157(1):66-71.
17. He Y, Lawlor NT, Newburg DS. Human Milk Components Modulate Toll-Like Receptor-Mediated Inflammation. *Adv Nutr.* 2016;7(1):102-11.
18. Kumar H, du Toit E, Kulkarni A, Aakko J, Linderborg KM, Zhang Y, et al. Distinct Patterns in Human Milk Microbiota and Fatty Acid Profiles Across Specific Geographic Locations. *Front Microbiol.* 2016;7:1619.
19. Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2007;37(1):7-36.
20. Lee J, Kim HS, Jung YH, Choi KY, Shin SH, Kim EK, et al. Oropharyngeal colostrum administration in extremely premature infants: an RCT. *Pediatrics.* 2015;135(2):e357-66.
21. Lewis ED, Richard C, Larsen BM, Field CJ. The Importance of Human Milk for Immunity in Preterm Infants. *Clin Perinatol.* 2017;44(1):23-47.

22. Patel AL, Johnson TJ, Engstrom JL, Fogg LF, Jegier BJ, Bigger HR, et al. Impact of early human milk on sepsis and health-care costs in very low birth weight infants. *J Perinatol*. 2013;33(7):514-9.
23. Rodriguez NA, Vento M, Claud EC, Wang CE, Caplan MS. Oropharyngeal administration of mother's colostrum, health outcomes of premature infants: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2015;16:453.
24. Seigel JK, Tanaka DT, Goldberg RN, Smith PB, Cotten CM, Bidegain M. Economic impact of human milk on medical charges of extremely low birth weight infants. *Breastfeed Med*. 2014;9(4):233-4.
25. Graziani G, Bordone G, Bellato V, Finazzi S, Angelini C, Badalamenti S, et al. Role of the kidney in plasma cytokine removal in sepsis syndrome: a pilot study. *J Nephrol*. 2006;19(2):176-82.
26. Sylvester KG, Ling XB, Liu GY, Kastenber ZJ, Ji J, Hu Z, et al. Urine protein biomarkers for the diagnosis and prognosis of necrotizing enterocolitis in infants. *J Pediatr*. 2014;164(3):607-12 e1-7.
27. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev*. 2015;91(11):629-35.
28. Garofalo R. Cytokines in human milk. *J Pediatr*. 2010;156(2 Suppl):S36-40.
29. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):379-90.
30. Denning TW, Bhatia AM, Kane AF, Patel RM, Denning PW. Pathogenesis of NEC: Role of the innate and adaptive immune response. *Semin Perinatol*. 2017;41(1):15-28.
31. Gephart SM, Hanson CK. Preventing necrotizing enterocolitis with standardized feeding protocols: not only possible, but imperative. *Adv Neonatal Care*. 2013;13(1):48-54.

32. Ludwig KR, Hummon AB. Mass spectrometry for the discovery of biomarkers of sepsis. *Mol Biosyst.* 2017;13(4):648-64.
33. Bhatia J. Human milk and the premature infant. *Ann Nutr Metab.* 2013;62 Suppl 3:8-14.
34. Fattah MA, Omer AF, Asaif S, Manlulu R, Karar T, Ahmed A, et al. Utility of cytokine, adhesion molecule and acute phase proteins in early diagnosis of neonatal sepsis. *J Nat Sci Biol Med.* 2017;8(1):32-9.
35. Ng PC, Ma TP, Lam HS. The use of laboratory biomarkers for surveillance, diagnosis and prediction of clinical outcomes in neonatal sepsis and necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015;100(5):F448-52.
36. Andrade ME, Araujo RS, de Barros PA, Soares AD, Abrantes FA, Generoso Sde V, et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. *Clin Nutr.* 2015;34(6):1080-7.
37. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60(1):49-74.
38. Seigel JK, Smith PB, Ashley PL, Cotten CM, Herbert CC, King BA, et al. Early administration of oropharyngeal colostrum to extremely low birth weight infants. *Breastfeed Med.* 2013;8(6):491-5.
39. Mehta R, Petrova A. Biologically active breast milk proteins in association with very preterm delivery and stage of lactation. *J Perinatol.* 2011;31(1):58-62.
40. Mehta R, Petrova A. Very preterm gestation and breastmilk cytokine content during the first month of lactation. *Breastfeed Med.* 2011;6(1):21-4.
41. Collado MC, Santaella M, Mira-Pascual L, Martinez-Arias E, Khodayar-Pardo P, Ros G, et al. Longitudinal Study of Cytokine Expression, Lipid Profile and Neuronal Growth

- Factors in Human Breast Milk from Term and Preterm Deliveries. *Nutrients*. 2015;7(10):8577-91.
42. Gilfillan M, Bhandari V. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: Clinical practice guidelines. *Early Hum Dev*. 2017;105:25-33.
 43. Sharma D, Farahbakhsh N, Shastri S, Sharma P. Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017:1-37.
 44. Ye Q, Du LZ, Shao WX, Shang SQ. Utility of cytokines to predict neonatal sepsis. *Pediatr Res*. 2017;81(4):616-21.
 45. Trend S, Strunk T, Lloyd ML, Kok CH, Metcalfe J, Geddes DT, et al. Levels of innate immune factors in preterm and term mothers' breast milk during the 1st month postpartum. *Br J Nutr*. 2016;115(7):1178-93.
 46. Barrera GJ, Sanchez G. Cytokine modulation (IL-6, IL-8, IL-10) by human breast milk lipids on intestinal epithelial cells (Caco-2). *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016;29(15):2505-12.
 47. Segura-Cervantes E, Mancilla-Ramirez J, Gonzalez-Canudas J, Alba E, Santillan-Ballesteros R, Morales-Barquet D, et al. Inflammatory Response in Preterm and Very Preterm Newborns with Sepsis. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:6740827.
 48. Nguyen DN, Sangild PT, Ostergaard MV, Bering SB, Chatterton DE. Transforming growth factor-beta2 and endotoxin interact to regulate homeostasis via interleukin-8 levels in the immature intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;307(7):G689-99.
 49. Zhou M, Cheng S, Yu J, Lu Q. Interleukin-8 for diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127170.
 50. Stojewska M, Wasek-Buko M, Jakub B, Wisniewska-Ulfig D, Goleniowska-Krol A, Szymanska A, et al. Evaluation of serum chemokine RANTES concentration as a biomarker in

the diagnosis of early-onset severe infections in neonates. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016;70:272-9.

51. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):984-1010.
52. Cross AS. IL-18/IL-1/IL-17A axis: A novel therapeutic target for neonatal sepsis? *Cytokine*. 2016;86:1-3.
53. Moshfegh A, Lothian C, Hallden G, Marchini G, Lagercrantz H, Lundahl J. Neonatal eosinophils possess efficient Eotaxin/IL-5- and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced transmigration in vitro. *Pediatr Res*. 2005;58(1):138-42.
54. Pynn JM, Parravicini E, Saiman L, Bateman DA, Barasch JM, Lorenz JM. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin: potential biomarker for late-onset sepsis. *Pediatr Res*. 2015;78(1):76-81.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, V. O. S.; FERREIRA, D. M. L. M. Uso do colostro na alimentação do recém-nascido pré-termo: vantagens e dificuldades. In: Sociedade Brasileira de Pediatria; PROCIANROY, R. S.; LEONE, C. R. (Org.). **PRORN Programa de Atualização em Neonatologia**. Ciclo 13. Porto Alegre: Artmed Panamericana, Sistema de Educação Continuada a Distância, v.4, p. 9-27, 201
- AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 138, n. 4, p. 984-1010, Oct 2016.
- AKDIS, M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 3, p. 701-21 e1-70, Mar 2011.
- ANDRADE, M. E. et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clin Nutr**, v. 34, n. 6, p. 1080-7, Dec 2015.
- BARRERA, G. J.; SANCHEZ, G. Cytokine modulation (IL-6, IL-8, IL-10) by human breast milk lipids on intestinal epithelial cells (Caco-2). **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 29, n. 15, p. 2505-12, 2016.
- BAUMGARTEL, K. L. et al. Effect of Promoter Polymorphisms on Cytokine Concentration in Preterm Breast Milk and Subsequent Infant Outcomes. **J Hum Lact**, v. 32, n. 3, p. 425-37, Aug 2016.
- BHANDARI, V. Effective Biomarkers for Diagnosis of Neonatal Sepsis. **J Pediatric Infect Dis Soc**, v. 3, n. 3, p. 234-45, Sep 2014.
- BHATIA, J. Human milk and the premature infant. **Ann Nutr Metab**, v. 62 Suppl 3, p. 8-14, 2013.

CAMACHO-GONZALEZ, A.; SPEARMAN, P. W.; STOLL, B. J. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. **Pediatr Clin North Am**, v. 60, n. 2, p. 367-89, Apr 2013.

CARVALHO, C. G. et al. Plasma cytokine levels fall in preterm newborn infants on nasal CPAP with early respiratory distress. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120486, 2015.

CASTELLOTE, C. et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. **J Nutr**, v. 141, n. 6, p. 1181-7, Jun 2011.

CHAUHAN, N.; TIWARI, S.; JAIN, U. Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview. **Microb Pathog**, v. 107, p. 234-242, Apr 01 2017.

COLAIZY, T. T. et al. Impact of Optimized Breastfeeding on the Costs of Necrotizing Enterocolitis in Extremely Low Birthweight Infants. **J Pediatr**, v. 175, p. 100-105 e2, Aug 2016.

DENNING, T. W. et al. Pathogenesis of NEC: Role of the innate and adaptive immune response. **Semin Perinatol**, v. 41, n. 1, p. 15-28, Feb 2017.

FATTAH, M. A. et al. Utility of cytokine, adhesion molecule and acute phase proteins in early diagnosis of neonatal sepsis. **J Nat Sci Biol Med**, v. 8, n. 1, p. 32-39, Jan-Jun 2017.

GAROFALO, R. Cytokines in human milk. **J Pediatr**, v. 156, n. 2 Suppl, p. S36-40, Feb 2010.

GEPHART, S. M.; HANSON, C. K. Preventing necrotizing enterocolitis with standardized feeding protocols: not only possible, but imperative. **Adv Neonatal Care**, v. 13, n. 1, p. 48-54, Feb 2013.

GEPHART, S. M.; WELLER, M. Colostrum as oral immune therapy to promote neonatal health. **Adv Neonatal Care**, v. 14, n. 1, p. 44-51, Feb 2014.

- GILFILLAN, M.; BHANDARI, V. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: Clinical practice guidelines. **Early Hum Dev**, v. 105, p. 25-33, Feb 2017.
- GLASS, H. C. et al. Outcomes for extremely premature infants. **Anesth Analg**, v. 120, n. 6, p. 1337-51, Jun 2015.
- GOMEZ-GALLEGO, C. et al. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 21, n. 6, p. 400-405, Dec 2016.
- GRAZIANI, G. et al. Role of the kidney in plasma cytokine removal in sepsis syndrome: a pilot study. **J Nephrol**, v. 19, n. 2, p. 176-82, Mar-Apr 2006.
- HEDEGAARD, S. S.; WISBORG, K.; HVAS, A. M. Diagnostic utility of biomarkers for neonatal sepsis--a systematic review. **Infect Dis (Lond)**, v. 47, n. 3, p. 117-24, Mar 2015.
- HODZIC, Z.; BOLOCK, A. M.; GOOD, M. The Role of Mucosal Immunity in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis. **Front Pediatr**, v. 5, p. 40, 2017.
- HUANG, F. K. et al. Bird's Eye View of a Neonatologist: Clinical Approach to Emergency Neonatal Infection. **Pediatr Neonatol**, v. 57, n. 3, p. 167-73, Jun 2016.
- KELLY, D.; COUTTS, A. G. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. **Proc Nutr Soc**, v. 59, n. 2, p. 177-85, May 2000.
- KUMAR, H. et al. Distinct Patterns in Human Milk Microbiota and Fatty Acid Profiles Across Specific Geographic Locations. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1619, 2016.
- LAWRENCE, R. M.; PANE, C. A. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**, v. 37, n. 1, p. 7-36, Jan 2007.
- LEE, J. et al. Oropharyngeal colostrum administration in extremely premature infants: an RCT. **Pediatrics**, v. 135, n. 2, p. e357-66, Feb 2015.

LEVY, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 5, p. 379-90, May 2007.

LEWIS, E. D. et al. The Importance of Human Milk for Immunity in Preterm Infants. **Clin Perinatol**, v. 44, n. 1, p. 23-47, Mar 2017.

LUSYATI, S. et al. Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. **J Neonatal Perinatal Med**, v. 6, n. 2, p. 153-63, 2013.

MACHADO, J. R. et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 269681, 2014.

MUSSAP, M. et al. The importance of biomarkers in neonatology. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 18, n. 1, p. 56-64, Feb 2013.

NG, P. C.; LAM, H. S. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: cytokines and beyond. **Clin Perinatol**, v. 37, n. 3, p. 599-610, Sep 2010.

NG, P. C.; MA, T. P.; LAM, H. S. The use of laboratory biomarkers for surveillance, diagnosis and prediction of clinical outcomes in neonatal sepsis and necrotising enterocolitis. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 100, n. 5, p. F448-52, Sep 2015.

NGUYEN, D. N. et al. Transforming growth factor-beta2 and endotoxin interact to regulate homeostasis via interleukin-8 levels in the immature intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 307, n. 7, p. G689-99, Oct 01 2014.

PATEL, A. B.; SHAIKH, S. Efficacy of breast milk gastric lavage in preterm neonates. **Indian Pediatr**, v. 44, n. 3, p. 199-203, Mar 2007.

PATEL, A. L. et al. Impact of early human milk on sepsis and health-care costs in very low birth weight infants. **J Perinatol**, v. 33, n. 7, p. 514-9, Jul 2013.

PATEL, R. M.; DENNING, P. W. Intestinal microbiota and its relationship with necrotizing enterocolitis. **Pediatr Res**, v. 78, n. 3, p. 232-8, Sep 2015.

PLETSCH, D. et al. Mothers' "liquid gold": a quality improvement initiative to support early colostrum delivery via oral immune therapy (OIT) to premature and critically ill newborns. **Nurs Leadersh (Tor Ont)**, v. 26 Spec No 2013, p. 34-42, 2013.

POLIN, R. A.; RANDIS, T. M. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis. **Genome Med**, v. 2, n. 9, p. 58, Sep 06 2010.

PRIBYLOVA, J. et al. Colostrum of healthy mothers contains broad spectrum of secretory IgA autoantibodies. **J Clin Immunol**, v. 32, n. 6, p. 1372-80, Dec 2012.

PYNN, J. M. et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin: potential biomarker for late-onset sepsis. **Pediatr Res**, v. 78, n. 1, p. 76-81, Jul 2015.

RODRIGUEZ, N. A.; CAPLAN, M. S. Oropharyngeal administration of mother's milk to prevent necrotizing enterocolitis in extremely low-birth-weight infants: theoretical perspectives. **J Perinat Neonatal Nurs**, v. 29, n. 1, p. 81-90, Jan-Mar 2015.

RODRIGUEZ, N. A. et al. Oropharyngeal administration of colostrum to extremely low birth weight infants: theoretical perspectives. **J Perinatol**, v. 29, n. 1, p. 1-7, Jan 2009.

RODRIGUEZ, N. A. et al. A pilot study to determine the safety and feasibility of oropharyngeal administration of own mother's colostrum to extremely low-birth-weight infants. **Adv Neonatal Care**, v. 10, n. 4, p. 206-12, Aug 2010.

RODRIGUEZ, N. A. et al. Oropharyngeal administration of mother's colostrum, health outcomes of premature infants: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 16, p. 453, Oct 12 2015.

SEGURA-CERVANTES, E. et al. Inflammatory Response in Preterm and Very Preterm Newborns with Sepsis. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 6740827, 2016.

SEIGEL, J. K. et al. Early administration of oropharyngeal colostrum to extremely low birth weight infants. **Breastfeed Med**, v. 8, n. 6, p. 491-5, Dec 2013.

SEIGEL, J. K. et al. Economic impact of human milk on medical charges of extremely low birth weight infants. **Breastfeed Med**, v. 9, n. 4, p. 233-4, May 2014.

SHARMA, D. et al. Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. **J Matern Fetal Neonatal Med**, p. 1-37, Apr 20 2017.

SITARIK, A. R. et al. Breast Milk TGFbeta is Associated with Neonatal Gut Microbial Composition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, Mar 30 2017.

SOHN, K. et al. Buccal administration of human colostrum: impact on the oral microbiota of premature infants. **J Perinatol**, v. 36, n. 2, p. 106-11, Feb 2016.

STOJEWSKA, M. et al. Evaluation of serum chemokine RANTES concentration as a biomarker in the diagnosis of early-onset severe infections in neonates. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 70, p. 272-9, Apr 06 2016.

SUGITHARINI, V. et al. TLR-mediated inflammatory response to neonatal pathogens and co-infection in neonatal immune cells. **Cytokine**, v. 69, n. 2, p. 211-7, Oct 2014.

SUGITHARINI, V.; PREMA, A.; BERLA THANGAM, E. Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. **Inflamm Res**, v. 62, n. 12, p. 1025-34, Dec 2013.

SUGUNA NARASIMHULU, S. et al. Usefulness of urinary immune biomarkers in the evaluation of neonatal sepsis: a pilot project. **Clin Pediatr (Phila)**, v. 52, n. 6, p. 520-6, Jun 2013.

SYLVESTER, K. G. et al. Urine protein biomarkers for the diagnosis and prognosis of necrotizing enterocolitis in infants. **J Pediatr**, v. 164, n. 3, p. 607-12 e1-7, Mar 2014.

TREND, S. et al. Levels of innate immune factors in preterm and term mothers' breast milk during the 1st month postpartum. **Br J Nutr**, v. 115, n. 7, p. 1178-93, Apr 14 2016.

TURFKRUYER, M.; VERHASSELT, V. Breast milk and its impact on maturation of the neonatal immune system. **Curr Opin Infect Dis**, v. 28, n. 3, p. 199-206, Jun 2015.

UNDERWOOD, M. A. et al. Human milk oligosaccharides in premature infants: absorption, excretion, and influence on the intestinal microbiota. **Pediatr Res**, v. 78, n. 6, p. 670-7, Dec 2015.

UNDERWOOD, M. A. et al. Prebiotic oligosaccharides in premature infants. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 58, n. 3, p. 352-60, Mar 2014.

WALKER, W. A.; IYENGAR, R. S. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. **Pediatr Res**, v. 77, n. 1-2, p. 220-8, Jan 2015.

WYNN, J. L.; WONG, H. R. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. **Clin Perinatol**, v. 37, n. 2, p. 439-79, Jun 2010.

YE, Q. et al. Utility of cytokines to predict neonatal sepsis. **Pediatr Res**, v. 81, n. 4, p. 616-621, Apr 2017.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu filho (a) está sendo convidado para participar da pesquisa **“Administração Orofaríngea de Colostro e a Prevenção de Infecções em Recém-Nascidos Pré-Termo de Muito Baixo Peso ao Nascer”**, que será realizada no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob a responsabilidade dos pesquisadores Prof^ª Dr^a Vânia Olivetti Steffen Abdallah e Dra. Daniela Marques de L. M. Ferreira, médicas do Serviço de Neonatologia desta instituição.

Já está bem estabelecido que a alimentação com leite materno protege os recém-nascidos prematuros contra infecções além de muitos outros benefícios. Entretanto, a imaturidade e as condições de saúde destes bebês logo após o nascimento impedem que o leite materno seja iniciado ainda nas primeiras horas de vida.

Nesta pesquisa nós estamos buscando comprovar se a administração do leite materno em pequena quantidade no cantinho da boca do bebê, nas primeiras 48 horas de vida, também poderia ter este efeito protetor contra infecções.

Quem está entrando em contato com você é um dos pesquisadores responsáveis ou membro da equipe para esclarecer dúvidas sobre a pesquisa e obter o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Com a participação de seu (sua) filho (a) na pesquisa ele (a) será sorteado para receber ou não o leite materno no cantinho da boca a partir das primeiras 48 horas de vida. Você precisará colaborar retirando o volume mínimo de 4,8 mL de leite neste período. Será colhido um pouquinho de urina em 3 momentos: nas primeiras 48 horas de vida, 12 a 24 horas após e 14 dias após.

Em nenhum momento seu (sua) filho (a) será identificado (a). Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a identidade de seu (sua) filho (a) será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Não há riscos aumentados para seu (sua) filho (a) com a participação nesta pesquisa. Os riscos com a administração do leite materno no cantinho da boca são mínimos, especialmente porque será realizado por profissional médico ou de enfermagem habilitado e treinado para o cuidado com o bebê. O procedimento será imediatamente interrompido ao sinal de qualquer alteração clínica. Nenhum dos procedimentos realizados trará qualquer desconforto para o seu bebê.

Os benefícios serão a comprovação de que o leite materno se utilizado precocemente, mesmo antes do bebê poder se alimentar, protege o recém-nascido prematuro contra infecções, diminui a gravidade e o tempo de internação destes bebês.

Você é livre para interromper a participação de seu filho (a) a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com a senhora.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa a senhora poderá entrar em contato com:

Pesquisadores: Daniela Marques de L. M. Ferreira ou Profª Drª Vânia Olivetti Steffen Abdallah.

Av. Pará 1720 Bairro Umuarama - Hospital de Clínicas, Serviço de Neonatologia Telefones: 32182112 / 32182454

CEP/UFU: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J, Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394531

Uberlândia, de 20.....

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito que meu filho / minha filha participe do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecida.

Responsável pelo Participante da pesquisa

APÊNDICE B – INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS**Grupo de estudo:** () Colostro

() Placebo

() LHB

1. DADOS MATERNOS	
Idade	Estado Civil
Escolaridade	Paridade
Número de consultas de pré-natal	Tipo de parto
Intercorrências na gestação	Fatores de risco / infecção periparto

2. DADOS DO RECÉM-NASCIDO	
Prontuário	Sexo: () M () F
Data e hora do nascimento	Peso de Nascimento
Apgar: 1' 5'	Idade gestacional
Classificação	Corticóide antenatal
Características nutricionais	
Idade de início da dieta enteral	Idade para alcançar 100 e 150 mL/Kg/dia de dieta enteral
Menor peso (g) e idade do menor peso	Peso com 36 semanas e na alta
Administração orofaríngea de colostro	
Idade de início	Intercorrências durante administração

Fatores de risco para sepse tardia	
Dias de nutrição parenteral	Dias cateter umbelical
Dias PICC	Dias outro acesso venoso central
Uso de bloqueadores H2	Uso de antibióticos
Uso de cefalosporina 3ª ou 4ª geração	Uso de corticoide pós natal
Sepse tardia	
Idade	
Hemocultura positiva	
ATB	
Enterocolite necrosante	
Idade	
Tempo de jejum	
ATB	
Tempo de internação	Idade cronológica e corrigida na alta
Diagnósticos na alta	

3. EXAMES LABORATORIAIS - urina		
	Antes do tratamento	24 horas após
TNF- α		
IFN- γ		
IL-1b		
IL-1ra		
IL-2		
IL-5		
IL-6		
IL-7		
IL-8		
IL-9		
IL-12p70		
IL-15		
IL-17a		
RANTES		
IP-10		
MCP-1		
MIP-1 α		
MIP-1 β		
Eotaxin		
IL-4		
IL-10		
IL-13		

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 UFU Comitê de Ética em Pesquisa	UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA/MG	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Administração orofaríngea de colostro e prevenção de infecções em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer.		
Pesquisador: VÂNIA OLIVETTI STEFFEN ABDALLAH		
Área Temática:		
Versão: 3		
CAAE: 09199613.9.0000.5152		
Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 333.886		
Data da Relatoria: 19/07/2013		

ANEXO 2 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

A manuscript number has been assigned to YCLNU-D-17-00629

1 mensagem

Clinical Nutrition <eesserver@eesmail.elsevier.com>

17 de julho de 2017 11:44

Responder a: Clinical Nutrition <espenjournals@espen.org>

Para: m.carolinamartins@gmail.com, m_carolinamartins@yahoo.com.br

Ms. Ref. No.: YCLNU-D-17-00629

Title: "Anti-inflammatory role of colostrum's oropharyngeal administration in very low birth weight infants"

Clinical Nutrition

Dear Maria Carolina,

Your submission "Anti-inflammatory role of colostrum's oropharyngeal administration in very low birth weight infants" has been assigned manuscript number YCLNU-D-17-00629.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <https://ees.elsevier.com/yclnu/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to Clinical Nutrition.

Kind regards,

Nicolaas E. Deutz, MD, PhD
Editor-in-Chief
Clinical Nutrition

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:

http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

Conclusões Finais

A administração orofaríngea de colostro promoveu um estado anti-inflamatório, caracterizado por uma redução das citocinas pró-inflamatórias o que pode contribuir para reduzir a incidência de sepse neonatal.

- ✓ A administração orofaríngea de colostro em RNPT MBP mostrou-se segura;
- ✓ Foi possível notar diferença significativa de 7 biomarcadores urinários (TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-9, IL-15, IL-17a e RANTES) dos RNPT MBP que receberam administração orofaríngea;
- ✓ Não houve diferença estatística sobre a incidência de sepse neonatal.