



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
BÁSICAS E APLICADAS

GABRIELLA REGINA BORGES GADENZ

Efeito do TNF- α na atividade funcional de fagócitos do colostro humano de mães com
excesso de peso.

Barra do Garças, MT

2021

GABRIELLA REGINA BORGES GADENZ

Efeito do TNF- α na atividade funcional de fagócitos do colostro humano de mães com excesso de peso.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário do Araguaia/UFMT, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adenilda Cristina Honorio França.

Coorientadora: Dr.^a Mahmi Fujimori.

Barra do Garças, MT

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

B732e Gadenz, Gabriella Regina Borges.
Efeito do TNF- na atividade funcional de fagócitos do colostro humano de mães com excesso de peso. / Gabriella Regina Borges Gadenz. -- 2021
48 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Adenilda Cristina Honorio França.

Co-orientadora: Mahmi Fujimori.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas, Barra do Garças, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Leite Materno. 2. Imunomodulação Celular. 3. Obesidade Materna. 4. Componentes Bioativos. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeito da TNF-alfa na Atividade Funcional de Fagócitos do Colostro Humano de Mães com Excesso de Peso

AUTOR (A): MESTRANDO (A) **GABRIELLA REGINA BORGES GADENZ**

Dissertação defendida e aprovada em **17 de Novembro** de **2021**.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. **Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França** (Presidente Banca)

INSTITUIÇÃO: CUA/UFMT

2. **Profa. Dra. Maráisa Borges Delmut** (Membro Interna)

INSTITUIÇÃO: CUA/UFMT

3. **Profa. Dra. Aline do Carmo França Botelho** (Membro Externa)

INSTITUIÇÃO: UNEMAT/MT

Barra do Garças, 17 de novembro de 2021



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **FABRICIO HENRIQUE OLIVEIRA SILVA, Técnico Administrativo em Educação do PPG em Imunol. e Parasit. Bás. Aplicadas - ICBS / CUA - UFMT**, em 31/01/2022, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **ALINE DO CARMO FRANCA BOTELHO, Usuário Externo**, em 31/01/2022, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **ADENILDA CRISTINA HONORIO FRANCA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 02/02/2022, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **MARAISA DELMUT BORGES, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 10/02/2022, às 18:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

<https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&ik=12039eb844&attid=0.1&permmsgid=msg-f:1724471580324250025&th=...> 1/2

12/02/2022 13:45

<https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&ik=12039eb844&attid=0.1&permmsgid=msg-f:172447...>



QRCode

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o

Assinatura código verificador **4352895** e o código CRC **3EC7A151**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à toda minha família, que sempre esteve ao meu lado dando o suporte necessário em todos os momentos percorridos durante a minha graduação e durante a pós. Obrigada pelo apoio, e incentivo a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha família, em especial à minha mãe Rozimeire (que inclusive, no dia de hoje em que estou escrevendo esses agradecimentos (05/11), está de aniversário junto com minha avó Dina. Feliz aniversário, espero que essa nossa conquista seja motivo de orgulho para vocês duas), ao meu pai Fernando e ao meu padrasto Fagner (que desde que eu era pequenininha esteve presente na minha criação). Juntos, vocês batalharam para que eu sempre tivesse uma boa educação e fosse atrás daquilo que eu acredito. À minha avó materna, Dina, também aniversariante e aos meus avós paternos Arduíno e Ignês. Amor de avós não se explica né?! Aos meus irmãos Felipe e Gustavo pelo companheirismo, espero ser um exemplo para vocês se espelharem no decorrer da vida. Aos meus tios, tias, primos e primas que sempre me deram todo o apoio e amor do mundo. Amo vocês, a saudade é sempre grande.

Não poderia deixar de agradecer meu namorado Éverton que esteve comigo acompanhando de perto todos os sufocos e noites sem dormir. Obrigada pelo companheirismo, pela amizade, parceria, conselhos, e em especial, pela paciência, te amo.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado durante esses dois anos e me ouviram falar (e muito!) dessa pesquisa. Obrigada pelas risadas, pela parceria, pela ajuda e pelos conselhos. Essa caminhada seria bem mais difícil sem vocês por perto.

Aos colegas de mestrado por toda ajuda, seja no laboratório ou com dúvidas corriqueiras, obrigada pelas experiências compartilhadas, torço para que cada um de vocês conquiste seus sonhos. Sucesso para nós!

Por último, mas longe de ser o menos importante, ao pessoal dos Laboratórios de Imunologia da Relação Materno-Infantil e Cronoimunomodulação, em especial à minha orientadora Adenilda Cristina Honorio França, ao professor Eduardo Luzia França e à minha coorientadora Mahmi Fujimori. Sem dúvidas esse trabalho é nosso, o conhecimento que recebi de cada um de vocês é imensurável, graças a vocês, eu cresci e evolui muito nesse tempo. Admiro com todo o meu coração a paixão de vocês pela ciência e por ensinar. Mahmi em especial que se tornou uma super amiga e conselheira, estará pra sempre no meu coração e saiba que estou aqui para o que precisar sempre. Adrielle Ataídes que passou todos os sufocos de coleta de colostro comigo, desde pneu furado, à chuva, ruas de barro, atoleiro e fuga de cachorro (kkkk), você é fera e tem um sucesso enorme pela frente, foco. Letícia Damas por toda ajuda e risadas no láb, te admiro muito e enxergo todo o sucesso que te espera. Tem muita gente pra agradecer aqui, mas todos sabem o quanto os admiro e sou grata. Espero poder contribuir muito ainda com esse laboratório incrível que está repleto de talentos.

EPÍGRAFE

*“Kenzen'naru Tamashī wa,
Kenzen'naru Seishin to,
Kenzen'naru Nikutai ni Yadoru”*

Maka Albarn

RESUMO

A obesidade materna tem preocupado cientistas devido aos impactos maternos e fetais da inflamação crônica de baixo grau causada pelo excesso de tecido adiposo no organismo. Essa inflamação crônica influencia diretamente na gestação através da passagem de mediadores inflamatórios via placenta, resultando em alterações no desenvolvimento embrionário e fetal, e também no pós-parto, através da alteração dos componentes bioativos do colostro e do leite materno, o que pode ter efeitos importantes na defesa para o recém-nascido para vários micro-organismos patogênicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação pela citocina TNF- α da atividade funcional de fagócitos do colostro humano de mães lactantes com excesso de peso para a EPEC. Para isso, amostras de colostro foram coletadas de mães com sobrepeso e obesidade pré-gestacional e sem nenhuma outra comorbidade ou infecção prévia. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção das células mononucleares isoladas. Estas células foram incubadas com TNF- α e com EPEC para avaliar a análise de viabilidade celular, índice de fagocitose, índice microbicida e liberação de cálcio intracelular pelos fagócitos do colostro. A análise de viabilidade celular mostrou-se superior a 89% em todos os estados nutricionais. As células mononucleares foram capazes de fagocitar a EPEC mesmo sem estímulo, porém quando incubadas com o TNF- α , esse índice aumentou consideravelmente. Quanto ao índice microbicida, o estímulo com TNF- α mostrou facilitar a morte da bactéria no grupo obesidade. A análise de liberação de cálcio intracelular não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos e tratamento. Isso sugere que o processo de fagocitose nesse modelo de estudo não é dependente de cálcio intracelular, podendo depender de outros mecanismos ou receptores de superfície. É possível concluir que, o TNF- α apresenta-se como um possível modulador das células MN do colostro humano, facilitando a fagocitose no grupo de mães com excesso de peso e melhorando a resposta microbicida no grupo com obesidade, podendo se tornar um possível tratamento alternativo no futuro, melhorando a resposta imunológica e protegendo o recém-nascido através da amamentação.

Palavras-chave: Leite Materno. Imunomodulação celular. Obesidade Materna. Componentes bioativos.

ABSTRACT

Maternal obesity has concerned scientists because of the maternal and fetal impacts of chronic low-grade inflammation caused by excess adipose tissue in the body. This chronic inflammation directly influences pregnancy through the passage of inflammatory mediators via the placenta, resulting in alterations in embryonic and fetal development, and also in the postpartum period, through the alteration of the bioactive components of colostrum and breast milk, which can have important effects on the newborn's defense against various pathogenic microorganisms. Therefore, the aim of this work was to evaluate the modulation by the cytokine TNF- α of the functional activity of human colostrum phagocytes from overweight nursing mothers to EPEC. For this, colostrum samples were collected from mothers who were overweight and obese pregestationally and without any other previous comorbidity or infection. These samples were centrifuged to obtain the isolated mononuclear cells. These cells were incubated with TNF- α and with EPEC to evaluate the analysis of cell viability, phagocytosis index, microbicidal index and intracellular calcium release by colostrum phagocytes. The cell viability analysis was higher than 89% in all nutritional states. The mononuclear cells were able to phagocytize EPEC even without stimulus, but when incubated with TNF- α , this rate increased considerably. As for the microbicidal index, stimulation with TNF- α was shown to facilitate the death of the bacteria in the obesity group. The analysis of intracellular calcium release did not show statistical differences between the groups and treatment. This suggests that the phagocytosis process in this study model is not dependent on intracellular calcium, and may depend on other mechanisms or surface receptors. It is possible to conclude that, TNF- α presents itself as a possible modulator of human colostrum MN cells, facilitating phagocytosis in the overweight mothers group and improving the microbicidal response in the obese group, and may become a possible alternative treatment in the future, improving the immune response and protecting the newborn through breastfeeding.

Key words: Breast milk. Cellular Immunomodulation. Maternal Obesity. Bioactive Components.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos associados à obesidade e síndrome metabólica.	14
Figura 2 - Tecido adiposo e moléculas sintetizadas..	15
Figura 3 - Investigação sobre o Leite Humano: quadro conceitual.....	18
Figura 4 - Fagocitose e destruição intracelular de microrganismos	19
Figura 5 - Comparação da viabilidade celular de células mononucleares do colostro humano de acordo com o estado nutricional nos tratamentos espontâneo e estimulados com TNF- α . TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa.	30
Figura 6 - Comparação do índice de fagocitose de células mononucleares do colostro humano para Escherichia coli enteropatogênica de acordo com o estado nutricional no meio 199, tratados ou não com TNF- α e na presença e ausência de TMB-8. TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa.....	31
Figura 7 - Comparação do índice microbicida de células mononucleares do colostro humano para Escherichia coli enteropatogênica de acordo com o estado nutricional nos tratamentos espontâneo (meio 199), tratados ou não com TNF- α e na presença e ausência de TMB-8. TNF- α : Fator de Necrose Tumoral.	32
Figura 8 - Liberação de cálcio intracelular Ca ²⁺ pelas células MN do colostro humano de mães com peso normal, sobrepeso e obesidade tratadas ou não com TNF- α . A liberação está indicada como média geométrica da intensidade de fluorescência liberada pelas células. As células foram incubadas com marcador fluorescente Fluo-3 AM e analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA).	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI: Meio de cultivo “Brain Hearth Infusion”;

Ca²⁺: Íon Cálcio;

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa;

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva;

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica;

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica;

E. coli: *Escherichia coli*;

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio;

IFN- γ : Interferon gama;

IgA: Imunoglobulina do tipo A;

IgM: Imunoglobulina do tipo M;

IL-2: Interleucina 2;

IL-6: Interleucina 6;

IL-10: Interleucina 10;

IL-18: Interleucina 18;

IMC: Índice de Massa Corporal;

MN: mononuclear;

NK: Célula Natural Killer;

OMS: Organização Mundial da Saúde;

PBS: Tampão Fostato-salino;

PMN: polimorfonuclear;

SigA: Imunoglobulina do tipo A Secretória;

T CD4⁺: Célula T auxiliar com grupamento de diferenciação 4;

T CD8+: Célula T citotóxica com grupamento de diferenciação 8;

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

TMB-8: 8-(Diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa;

TLRs: Receptor de superfície do tipo Toll-like;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Obesidade e Gestação	13
1.2	Componentes Bioativos do Leite Materno	17
1.3	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	21
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo Geral.....	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	METODOLOGIA.....	24
3.1	Sujeitos.....	24
3.2	Desenho do Estudo	24
3.3	Critérios de Inclusão, Exclusão e Descontinuidade.....	24
3.4	Variáveis de Controle	25
3.4.1	Variáveis Independentes	25
3.4.2	Variáveis Dependentes.....	25
3.5	Métodos de Coleta e Avaliação	25
3.5.1	Estado Nutricional Pré-Gestacional	25
3.5.2	Estado Nutricional Gestacional.....	26
3.5.3	Obtenção dos Fagócitos Mononucleares do Colostro.....	26
3.5.4	Modulação dos Fagócitos Mononucleares do Colostro por TNF- α	26
3.5.5	Tratamento dos Fagócitos Mononucleares do Colostro com TMB-8.....	27
3.5.6	Linhagem e Cultura da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	27
3.5.7	Determinação da Viabilidade das Células Mononucleares do Colostro	27
3.5.8	Determinação da Fagocitose e do Índice Microbicida do Colostro	28
3.5.9	Liberação de Cálcio Intracelular (Ca^{2+}) determinada por fluorescência e Citometria de Fluxo	28
3.6	Análise Estatística.....	29
3.7	Aspectos Éticos.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS	38
	ANEXO A	44
	ANEXO B	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e Gestação

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade e o excesso de peso são definidos como uma condição anormal de acúmulo de gordura corporal que apresenta risco para a saúde do indivíduo. A OMS classifica a obesidade através do IMC (índice de massa corporal), onde o peso da pessoa em quilogramas (kg) é dividido pelo quadrado da sua altura em metros (m) sendo classificado como mostra a tabela 1.

Ela é causada fundamentalmente pelo excesso de consumo calórico, aumento de consumo de alimentos altamente processados e ricos em açúcar e gorduras, associados ao sedentarismo e ao comodismo trazido com a urbanização e evolução nos modos de transportes. Além desses fatores, é importante destacar a falta de políticas públicas e incentivo à alimentação saudável e à prática de atividades físicas (OMS, 2021).

Tabela 1 - Classificação do IMC. IMC: Índice de Massa Corporal.

IMC (Kg/m ²)	Classificação	Obesidade Grau/Classe	Risco de Doença
<18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5 – 24,9	Normal ou eutrófico	0	Normal
25 – 29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30 – 34,9	Obesidade	I	Elevado
35 – 39,9	Obesidade	II	Muito elevado
≥40,0	Obesidade	III	Muitíssimo elevado

Adaptado de NHS, 2019

Estima-se que mundialmente 13% dos adultos acima de 18 anos eram obesos em 2016, sendo que a maior prevalência estava em países mais ricos de acordo com os continentes e quando inclui-se os adultos com sobrepeso, essa estimativa sobe para 39%. No Brasil, esses números são mais alarmantes, quase 57% da população, em 2016 apresentava excesso de peso (RITCHIE; ROSER, 2017). Dados de 2019 mostram uma relativa melhora nesse quadro, neste ano cerca de 55% dos adultos acima de 18 anos apresentavam excesso de peso e desses, 20,3% apresentavam obesidade (GOVERNO DO BRASIL, 2020).

As altas estatísticas preocupam devido aos efeitos sistêmicos e complicações que a obesidade pode causar pois, os altos índices de massa corpórea estão diretamente associados

à um aumento de casos de doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios musculoesqueléticos, alguns cânceres (OMS, 2021), pressão alta, colesterol alto, asma, apnéia do sono e doenças hepáticas e renais (NHS, 2019), além de problemas psicológicos, de pele e infertilidade (WHO, 1999).

Como mostram as figuras 1 e 2, as comorbidades associadas à obesidade ocorrem devido à inflamação crônica e de baixo grau (como é caracterizada a obesidade) e ao estresse oxidativo contínuo que o organismo está exposto. Isto ocorre porque o tecido adiposo é capaz de secretar um vasto número de substâncias bioativas (adipocinas), incluindo citocinas como TNF- α , IL-6, IL-18 e também de hormônios como Leptina, Resistina, Adipsina e Adiponectina, que podem controlar várias funções metabólicas e imunológicas, mediando inclusive efeitos inflamatórios (TILG e MOSCHEN, 2006; GREENBERG; OBIN, 2006; EMANUELA et al., 2012; MEYER et al., 2013; MARTINS et al., 2014).

Quando se trata da associação entre a obesidade, inflamação e o estresse oxidativo, há um ciclo vicioso, os fatores oxidativos ativam fatores de transcrição que aumentam a produção e expressão de citocinas pró inflamatórias, e estas mesmas citocinas aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, com o passar do tempo são danosas às células, proteínas, DNA, enzimas e outras moléculas do organismo (SAVINI; GASPERI; CATANI, 2016).

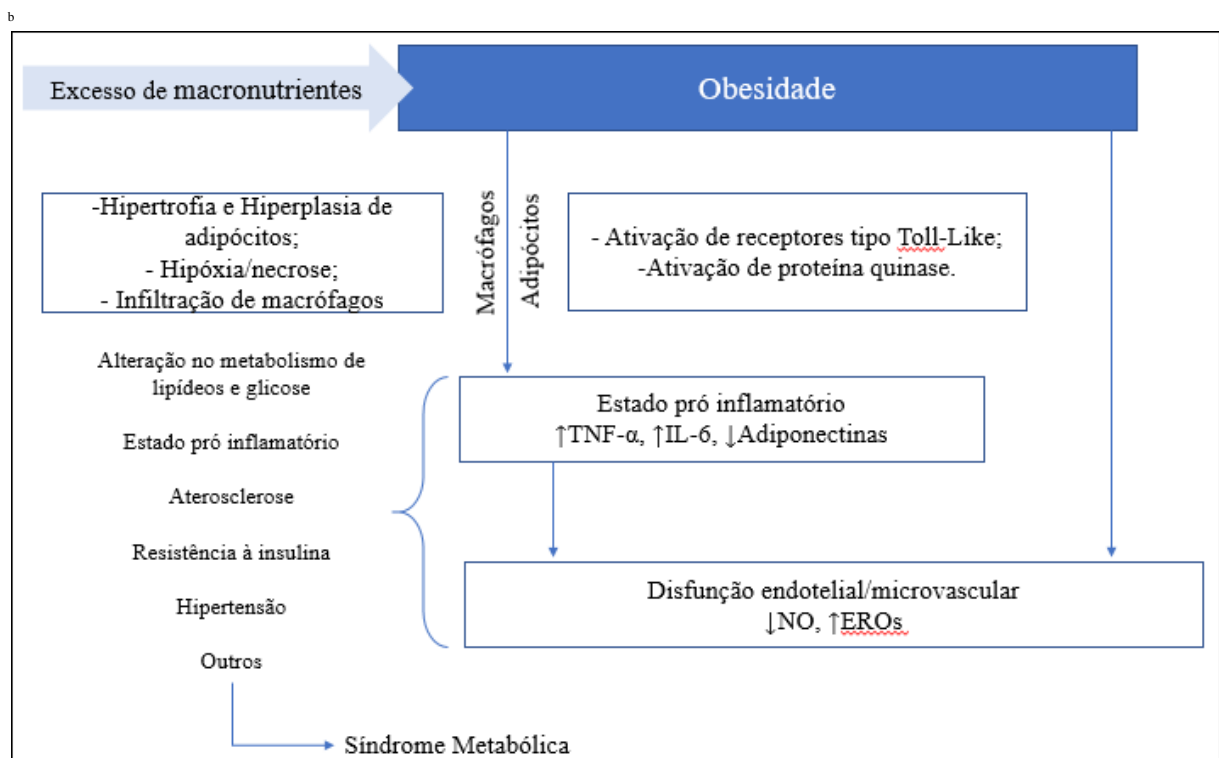


Figura 1 - Mecanismos associados à obesidade e síndrome metabólica. TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa; IL-6: interleucina 6; NO: óxido nítrico; EROs: espécies reativas de oxigênio; ↑: aumento; ↓ redução. Adaptado de Emanuela et al., 2012.

A obesidade e a decorrente síndrome metabólica afetam a integridade de todos os tecidos e órgãos, o que inclui um impacto nos tecidos linfoides e conseqüentemente no sistema imunológico do indivíduo (ANDERSEN; MURPHY; FERNANDEZ, 2016). Além disso, a presença da síndrome metabólica aumenta em 2 vezes o risco de desenvolver doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2, são indivíduos intolerantes a glicose, possuem resistência à insulina, menos HDL circulante, mais liberação do hormônio cortisol, estresse e depressão e outros (HAN; LEAN, 2015).

Essa alteração imunológica e o maior risco de desenvolver outras doenças crônicas e infecciosas preocupam todo o sistema público de saúde dado que, quanto mais obesa a população, maior os gastos com o sistema de saúde (ANDERSEN; MURPHY; FERNANDEZ, 2016). Apesar de o próprio envelhecimento levar a uma síndrome metabólica, há hábitos que podem reduzir os impactos dos fatores externos, melhorando a qualidade de vida e reduzindo os riscos (HAN; LEAN, 2015).

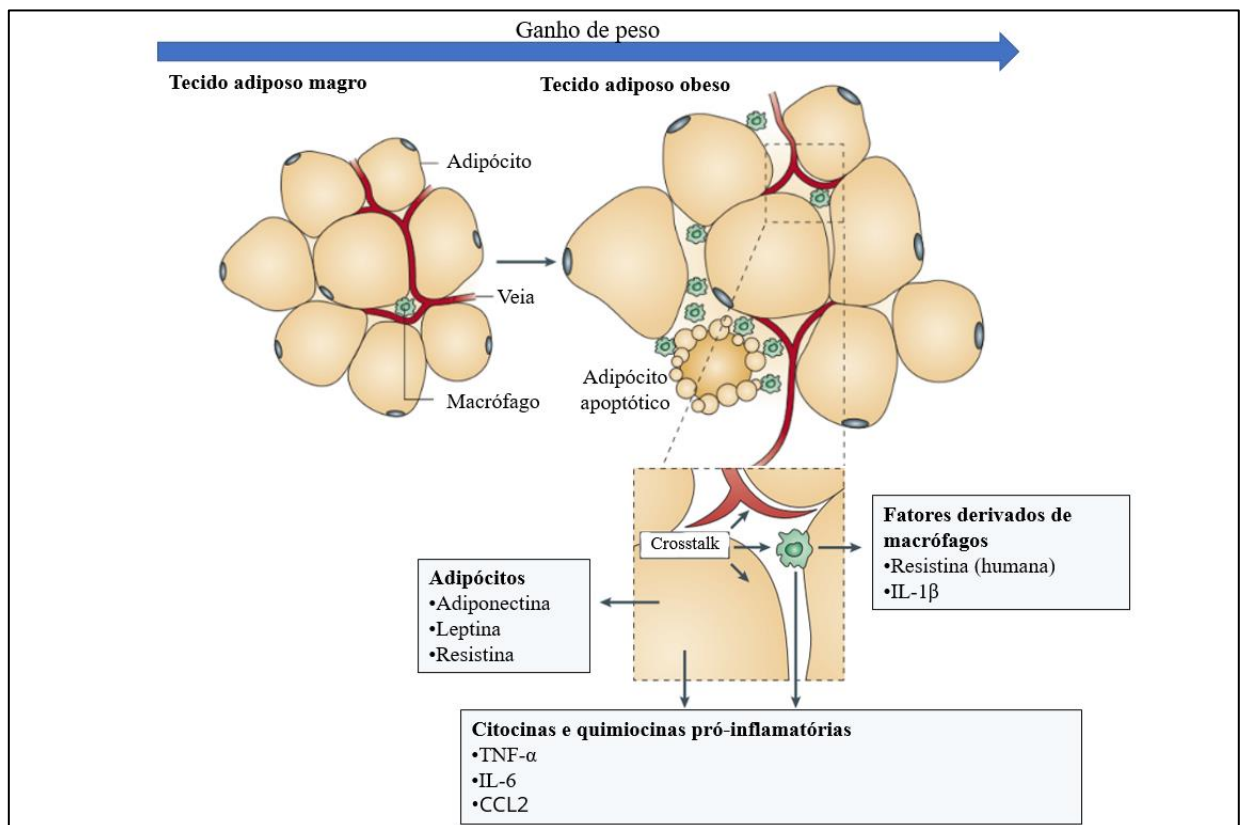


Figura 2 - Tecido adiposo e moléculas sintetizadas. CCL2: CC ligand 2 (ligante de quimiocinas 2); IL: interleucina; TNF: factor tumor-necrose (fator de necrose tumoral). Imagem e legenda traduzida e adaptada de Tilg e Moschen (2006).

A presença de diversos mediadores inflamatórios no organismo, em especial o TNF- α , é o que está principalmente associado à sinalização e indução do estresse oxidativo, além desta citocina ser um grande indutor da produção de EROs (MARSEGLIA et al., 2015). Esta é uma

importante citocina quando se trata de uma resposta normal à agentes infecciosos, ela é capaz de estimular fagócitos a liberarem novas células de defesa e auxiliam no tropismo dessas células para chegarem aos sítios de infecção (BILLMEIER et al., 2016; MEHTA; GRACIAS; CROFT, 2018).

Apesar da obesidade induzir fortemente a produção de compostos pró inflamatórios como leptina, resistina e citocinas pró inflamatórias, há também a produção de compostos anti-inflamatórios como a adiponectina, que por sua vez, tenta reestabelecer a homeostase e reduzir os processos patológicos que envolvem o estresse oxidativo (MARSEGLIA et al., 2015).

Alguns dos motivos pelo interesse de estudo nessa citocina, é a sua grande presença no sangue de mães obesas (FUJIMORI et al., 2016) além dos seus elevados níveis em puérperas saudáveis que apresentavam mastite (PONTES et al., 2006).

Em 2014 a estimativa global era de que existiam 38,9 milhões de mulheres grávidas com sobrepeso e obesidade, sendo que dessas, 14,6 milhões apresentavam obesidade (CHEN; XU; YAN, 2018). No Brasil, neste mesmo ano, de 25 a 30% das gestantes eram obesas (SILVA et al., 2014) mas, essa taxa apresentou uma melhora em 2019 pois, estimou-se que 20,7% das mulheres apresentavam obesidade (FIOCRUZ, 2019).

Estes dados têm levantado diversos questionamentos sobre os riscos maternos e fetais da obesidade na gestação pois, mães com sobrepeso e obesidade apresentam maiores chances de desenvolver complicações, além de exporem o feto ao ambiente inflamatório durante seu desenvolvimento (SEGOVIA; VICKERS; REYNOLDS, 2017).

Quanto trata-se dos riscos maternos, pode-se citar o aumento das chances de desenvolver diabetes gestacional, pré-eclâmpsia (NHS, 2019), aumento da chance de ser necessário o parto cesariana e de desenvolver apneia do sono, aumento do risco de desenvolver diabetes gestacional e hipertensão na gestação (ALVES et al., 2019). Além disso, os riscos continuam no período pós-parto pois, a obesidade materna é fator de risco para o tromboembolismo venoso (CATALANO; SHANKAR, 2017) e para depressão pós parto, devido à dificuldade em amamentar o recém-nascido (COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE, 2015).

Além dos riscos maternos, o feto também está em risco ao se desenvolver exposto à esse ambiente inflamatório podendo apresentar macrossomia e anomalias congênitas, sendo que, os efeitos se estendem ao crescimento da criança, que apresenta maiores riscos de desenvolver obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares no futuro (VASUDEVAN; RENFREW; MCGUIRE, 2011) pois, há passagem dos mediadores inflamatórios via placentária (HOWELL; POWELL, 2017; KIM et al., 2014).

Considerando ainda os impactos da obesidade no período gestacional e no puerpério, um ponto importante a ser destacado, é o efeito sobre o leite materno. O leite de mães com sobrepeso e obesidade apresenta maiores níveis de glicose, gorduras, calorias, citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6, leptina (FUJIMORI et al., 2015, 2016), lactoferrina, neutrófilos, IL-2, IL-10, IFN- γ , Adiponectina, insulina, IgA e IgM (ERLIANA; FLY, 2019; MORAIS et al., 2019a).

1.2 Componentes Bioativos do Leite Materno

O leite materno de acordo com os dias após parto pode ser dividido em 3 momentos: colostro (liberado até o 5º dia após o parto), leite de transição (liberado entre o 5º e 7º dia de pós parto) e leite maduro (a partir do 7º dia pós parto) (BRASIL, 2015). Além desta divisão, em cada mamada há o leite anterior, que é liberado no início e o leite posterior, que é liberado no final da mamada e possui mais calorias e gorduras, o que sacia mais o bebê, mostrando a importância de esvaziar a mama sempre (BRASIL, 2015).

O colostro, objeto amostral deste estudo, possui particularidades que o fazem ser interesse de estudo no mundo inteiro. Ele apresenta altos níveis de anticorpos, em especial SIgA, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, neutrófilos, macrófagos, células T CD4+, células T CD8+, células B, células epiteliais, células Natural Killer (NK), enzimas, fatores de crescimento, antioxidantes e também uma microbiota riquíssima de bactérias probióticas que estão associadas ao desenvolvimento da microbiota natural do recém-nascido (CHRISTIAN et al., 2021; COLLADO et al., 2012; FIELD, 2005; FUJIMORI et al., 2016; PALMEIRA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2016).

Além disso, as taxas de componentes bioativos no colostro podem se alterar a depender das condições clínicas da lactante. Mães com sobrepeso e obesidade apresentam maiores níveis de melatonina no colostro, maiores níveis de liberação de cálcio intracelular e de apoptose celular (MORAIS et al., 2019b). A presença da infecção materna por Zika vírus no período gestacional também tem sido reportada com capacidade de elevar os níveis de IL-6 e reduzir os níveis de IL-10 no colostro (DE QUENTAL et al., 2019).

Essa alteração também pode ocorrer a depender do momento do dia, a presença de um perfil cronobiológico nas ações celulares e solúveis do colostro e do leite maduro, nos traz a ideia de que exista diversos mecanismos próprios para que haja uma proteção mais eficiente do recém-nascido para agente patogênicos, e também de que o leite humano é um completo e complexo sistema biológico (figura 3) (MORAIS et al., 2015; CHRISTIAN et al., 2021).

Ele possui uma composição rica, em que podemos incluir componentes genéticos,

imunológicos e nutricionais, responsáveis por nutrir e proteger a criança amamentada durante todo o período de lactação (CHRISTIAN et al., 2021). Essa rica composição é essencial para o crescimento e composição corporal e neurológica da criança, responsável por inúmeros benefícios maternos e infantis que perduram durante toda a vida, influenciando em toda nutrição da criança até sua vida adulta (INNIS, 2014; ERIKSEN et al., 2018).

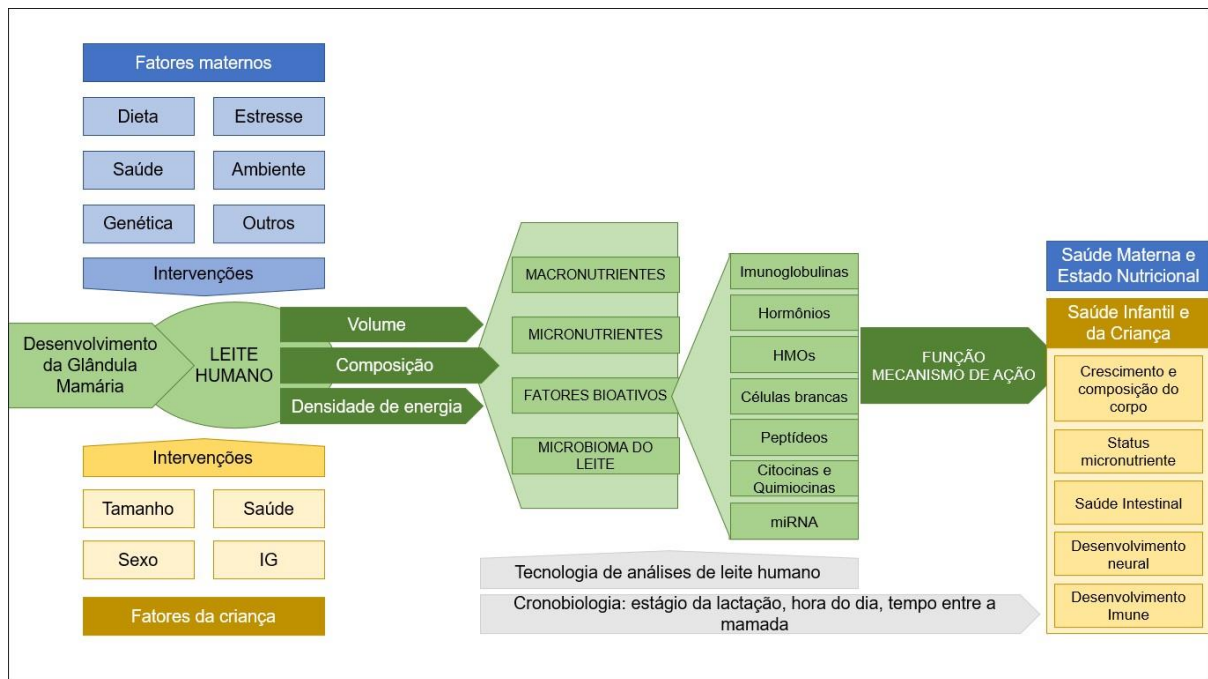


Figura 3 - Investigação sobre o Leite Humano: quadro conceitual. IG: idade gestacional; HMOs: oligossacarídeos do leite humano; miRNA: microRNA (Adaptado de Christian et al., 2021).

Além de condições clínicas como a obesidade e infecções, a idade das mães também pode alterar as características do colostro, bem como o momento do dia, a presença de anemia e hipertensão (FRANÇA et al., 2010; FRANÇA et al., 2013; MASSMANN et al., 2013; SILVA et al., 2013; MORAIS et al., 2015). Mães acima de 35 anos apresentam em seu colostro maiores níveis de melatonina e cortisol, e menores níveis de macrófagos e neutrófilos, o que inclusive pode interferir na proteção do recém-nascido para agentes infecciosos como a *Giardia lamblia* (PEREIRA et al., 2018).

Quando se trata da proteção para agentes infecciosos, um fator importante a ser analisado é a taxa de fagocitose das células mononucleares e polimorfonucleares do colostro.

Os fagócitos são células cuja principal função é destruir e ingerir microrganismos e destruir tecidos danificados, mas suas funções não se limitam a isso, também são capazes de recrutar novas células para o sítio de infecção, realizarem o processo de fagocitose (figura 4) e se comunicar com outras células induzindo a produção de determinadas citocinas, o que pode

mostrar uma capacidade de modular a resposta imune (TAYLOR et al., 2005; FAIRN; GRINSTEIN, 2012).



Figura 4 - Fagocitose e destruição intracelular de microrganismos. iNOS, óxido nítrico sintase induzível; NO, óxido nítrico; ROS, espécies reativas de oxigênio (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Para a fagocitose acontecer de forma eficiente, ela depende de vários mecanismos e conexão com receptores distintos, podendo ser, receptores do tipo Toll-like (TLRs), receptor de desencadeamento expresso em células mieloides (TREM-2), receptores de Fc, receptor pirimidinérgico (P2Y), complexo de antígeno macrofágico 2 (MAC-2), receptores de manose, receptor de proteína de baixa densidade (LRP) e outros (FU et al., 2014; TAYLOR et al., 2005).

Os receptores que reconhecem carboidratos em sua superfície facilitam a fagocitose. Esses receptores pertencem à família de lectinas do tipo C e são dependentes de Ca²⁺, podendo agir como opsoninas ou modulando a expressão de outros receptores. Sabendo que o Cálcio pode ser o principal meio pelo qual a fagocitose ocorre, surge a necessidade da utilização de inibidores para a identificação do mecanismo intrínseco que está ocorrendo (TAYLOR et al., 2005; KERRIGAN; BROWN, 2009; LI; UNDERHILL, 2020).

Estudos anteriores relataram a importância da análise de cálcio intracelular na

presença do inibidor TMB-8 para entendimento do mecanismo de fagocitose que ocorre, inclusive em células do colostro (MORCELI et al., 2013; MORES et al., 2015).

Além dessa atividade, o cálcio é responsável por controlar vários processos celulares como ativação, proliferação e também morte celular através da indução do processo de apoptose, da ativação de enzimas catabólicas e produção de radicais livres (FERRARI et al., 2002; HARA et al., 2013). Além disso, as taxas de cálcio intracelular são facilmente alteradas de acordo com mínimos estímulos externos como hormônios, citocinas e metais (FAGUNDES et al., 2012, 2013; MORCELI et al., 2013; MORES et al., 2015).

A partir de todas as propriedades apresentadas com relação ao colostro e sua capacidade própria de responder à antígenos, bactérias e parasitos, reforça-se o estudo deste pois, mostrou possuir um fator protetivo para a criança não só durante essa fase, mas também, durante a vida adulta (KELISHADI; FARAJIAN, 2014).

A amamentação precoce e continuada por longos períodos é capaz de reduzir a mortalidade e morbidade infantil, além de proteger a criança de no futuro desenvolver obesidade e diabetes. Somando-se a isso, essas crianças possuem maior inteligência do que crianças amamentadas por pouco tempo ou não amamentadas (VICTORA et al., 2016).

Dados de 2006 mostram que no Brasil, cerca de 43% dos recém-nascidos eram introduzidos na amamentação logo após o parto, 47,5% tinham a amamentação continuada por até 1 ano de vida e 26% até os 2 anos de vida. Outro dado importante, é que cerca de 6% apenas das crianças em 2007, apresentavam sobrepeso (GLOBAL NUTRITION REPORT, 2020). Dados mais recentes apresentam que as taxas de amamentação estão em crescimento no Brasil. Cerca de 96,2% das crianças menores de 2 anos foram amamentadas alguma vez e 62,4% na primeira hora de vida. Além disso, cerca de 45,8% foram amamentadas de forma exclusiva nos primeiros 6 meses de vida. Apesar de serem índices expressivos, ainda estão abaixo do preconizado, sinalizando que o incentivo deve continuar (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2021).

Essas taxas reforçam a importância da amamentação como fator protetivo para obesidade infantil e a necessidade do incentivo desde o pré-natal e também na primeira hora de vida do bebê pois, a primeira hora de vida requer uma adaptação rápida de múltiplos órgãos e sistemas da criança, sendo que o contato pele a pele com a mãe e a amamentação são primordiais para auxiliar nessa adaptação ao ambiente, protege a criança de hipotermia, hipoglicemia, auxilia na formação do sistema respiratório, reduz a mortalidade neonatal e tende a aumentar o sucesso da amamentação continuada (BOCCOLINI et al., 2013; NECZYPOR; HOLLEY, 2017; SHARMA; SHARMA; SHASTRI, 2017).

Os benefícios do aleitamento materno não estão restritos apenas à criança, há relação positiva entre amamentação e menores índices de câncer de mama, cânceres de ovário, fraturas ósseas, artrite reumatoide, retorno ao peso pré-gestacional mais rápido e menor sangramento uterino pós-parto nas mães (REA, 2004; FRANÇA-BOTELHO et al., 2013; FRANÇA et al., 2015; VICTORA et al., 2016, HONORIO-FRANÇA et al., 2016, HONORIO-FRANÇA et al., 2021). Além disso, a ligação mãe e filho aumenta durante a amamentação, melhora os laços emocionais e cria um laço afetivo mais forte e duradouro, o que contribui para o desenvolvimento emocional da criança e reduz a possibilidade de depressão pós-parto (BRASIL, 2015; DIAS; FIGUEIREDO, 2015).

Muitas vezes, a atenção no período pós-parto é voltada totalmente à criança, e a mãe acaba ficando em papel secundário, o que também pode acarretar em problemas emocionais e sentimento de incapacidade materna por parte da mãe, portanto, é importante durante o pré-natal um aconselhamento familiar para que isso não ocorra, pois, alterações emocionais e psicossociais podem interferir para pior na disposição materna em iniciar ou continuar a amamentação (DIAS; FIGUEIREDO, 2015).

1.3 *Escherichia coli* (*E. coli*)

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria da família Enterobacteriaceae, Gram-negativa, anaeróbia facultativa que habita o intestino grosso de humanos em condições normais, contribuindo inclusive na produção de algumas vitaminas, digestão de alguns alimentos e ainda pode inibir o crescimento de outras bactérias patogênicas como a *Salmonella* e a *Shigella*. Seu ambiente natural é o intestino, portanto sua presença em outras vias como o trato urinário pode ser causadora de infecções (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TORTORA, 2012; CROXEN et al., 2013).

Apesar de seus benefícios ao intestino humano, ela possui certas linhagens que são patogênicas como a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e a *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; CROXEN et al., 2013).

A infecção por EPEC possui como manifestação clínica a diarreia aguda mucoide desprovida de sangue, podendo levar a má-absorção severa de nutrientes, inflamação local e destruição do tecido (PEARSON et al., 2016). Ela é transmitida via fecal-oral entre os hospedeiros principalmente através de superfícies contaminadas, o que mostra a importância das condições sanitárias de qualidade bem como a lavagem adequada das mãos e instrução da

população sobre higiene doméstica (CROXEN et al., 2013). Após o nascimento, microrganismos como a *E. coli* começam a habitar o intestino do bebê e, quando em condições anormais (excesso ou redução) pode contribuir para o surgimento de doenças (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Em 2009 a diarreia era uma das maiores causas de morte de crianças menores de 5 anos (UNICEF; WHO, 2009).

A *E. coli* enteropatogênica possui diversos mecanismos de escape, podendo inibir a fagocitose através da secreção de proteínas, ela é capaz de inibir a resposta inflamatória, inibe células apoptóticas a sinalizarem a presença de um patógeno e inibe os inflamassomas de ativarem cascatas de respostas (PEARSON et al., 2016).

Em um viés, a aderência de EPEC no intestino pode ser bloqueada por IgA e por alguns componentes do leite materno, contribuindo para a imunidade do bebê, complementar a isso células mononucleares do colostro apresentam receptor de membrana para SIgA, esta por sua vez é uma excelente opsonina que contribui para o aumento das taxas de fagocitose e índice microbicida, sendo capaz de matar a EPEC mesmo sem estímulo exógeno (HONORIO-FRANÇA et al., 1997; FRANÇA et al., 2011b; CROXEN et al., 2013).

Portanto, a amamentação exclusiva até o sexto mês de vida, juntamente com a vacinação, a lavagem de mãos e a ingestão de água potável é um método de intervenção essencial e primordial para combater a morte infantil causada pela infecção por microrganismos causadores de diarreia, como a *E. coli* (QAZI et al., 2015).

Um estudo anterior constatou um comprometimento da atividade funcional de fagócitos no colostro de mães com obesidade (MORAIS et al., 2019b) e atualmente não foram encontrados na literatura, estudos que avaliassem os possíveis efeitos imunomodulatórios do TNF- α nas células mononucleares do colostro de mães com excesso de peso. Assim, a hipótese é de que o TNF- α module de forma benéfica a fagocitose e o índice microbicida de fagócitos do colostro e possa vir a ser utilizado futuramente como uma alternativa terapêutica que contribua com as propriedades imunológicas dessa secreção para os recém-nascidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a atividade funcional de fagócitos do colostro humano de mães com excesso de peso tratados ou não com TNF- α para *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC).

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a viabilidade de células mononucleares do colostro humano de mães com excesso de peso, na presença ou ausência de TNF- α ;
- Avaliar o índice de fagocitose das células mononucleares do colostro humano de mães com sobrepeso e obesidade para de *Escherichia coli* enteropatogênica, quando tratadas ou não com o estímulo TNF- α e na presença ou ausência de TMB-8;
- Avaliar o índice microbicida dos fagócitos mononucleares do colostro humano de mães com excesso de peso para *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), estimulados ou não com TNF- α e na presença ou ausência do TMB-8;
- Analisar se o TNF- α modula a liberação de cálcio intracelular pelas células MN do colostro entre os estados nutricionais e como essa liberação se comporta na presença do inibidor TMB-8.

3 METODOLOGIA

3.1 Sujeitos

Estudo desenvolvido com amostras coletadas na cidade de Barra do Garças-MT. As amostras de colostro foram coletadas de todas as mães que apresentaram excesso de peso pré-gestacional ($\text{IMC} \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$), confirmados pela avaliação do IMC, atendidas no Hospital e Pronto Socorro Municipal Milton Pessoa Morbeck de Barra do Garças, MT, no período de desenvolvimento do estudo. O grupo controle de mães com peso pré-gestacional normal foi constituído por gestantes que, apesar dos fatores de risco para a obesidade, tiveram resposta normal (IMC entre 18,5 a 24,9 kg/m^2) aos testes diagnósticos, ou seja, não apresentaram excesso de peso pré-gestacional.

O tamanho amostral foi constituído de 60 gestantes, assim distribuídas: 24 no grupo controle; 21 no grupo sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ e $< 29,9 \text{ kg/m}^2$) e 15 no grupo obesidade pré-gestacional ($\text{IMC} \geq 30,0 \text{ kg/m}^2$).

É importante ressaltar que esse estudo é um braço de um projeto maior que foi previamente aprovado pelo comitê de ética antes do início da pandemia em 2020. Inclusive, as amostras foram coletadas em período anterior ao início de casos na referida cidade (as coletas foram realizadas entre outubro de 2019 e início de março de 2020, os primeiros casos foram registrados em final de março). Dessa forma, não houve exposição de risco tanto das mães e crianças participantes do estudo, quanto da equipe do laboratório.

3.2 Desenho do Estudo

Foi realizado uma coorte histórica, considerando-se os estados nutricionais pré-gestacional (normal, sobrepeso e obeso), e as avaliações da viabilidade celular e atividades funcionais de células. As mães foram consultadas sobre a disponibilidade em doar uma amostra de colostro, sendo que as amostras só foram coletadas mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A).

A coleta de colostro foi efetuada manualmente, com técnica adequada, no período correspondente as primeiras 48 a 72 horas após o parto.

3.3 Critérios de Inclusão, Exclusão e Descontinuidade

Foram elegíveis como possíveis doadoras todas as gestantes atendidas nos Serviços e caracterizadas nos grupos experimentais: mães com peso pré-gestacional normal (grupo

controle) e com excesso de peso pré-gestacional não diabéticas, sendo estabelecidos os seguintes critérios:

Critérios de inclusão: a) idade gestacional máxima de entrada na pesquisa de 13 semanas; b) idade gestacional no parto entre 37 a 41^{6/7} semanas, reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis; c) realização da assistência pré-natal no Serviço e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Critérios de exclusão: gravidez gemelar; malformações fetais e parto antes da 37^a semana de gestação.

Critérios de descontinuidade: abandono do pré-natal no Serviço; malformação fetal diagnosticada no momento do parto e perda de dados relativos ao parto e ao período neonatal.

3.4 Variáveis de Controle

a) presença (sim) ou ausência (não) de tabagismo, anemia, consumo de álcool e hipertensão arterial; b) idade gestacional, em semanas completas, na entrada do grupo de atendimento pré-natal da unidade de saúde; c) manutenção (sim) ou (não) da classificação do IMC pré-gestacional (peso normal e excesso de peso) na última consulta de pré-natal.

3.4.1 Variáveis Independentes

Grupos experimentais: peso normal (controle), grupo com excesso de peso ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ e $< 29,9 \text{ kg/m}^2$) de acordo com o IMC pré-gestacional e grupo obeso ($IMC \geq 30,0 \text{ kg/m}^2$).

3.4.2 Variáveis Dependentes

a) Viabilidade celular de células mononucleares do colostro humano; b) Avaliação da atividade funcional de fagócitos na presença do imunomodulador TNF- α ; c) Liberação de cálcio intracelular pelas células MN do colostro humano na presença e ausência de TNF-alfa e TMB-8.

3.5 Métodos de Coleta e Avaliação

3.5.1 Estado Nutricional Pré-Gestacional

Para determinar o estado nutricional pré-gestacional, foi utilizado como indicador o índice de massa corporal pré-gestacional. A definição do IMC pré-gestacional foi obtida por meio da fórmula: índice de massa corpórea = peso pré-gestacional (kg) / altura (m²). Foi utilizado

o peso pré-gestacional referido pela gestante durante a primeira consulta de pré-natal, ou, na ausência dessa informação, será utilizado o peso obtido em consulta realizada até a 13ª semana de gestação – o peso aferido neste período tem sido utilizado como próximo do peso pré-gestacional, possibilitando uma estimativa do estado nutricional pré-gestacional (WHO, 1995). A classificação do IMC foi definida de acordo com o Institute of Medicine dos Estados Unidos (IOM, 2009). Os critérios empregados para cada categoria foram: baixo peso ($IMC < 18,5$ kg/m²); eutrófica (IMC entre 18,5 a 24,9 kg/m²) e obesidade ($IMC \geq 30$ kg/m²).

Peso e altura foram mensurados em duplicata em balança digital, marca Tanita®, com carga máxima de 150 kg e precisão de 100g, sendo utilizado o valor médio. A altura foi aferida na primeira consulta de pré-natal com estadiômetro da marca Seca® com precisão de 1mm e capacidade de 205 cm; foi solicitado à paciente que ela retirasse os sapatos e ficasse com o mínimo de roupas, se posicionasse de costas para o estadiômetro e se mantivesse ereta com os pés unidos, quando possível encostasse o calcanhar, a panturrilha, as nádegas, os ombros e a parte posterior da cabeça no estadiômetro.

3.5.2 Estado Nutricional Gestacional

Para avaliar o estado nutricional das gestantes em baixo peso, eutrofia, sobrepeso e obesidade foram utilizados os pontos de corte de IMC ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$) para a idade gestacional.

3.5.3 Obtenção dos Fagócitos Mononucleares do Coloastro

Foram coletadas amostras de colostro com volume aproximado de 8mL. O colostro foi centrifugado por 10 minutos a 1500rpm sob refrigeração a 4°C. A centrifugação permite a separação do colostro em três fases nítidas: o "botão" celular, uma porção fluida intermediária e uma camada superior de gordura. A camada superior composta de gordura foi desprezada e o sobrenadante (porção fluida) reservado, sendo conservado o "botão" celular. As células foram ressuspendidas em meio de cultura 199 (Gibco), e separadas em gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia) por 40 minutos a 1500rpm, sob temperatura de 4°C. As células foram contadas em câmara de Neubauer, e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/mL. As células foram utilizadas nos ensaios de viabilidade, de fagocitose e atividade microbicida.

3.5.4 Modulação dos Fagócitos Mononucleares do Coloastro por TNF- α

A modulação dos fagócitos foi realizada de acordo com protocolo específico, desenvolvido em estudos anteriores do nosso grupo onde foram empregados diferentes agentes

imunomoduladores, entre eles, hormônios, plantas com potencial terapêutico e anticorpos (FRANÇA et al., 2011a, 2011b; HONORIO-FRANÇA et al., 1997). Assim, de acordo com este protocolo os fagócitos (2×10^6 cels/mL) foram pré-incubados com 10 μ L de TNF- α TM[®] (100 ng/mL), por uma hora a 37°C. A seguir foram realizados os ensaios de viabilidade celular e de fagocitose. As metodologias de cada um destes ensaios seguem detalhadas abaixo. As concentrações de fagócitos e moduladores foram mantidas em todos os experimentos. Como controle dos experimentos propostos, para cada ensaio, fagócitos serão incubados, isoladamente (sem moduladores), por tempo similar ao empregado no ensaio de referência.

3.5.5 Tratamento dos Fagócitos Mononucleares do Coloastro com TMB-8

Para investigar os efeitos do cálcio Ca²⁺ intracelular na ação do TNF- α , os fagócitos (2×10^6 cels/mL) foram incubados com 10 μ L de 8-(Diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride (TMB-8 inibidor de Ca²⁺ intracelular – com concentração final de 0,1mM, Sigma, ST Louis, USA) por 1 hora a 37°C. Os fagócitos foram lavados com PBS e imediatamente usados nos ensaios de viabilidade, fagocitose e atividade microbicida.

3.5.6 Linhagem e Cultura da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Cepa de *E. coli* – *Escherichia coli* enteropatogênica isolada das fezes de uma criança com diarreia aguda (sorotipo 0111: H⁻ AL⁻, *eae*⁺, *eaf*⁺, *bfp*⁺) foi cultivado em meio BHI (Brain Hearth Infusion) por 18 horas a 37°C. As bactérias foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) e ajustada em uma concentração aproximada de 1×10^7 bactérias/mL medida por turbidimetria a 540nm, utilizando um espectrofotômetro (T2000-Tekna). Esta concentração bacteriana foi previamente determinada pela contagem de unidades de colônia em Ágar Tripulado de Soja (TSA, Difco, Detroit).

3.5.7 Determinação da Viabilidade das Células Mononucleares do Coloastro

Para verificar a viabilidade celular dos fagócitos MN na presença do estímulo, os fagócitos foram incubados com 250 μ L de células, mais 10 μ L da citocina TNF- α e 10 μ L de TMB-8 por 30 minutos a 37°C sobre agitação contínua. Na sequência, as células foram coradas por 1 minuto com 200 μ L de alaranjado de acridina (concentração 14,4 mg/mL), ressuspensas em PBS, centrifugadas e lavadas outras 2 vezes. Em seguida as lâminas foram montadas e contadas em quantidade de células vivas e mortas até um total de 100 em um microscópio de fluorescência.

3.5.8 Determinação da Fagocitose e do Índice Microbicida do Colostro

A atividade microbicida dos fagócitos MN do colostro foi avaliada pela técnica de alaranjado de acridina, segundo o método de Bellinati-Pires e colaboradores (1989) e adaptado por Honório-França e colaboradores (1997). O protocolo dos procedimentos analisados também foi modificado para o estudo.

Na determinação da fagocitose foram incubados volumes iguais de fagócitos e bactérias (250 µL de cada) para o grupo não tratado e acrescidos de 10 µL de TNF-α e 10 µL de TMB-8 para o grupo tratado.

O volume final, da mistura fagocitária, foi dependente do rendimento celular das amostras de colostro, não sendo inferior a 0,5 mL. A suspensão de EPEC e células foi submetida à incubação prévia por 30 minutos, sob agitação a 37°C em banho maria.

Após esse período, a suspensão de células e bactérias foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm sob refrigeração a 4°C. O sobrenadante descartado e o "pellet" formado foi corado com 200 µL de alaranjado de acridina (concentração 14,4 mg/mL) por 1 minuto e a seguir foi ressuspensa em meio 199, centrifugado e lavado com solução salina tamponada (PBS) por duas vezes. A seguir foram montadas lâminas e contadas as células em microscópio de fluorescência em um aumento óptico de 400x e 1000x (Nikon Eclipse E200).

O índice microbicida foi realizado através do cálculo:

$$\frac{FM \times 100}{IF}$$

Onde FM é a quantidade de células que fagocitaram e mataram a bactéria, e IF é a soma das células que fagocitaram a bactéria mais as células que fagocitaram e mataram a bactéria. Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata.

3.5.9 Liberação de Cálcio Intracelular (Ca²⁺) determinada por fluorescência e Citometria de Fluxo

Foi realizada coloração fluorescente no FACS Calibur (BD San Jose USA) para avaliar a liberação de Ca²⁺ intracelular em fagócitos do colostro (FAGUNDES et al., 2012). As células foram coradas com indicador radiométrico fluorescente de cálcio Fluo3-Acetoximetil (5µL, 1µg/mL. Fluo3-AM- Sigma ST Louis, EUA). As suspensões celulares, pré-tratadas ou não com TNF-α e TMB-8 foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 30 minutos sob agitação contínua. As suspensões celulares foram incubadas overnight e no dia seguinte lavadas com PBS/BSA (5mg/mL; 1500rpm; 10 min), o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS/BSA.

Após isso, a leitura foi realizada por citometria de fluxo. A calibração e a sensibilidade foram rotineiramente verificadas usando CaliBRITE 3 Beads (BD Cat. No 340486 USA). Fluo-3 foi detectado com filtro de 530/30 nm para Ca^{2+} intracelular. A taxa de liberação de Ca^{2+} intracelular foi expressa em média geométrica de acordo com a intensidade de fluorescência do Fluo-3.

3.6 Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados neste estudo nos diferentes estados nutricionais foram realizadas através do software BioEstat® versão 5.0. Foram utilizados o Teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos. Considerou-se $p < 0,05$ como limite de significância estatística.

3.7 Aspectos Éticos

As considerações éticas foram baseadas no uso do material biológico para fins científicos, com sigilo da identidade da nutriz, livre de coação ou conflito de interesses da instituição ou de pessoas envolvidas no projeto. As coletas respeitaram os protocolos técnicos dos serviços envolvidos. As nutrizes foram previamente informadas e o material somente foi coletado ou utilizado sob exposto consentimento em formulário específico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE), aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), CAAE: 87435318.2.0000.5587 (ANEXO B).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da citocina TNF- α utilizado em doses nanométricas na atividade funcional de fagócitos do colostro humano de mães nos estados nutricionais eutrófico, sobrepeso e obesidade. Na figura 5 é apresentada uma comparação da viabilidade das células quando comparadas em relação aos diferentes estados nutricionais na presença e ausência de TNF- α .

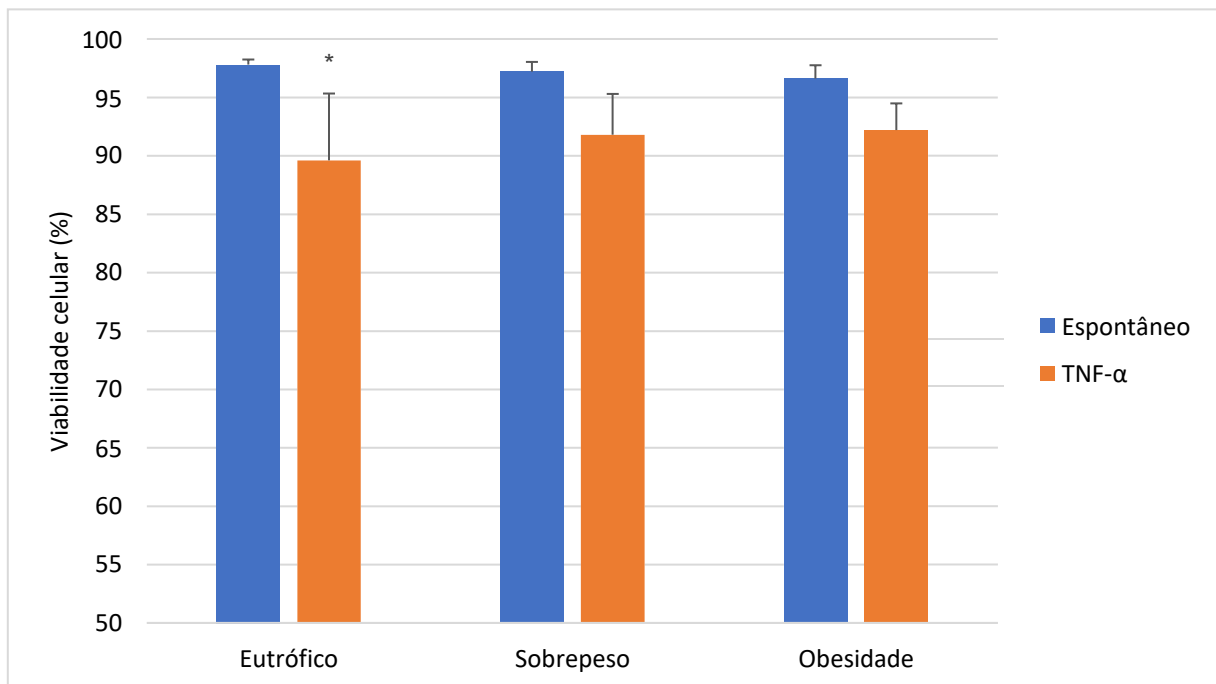


Figura 5 - Comparação da viabilidade celular de células mononucleares do colostro humano de acordo com o estado nutricional nos tratamentos espontâneo e estimulados com TNF- α . TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa.

*Diferença significativa em relação à viabilidade espontânea dentro do mesmo estado nutricional ($p < 0,05$).

A viabilidade celular apresentou índices superiores a 89% em todos os estados nutricionais com ou sem o estímulo TNF- α . Estudos na literatura com outros tipos celulares, relatam uma significativa toxicidade sobre a viabilidade das células após o tratamento com TNF- α exógeno na mesma concentração utilizada neste estudo (100pg/mL). No entanto, no colostro humano e no bovino, estudos sugerem a capacidade proteção de células, com aumento dos índices de viabilidade, além de inibir mediadores inflamatórios (BUESCHER; MCWILLIAMS-KOEPPEN, 1998; SCHUERWEGH et al., 2003; AN et al., 2009; CHAE et al., 2017).

Há poucos estudos que analisaram a ação do TNF- α sobre a viabilidade celular, grande parte dos estudos analisam formas de bloquear a citocina para tratar doenças de caráter

inflamatório (SILVA; ORTIGOSA; BENARD, 2010) ou então, para eliminar células tumorais em diferentes tipos de cânceres (BERTAZZA; MOCELLIN, 2010).

A partir das informações apresentadas com relação à importância da resposta imunológica no colostro, a figura 6 apresenta a comparação dos índices de fagocitose das células mononucleares do colostro humano entre o espontâneo (meio 199) e o tratamento com TNF- α na presença e ausência de TMB-8 nos três estados nutricionais.

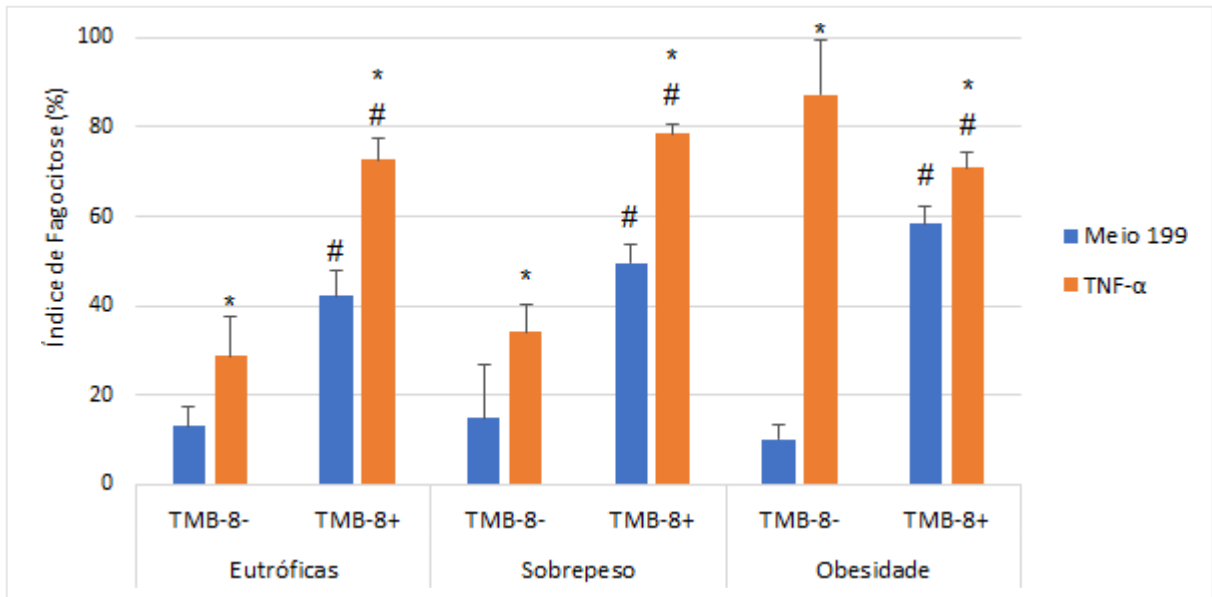


Figura 6 - Comparação do índice de fagocitose de células mononucleares do colostro humano para *Escherichia coli* enteropatogênica de acordo com o estado nutricional no meio 199, tratados ou não com TNF- α e na presença e ausência de TMB-8. TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa.

*Diferença significativa em relação ao meio 199 dentro do mesmo estado nutricional e mesmo uso de TMB-8 ($p < 0,05$).

#Diferença significativa entre o uso de TMB-8 considerando o mesmo tratamento e estado nutricional ($p < 0,05$).

De forma independente, os fagócitos do colostro humano são capazes de fagocitar a *E. coli*, mas em todos os estados nutricionais a presença do TNF- α aumentou de forma positiva a fagocitose em relação ao meio 199, independente da presença ou ausência do TMB-8. No entanto, essa modulação apresentou ser mais significativa na presença do TMB-8 nos colostros de mães dos grupos eutrófico e sobrepeso. No colostro de mães com obesidade ocorreu o contrário. Houve redução do índice de fagocitose das células tratadas com TNF- α e na presença do TMB-8.

Quando se considera a ação do TNF- α nos três estados nutricionais, é possível observar que o colostro de mães com obesidade obteve os maiores índices de fagocitose, indicando que as células MN desse grupo respondem fortemente ao estímulo do TNF- α . O TNF- α tem mostrado ter efeitos estimuladores da fagocitose em células polimorfonucleares no infiltrado peritoneal (PMN) e em concentrações acima de 250pg/mL (KLEBANOFF et al., 1986; HESS

et al., 2009).

De forma distinta ao verificado no presente estudo em que não houve diferenças significativas no índice de fagocitose na ausência da citocina entre os grupos eutrófico, sobrepeso e obesidade, Nieman e colaboradores (1999) verificaram aumento de fagocitose de monócitos, granulócitos, da explosão oxidativa (*burst respiratório*) e contagem de leucócitos no grupo de indivíduos com obesidade. Deve ser considerado que essas diferenças se justificam devido ao tipo de amostras avaliado, dado que Nieman e colaboradores (1999) investigaram efeitos da obesidade em células do sangue, e neste estudo foram analisados os efeitos do excesso de peso sobre fagócitos do colostro. Estudos prévios relataram que os componentes imunológicos do colostro podem apresentar comportamentos distintos aos verificados no sangue (FUJIMORI et al., 2016). Sabe-se que os componentes biológicos do colostro são facilmente alterados a depender do caráter patológico materno, no caso da obesidade, a inflamação crônica pode prejudicar a capacidade de proteção imunológica para o recém-nascido (FUJIMORI et al., 2015).

De acordo com os possíveis mecanismos em que a fagocitose ocorre nas células MN do colostro, o uso do bloqueador de cálcio intracelular (TMB-8) foi utilizado com o objetivo de verificar se os efeitos do TNF- α sobre fagocitose são dependentes do cálcio. Os resultados revelaram que o TMB-8 não interferiu na capacidade das células mononucleares de realizarem a fagocitose para EPEC, e quando associado ao TNF- α nos grupos eutrófico e sobrepeso, houve um aumento considerável deste índice, sugerindo que o possível mecanismo de ativação da atividade funcional dos fagócitos do colostro não é dependente do cálcio intracelular.

Além disso, o uso de bloqueadores de TNF- α em pacientes com artrite reumatoide (AR) não alterou a capacidade dos fagócitos do sangue de realizarem a fagocitose (HARTMANN et al., 2005), mostrando que mesmo em uma condição de inflamação crônica como a AR os fagócitos respondem bem, tanto bloqueando o TNF- α endógeno, quanto usando-o como estímulo exógeno.

Contrariamente ao obtido neste ensaio, o estudo de Morceli e colaboradores mostraram que o TMB-8 reduziu os níveis de fagocitose no colostro de mães diabéticas (MORCELI et al., 2013). Isso se dá devido ao caráter inflamatório ser diferente quando tratamos da obesidade e da diabetes, além de que os componentes bioativos também são expressos de maneiras diferentes e podem influenciar na resposta imunológica (FAGUNDES et al., 2013).

Além da importância em analisar a capacidade das células MN em fagocitar microrganismos, é necessário ressaltar sobre a efetivação da resposta imune através da morte do patógeno. Portanto, a figura 7 apresenta uma comparação entre os índices microbicidas (%)

das células mononucleares do colostro humano de mães nos três estados nutricionais tratados ou não com TNF- α e na presença ou ausência de TMB-8.

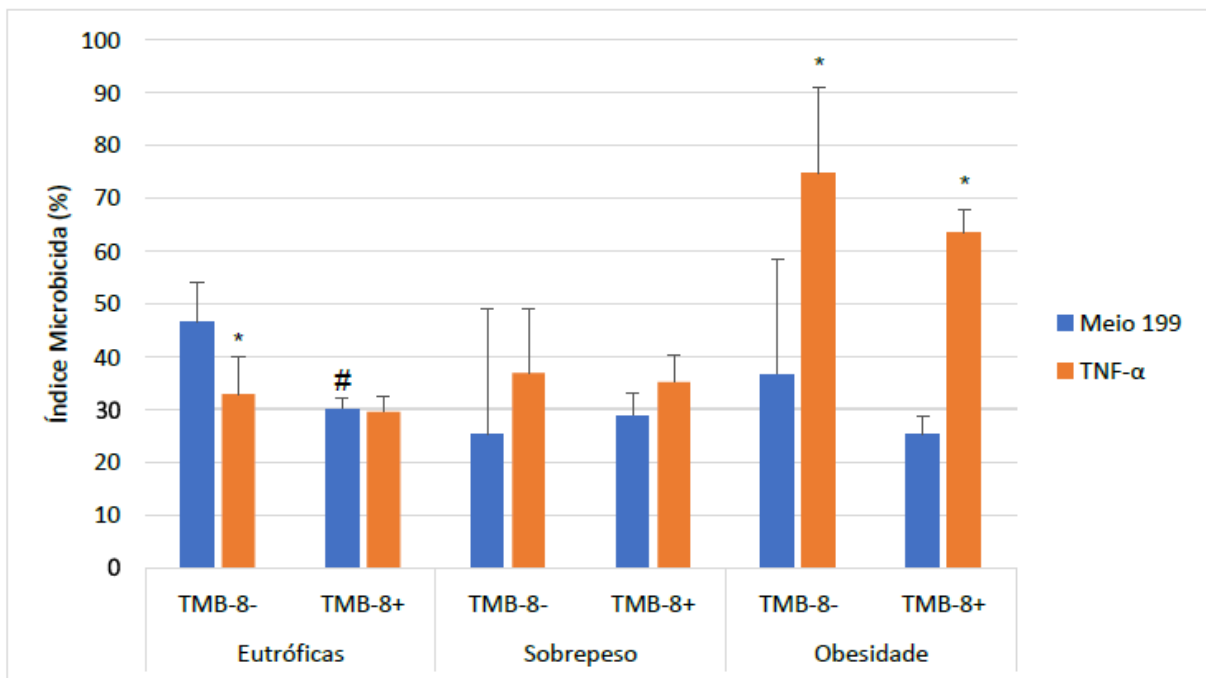


Figura 7 - Comparação do índice microbicida de células mononucleares do colostro humano para *Escherichia coli* enteropatogênica de acordo com o estado nutricional nos tratamentos espontâneo (meio 199), tratados ou não com TNF- α e na presença e ausência de TMB-8. TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa.

*Diferença significativa em relação ao índice de fagocitose espontâneo considerando o mesmo estado nutricional ($p < 0,05$).

#Diferença significativa entre o uso de TMB-8 considerando o mesmo tratamento e estado nutricional ($p < 0,05$).

Em células de mães com peso pré-gestacional normal e sem nenhuma outra comorbidade, o uso do TNF- α como modulador, reduziu a capacidade das células MN de matarem a *E. coli* enteropatogênica, isso possivelmente ocorreu pelo fato de o TNF- α ser uma citocina inflamatória (MARSEGLIA et al., 2015), o que provavelmente alterou a resposta imunológica natural.

Em contrapartida, em células do colostro de mãe com obesidade, a presença do TNF- α aumentou a capacidade microbicida, independente da do tratamento com TMB-8, mostrando ser um ótimo modulador uma vez que células de mães com excesso apresentam maior comprometimento devido a inflamação de baixo grau característica da obesidade (MORAIS et al., 2019b). É importante ressaltar que o TMB-8 em células de mães eutróficas, reduziu a atividade microbicida para a bactéria, sugerindo os fagócitos do colostro respondem por mecanismos distintos em mães eutróficas e com excesso de peso. Mais estudos devem ser realizados no sentido de elucidar o papel do cálcio intracelular em células do colostro de mães eutróficas, bem como a possível interferência da inflamação de baixo grau ocasionada pelo excesso de peso pode alterar esse mecanismo de ativação, uma vez que em mães com obesidade

esse efeito não foi evidenciado

Um estudo com o uso de TNF- α exógeno em células neuronais não se mostrou ser diretamente tóxico às células com metade da dose apresentada nesse estudo (50ng/mL), mesmo em duas doses distintas com intervalo de 3 dias e além disso, induziu a fagocitose microglial (NENISKYTE; VILALTA; BROWN, 2014). O uso de bloqueadores de TNF- α representou uma redução da atividade microbicida de monócitos em resposta à *Micobacterium tuberculosis* (BRUNS et al., 2009). Além disso, o tempo de incubação também pode afetar a capacidade microbicida das células MN e PMN do colostro (FRANÇA-BOTELHO et al., 2007).

Outro ponto importante é de que um dos mecanismos de evasão da EPEC, é a inibição da resposta inflamatória pelo organismo, inclusive bloqueando o TNF- α (PEARSON et al., 2016), portanto, a própria bactéria em si é um fator relevante em uma possível interferência nos resultados obtidos neste estudo.

Para compreender qual o mecanismo intracelular é utilizado durante a fagocitose da EPEC pelos fagócitos do colostro no presente estudo, foi realizada uma análise da liberação de cálcio intracelular. O objetivo foi analisar se a citocina TNF- α também era capaz de aumentar a liberação de cálcio intracelular pelas células. Esse resultado elucidou se o mecanismo de ocorrência da fagocitose neste grupo e análise era dependente ou não do cálcio (Figura 8). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, mesmo na presença de TNF- α e do bloqueador de cálcio TMB-8.

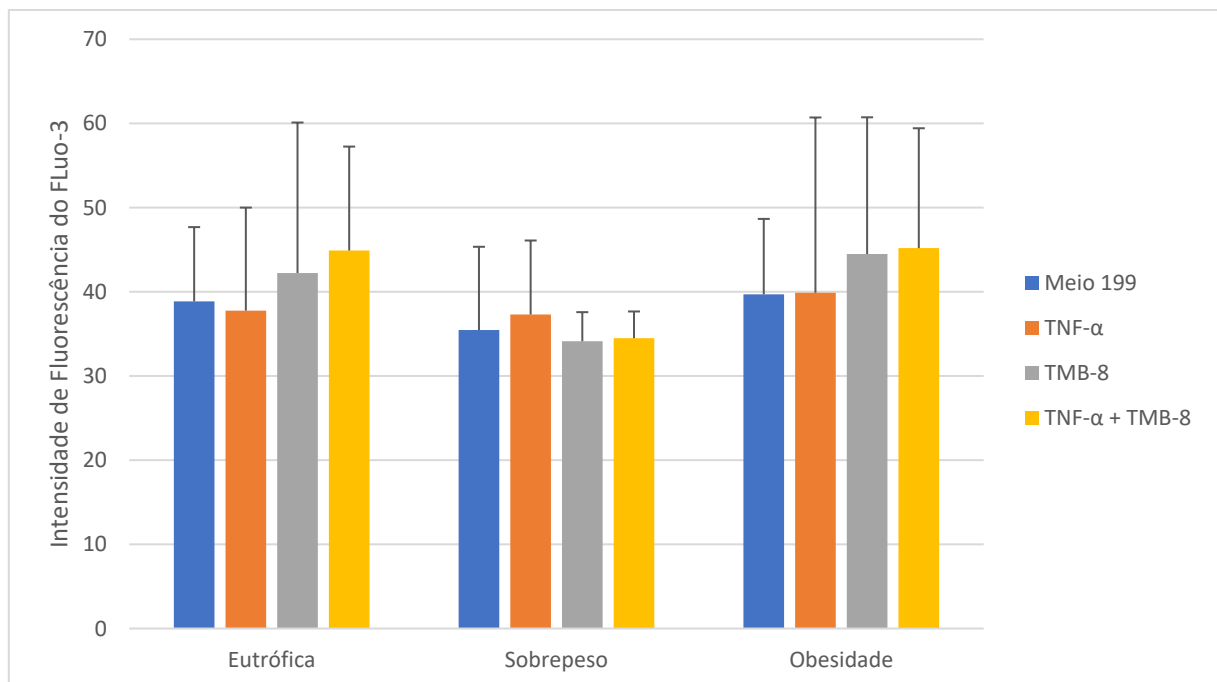


Figura 8 - Liberação de cálcio intracelular Ca^{2+} pelas células MN do colostro humano de mães com peso normal, sobrepeso e obesidade tratadas ou não com TNF- α . A liberação está indicada como média geométrica da intensidade de fluorescência liberada pelas células. As células foram incubadas com marcador fluorescente Fluo-3 AM e analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA).

Os níveis de cálcio intracelular estão muito relacionados com o controle de vários processos celulares. Podemos citar a ativação, proliferação e também morte celular através da indução do processo de apoptose, da ativação de enzimas catabólicas e produção de radicais livres (FERRARI et al., 2002), e também o processo de fagocitose (NUNES; DEMAUREX, 2010; ZUMERLE et al., 2019).

O receptor do tipo Fc é o principal associado com a fagocitose e com a sinalização do cálcio intracelular. No entanto, em alguns tipos celulares, como monócitos e neutrófilos, esse eixo de resposta nem sempre é sensível ao cálcio (NUNES; DEMAUREX, 2010). Além disso, as taxas de cálcio intracelular são facilmente alteradas de acordo com mínimos estímulos externos como hormônios, citocinas e metais (FAGUNDES et al., 2012; 2013; MORCELI et al., 2013; MORES et al., 2015), em especial em células do colostro humano.

Apesar de outros estudos apresentarem que a liberação de cálcio intracelular é maior no grupo de mães com maior IMC (MORAIS et al., 2019b), nossos resultados não apresentaram diferença entre os estados nutricionais e nem na presença ou ausência de TNF- α . Outras citocinas, como a IFN- γ e TGF- β , também não mostraram efeitos modulatórios sobre a liberação de cálcio intracelular em células MN do colostro de mães diabéticas (FAGUNDES et al., 2013).

Outro ponto importante é que, o uso de TMB-8 que é um inibidor de cálcio intracelular, em alguns casos é capaz de reduzir significativamente seus níveis mesmo sem nenhum tipo de tratamento ou estímulo (MORCELI et al., 2013). As divergências com resultados encontrados no presente trabalho podem estar relacionadas com o fato de que a fagocitose nesse caso não ser sensível ao cálcio e sim a outros tipos de comunicação, o que abre um leque para investigações futuras objetivando elucidar o mecanismo intracelular dessa resposta.

Esses resultados reforçam a importância dos verificados no presente trabalho uma vez que o TNF- α mostrou potencializar o índice microbicida de forma mais intensa no grupo obeso, que segundo a literatura é o que sofre maior comprometimento das funções imunológicas celulares decorrentes da obesidade (MORAIS et al., 2019a). Além disso, o TMB-8 utilizado com o objetivo de identificar o mecanismo pelo qual a fagocitose nesse grupo ocorre, nos apresenta que, especificamente neste modelo de estudo o cálcio não é fator determinante para que a resposta imunológica ocorra.

Considerando que o TNF- α foi utilizado de maneira exógena em doses nanométricas, ele não interfere de modo sistêmico no indivíduo, não exacerbando a resposta inflamatória, mas apenas de forma local com a função de ativação de macrófagos. Assim, os resultados apresentados sugerem que o TNF- α pode ser utilizada como potencial imunomodulador de

fagócitos do colostro humano em mães com obesidade.

Pelo exposto, o TNF- α apresentou-se como um possível modulador da atividade funcional de fagócitos do colostro humano em mães com obesidade. Considerando que a dose nanométrica, sugere-se que esta citocina futuramente possa ser utilizada como uma alternativa terapêutica. Além disso, o modelo de estudo aqui apresentado não mostrou ser dependente de cálcio intracelular, sugerindo que esse processo de fagocitose ocorre por outro mecanismo intracelular, já que mesmo após o uso de TMB-8 a resposta imunológica continuou ativa e eficiente.

Uma possibilidade é de que o próprio colostro esteja conferindo uma proteção para os efeitos do bloqueador de cálcio, caso esta seja a hipótese correta, uma análise de outros mecanismos se apresenta necessária. Reforça-se, portanto, que a amamentação seja amplamente promovida e apoiada visando uma proteção tanto materna quanto do recém-nascido mesmo na presença de doenças crônicas como a obesidade.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível avaliar os efeitos do TNF- α e do TMB-8 sobre a viabilidade celular de células mononucleares e atividade funcional de fagócitos do colostro humano em mães com excesso de peso, sendo possível concluir que:

- ✓ As células mononucleares do colostro em todos os estados nutricionais apresentaram altos índices de viabilidade celular não se alterando mesmo após o tratamento com TNF- α ;
- ✓ Os índices de fagocitose pelas células do colostro dos grupos sobrepeso e obesidade aumentaram após a modulação com o TNF- α , mostrando ser uma citocina com potencial estimulatório. O uso de TMB-8 não interferiu na resposta celular;
- ✓ Em especial, o TNF- α aumentou de maneira mais significativa o índice microbicida em células do colostro do grupo de mães com obesidade, indicando que esse grupo responde fortemente à modulação da citocina. Essa resposta também não foi alterada na presença de TMB-8;
- ✓ O nível de liberação de cálcio intracelular pelas células do colostro, independente do estado nutricional, não se alterou após o tratamento com TNF- α e nem após a presença do bloqueador de cálcio TMB-8. Sugerindo que outros mecanismos possam estar envolvidos nesse tipo de resposta específica.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8a ed. Elsevier Health Sciences Brazil, 2015.
- ALVES, P. *et al.* Risks of Maternal Obesity in Pregnancy: A Case-control Study in a Portuguese Obstetrical Population. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 41, n. 12, p. 682–687, 2019.
- AN, M. J. *et al.* Bovine colostrum inhibits nuclear factor κ B-mediated proinflammatory cytokine expression in intestinal epithelial cells. **Nutrition Research**, v. 29, n. 4, p. 275–280, abr. 2009.
- ANDERSEN, C. J.; MURPHY, K. E.; FERNANDEZ, M. L. Impact of obesity and metabolic syndrome on immunity. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 66-75, 2016.
- BELLINATI-PIRES, R. *et al.* Evaluation of a fluorochrome assay for assessing the bactericidal activity of neutrophils in human phagocyte dysfunctions. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, n. 2, p. 189–196, 1989.
- BERTAZZA, L.; MOCELLIN, S. The Dual Role of Tumor Necrosis Factor (TNF) in Cancer Biology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 29, p. 3337–3352. 2010.
- BILLMEIER, U. *et al.* Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**. Baishideng Publishing Group Co, 2016.
- BOCCOLINI, C. S. *et al.* Breastfeeding during the first hour of life and neonatal mortality. **Jornal de Pediatria**, v. 89, n. 2, p. 131–136, 1 mar. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2015.
- BRUNS, H. *et al.* Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 5, p. 1167–1177, 2009.
- BUESCHER, E. S.; MCWILLIAMS-KOEPPEN, P. Soluble tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptors in human colostrum and milk bind to TNF- α and neutralize TNF- α bioactivity. **Pediatric Research**, v. 44, n. 1, p. 37–42, 1998.
- CATALANO, P. M.; SHANKAR, K. Obesity and pregnancy: Mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. **BMJ**, 2017.
- CHAE, A. *et al.* Bovine colostrum demonstrates anti-inflammatory and antibacterial activity in in vitro models of intestinal inflammation and infection. **Journal of Functional Foods**, v. 28, p. 293–298. 2017.
- CHEN, C.; XU, X.; YAN, Y. Estimated global overweight and obesity burden in pregnant women based on panel data model. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8. 2018.
- CHRISTIAN, P. *et al.* The need to study human milk as a biological system. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 2021.
- COLLADO, M. C. *et al.* Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy

modify the immunomodulatory potential of breast milk. **Pediatric Research**, v. 72, n. 1, p. 77–85, 2012.

COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE. The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion no. 630. Screening for perinatal depression. **Obstetrics and gynecology**, v. 125, n. 5, p. 1268–1271, 2015.

CROXEN, M. A. *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. 2013

DE QUENTAL, O. B. *et al.* Zika Virus Alters the Viscosity and Cytokines Profile in Human Colostrum. **Journal of Immunology Research**, 2019.

DIAS, C. C.; FIGUEIREDO, B. Breastfeeding and depression: A systematic review of the literature. **Journal of Affective Disorders**. Elsevier B.V., 2015.

EMANUELA, F. *et al.* Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012.

ERIKSEN, Kamilla G. *et al.* Human milk composition and infant growth. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 21, n. 3, p. 200-206, 2018.

ERLIANA, U. D.; FLY, A. D. The function and alteration of immunological properties in human milk of obese mothers. **Nutrients**, 2019.

FAGUNDES, D. L. G. *et al.* Immunomodulatory effects of poly (Ethylene glycol) microspheres adsorbed with cortisol on activity of colostrum phagocytes. **International Journal of Pharmacology**, v. 8, n. 6, p. 510–518, 2012.

FAGUNDES, D. L. G. *et al.* The role of cytokines in the functional activity of phagocytes in blood and colostrum of diabetic mothers. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013.

FAIRN, G. D.; GRINSTEIN, S. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. **Trends in Immunology**, 2012.

FERNANDES, A. D. M.; FRANÇA-BOTELHO, A. D. C. Efeito microbicida do leite humano para *Escherichia coli*. **Saúde em Revista**, v. 17, n. 45, p. 11, 2017.

FERRARI, D. *et al.* Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca²⁺ handling in apoptosis. **Cell Calcium**. Elsevier Ltd, 2002.

FIELD, C. J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. **Journal of Nutrition**. American Institute of Nutrition, 2005.

FRANÇA, E. L. *et al.* Human colostrum phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, n. 1, p. 1–7, 2011a.

FRANÇA, E. L. *et al.* Maternal anemia induces changes in immunological and nutritional components of breast milk. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 26, n. 12, p. 1223–1227, 2013.

FRANÇA, E. L. *et al.* Secretory IgA-Fcα receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics. **APMIS**, v. 119, n. 10, p. 710–719, out. 2011b.

- FRANÇA, E. L. *et al.* The effect of melatonin adsorbed to polyethylene glycol microspheres on the survival of MCF-7 cells. **Neuroimmunomodulation**, v. 23, n. 1, p. 27-32, 2015.
- FRANÇA-BOTELHO, A. C. *et al.* Phagocytosis of Giardia lamblia trophozoites by human colostrum leukocytes. **Acta Paediatrica**, v. 95, n. 4, p. 438–443, 2007.
- FU, R. *et al.* Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 3, p. 1422–1434, 2014.
- FUJIMORI, M. *et al.* Changes in the biochemical and immunological components of serum and colostrum of overweight and obese mothers. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 15, n. 1, p. 166, 2015.
- FUJIMORI, M. *et al.* Cytokine and adipokine are biofactors can act in blood and colostrum of obese mothers. **BioFactors**, v. 43, n. 2, p. 243–250, 2016.
- GLOBAL NUTRITION REPORT. **Global Nutrition Report** | Country Nutrition Profiles - Brazil. 2020. Disponível em: <https://globalnutritionreport.org/resources/nutrition-profiles/latin-america-and-caribbean/south-america/brazil/>. Acesso em: 17 abr. 2021.
- GOVERNO DO BRASIL. **Pesquisa do IBGE mostra aumento da obesidade entre adultos**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2020/10/pesquisa-do-ibge-mostra-aumento-da-obesidade-entre-adultos>. Acesso em: 5 nov. 2021.
- GREENBERG, A. S.; OBIN, M. S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 2, p. 461S-465S, 2006.
- HAN, Thang S.; LEAN, Michael EJ. Metabolic syndrome. **Medicine**, v. 43, n. 2, p. 80-87, 2015.
- HARA, C. D. C. P. *et al.* Melatonin nanoparticles adsorbed to polyethylene glycol microspheres as activators of human colostrum macrophages. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013.
- HARTMANN, P. *et al.* Blockade of TNF does not alter oxygen burst and phagocytosis of human neutrophils in patients with rheumatoid arthritis. **Immunobiology**, v. 209, n. 9, p. 669–679, 2005.
- HESS, D. J. *et al.* *Escherichia coli* and TNF- α Modulate Macrophage Phagocytosis of *Candida glabrata*. **Journal of Surgical Research**, v. 155, n. 2, p. 217–224, 2009.
- HONORIO-FRANÇA, A. C. *et al.* Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 46, n. 1, p. 59–66, 1997.
- HONORIO-FRANÇA, A. C. *et al.* Intracellular calcium is a target of modulation of apoptosis in MCF-7 cells in the presence of IgA adsorbed to polyethylene glycol. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 617, 2016.
- HONORIO-FRANÇA, A. C. *et al.* Mechanism Anti-Tumor of IgA-based Delivery System on the Human Colostral Mononuclear Cells via Fc α Receptor. **Biointerface Research in Applied Chemistry**. 2021.
- HOWELL, K. R.; POWELL, T. L. Effects of maternal obesity on placental function and

- fetal development. **Reproduction**, v. 153, n. 3, p. R97–R108, 2017.
- INNIS, Sheila M. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. **The American journal of clinical nutrition**, v. 99, n. 3, p. 734S–741S, 2014.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*. **Nature Publishing Group**, 2004.
- KELISHADI, R.; FARAJIAN, S. The protective effects of breastfeeding on chronic non-communicable diseases in adulthood: A review of evidence. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, n. 1, p. 3, 2014.
- KERRIGAN, A. M.; BROWN, G. D. C-type lectins and phagocytosis. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 562–575, 2009.
- KIM, D. W. *et al.* Obesity During Pregnancy Disrupts Placental Morphology, Cell Proliferation, and Inflammation in a Sex-Specific Manner Across Gestation in the Mouse1. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 6, p. 130–131, 2014.
- KLEBANOFF, S. J. *et al.* Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 11, 1986.
- LI, K.; UNDERHILL, D. M. C-Type Lectin Receptors in Phagocytosis. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, v. 429p. 1–18, 2020.
- MARSEGLIA, L. *et al.* Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. **International Journal of Molecular Sciences**. 2015.
- MARTINS, L. M. *et al.* Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p. 677–692, 2014.
- MASSMANN, P. F. *et al.* Maternal hypertension induces alterations in immunological factors of colostrum and human milk. **Frontiers in Life Science**, v. 7, n. 3–4, p. 155–163, 2013.
- MEHTA, A. K.; GRACIAS, D. T.; CROFT, M. TNF activity and T cells. **Cytokine**, v. 101, p. 14–18, 2018.
- MEYER, L. K. *et al.* Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. **Adipocyte**, v. 2, n. 4, p. 217–226, 2013.
- MORAIS, T. C. *et al.* Melatonin Action on the Activity of Phagocytes from the Colostrum of Obese Women. **Medicina**, v. 55, n. 10, p. 625, 2019b.
- MORAIS, T. C. *et al.* Obesity as an Inflammatory Agent Can Cause Cellular Changes in Human Milk due to the Actions of the Adipokines Leptin and Adiponectin. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 519, 2019a.
- MORAIS, T. C. *et al.* Temporal fluctuations of cytokine concentrations in human milk. **Biological Rhythm Research**, v. 46, n. 6, p. 811–821, 2015.
- MORCELI, G. *et al.* Antioxidant Effect of Melatonin on the Functional Activity of Colostral Phagocytes in Diabetic Women. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56915, 2013.
- MORES, L. *et al.* Nanoparticles of barium induce apoptosis in human phagocytes.

- International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 6021, 2015.
- NECZYPOR, J. L.; HOLLEY, S. L. Providing Evidence-Based Care During the Golden Hour. **Nursing for Women's Health**, v. 21, n. 6, p. 462–472, 2017.
- NENISKYTE, U.; VILALTA, A.; BROWN, G. C. Tumour necrosis factor alpha-induced neuronal loss is mediated by microglial phagocytosis. **FEBS Letters**, v. 588, n. 17, p. 2952–2956, 2014.
- NHS. **Obesity**. Disponível em: <https://www.nhs.uk/conditions/obesity/>. Acesso em: 11 abr. 2021.
- NIEMAN, D. C. *et al.* Influence of obesity on immune function. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 3, p. 294–299, 1999.
- NUNES, P.; DEMAUREX, N. The role of calcium signaling in phagocytosis. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 1, p. 57-68, 2010.
- OMS. **Obesity and overweight**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 18 abr. 2021.
- OMS. **Obesity**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1. Acesso em: 18 abr. 2021.
- PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. Immunology of breast milk. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 2016.
- PEARSON, J. S. *et al.* The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. **Annual Review of Genetics**, v. 50, n. 1, p. 493–513, 2016.
- PEREIRA, Q. L. C. *et al.* Human colostrum action against *Giardia lamblia* infection influenced by hormones and advanced maternal age. **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1783–1791, 2018.
- PONTES, G. N. *et al.* Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - Melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 41, n. 2, p. 136–141, 2006.
- QAZI, S. *et al.* Ending preventable child deaths from pneumonia and diarrhoea by 2025. Development of the integrated Global Action Plan for the Prevention and Control of Pneumonia and Diarrhoea. **Archives of Disease in Childhood**, v. 100, p. S23–S28, 2015.
- REA, M. F. Os benefícios da amamentação para a saúde da mulher. **Jornal de Pediatria**, v. 80, 2004.
- RITCHIE, H.; ROSER, M. **Obesity**. In: Our World in Data. Disponível em: <https://ourworldindata.org/obesity>. Acesso em: 21 abr. 2021.
- SAVINI, I.; GASPERI, V.; CATANI, M. V. Oxidative Stress and Obesity. In: Obesity. Cham: **Springer International Publishing**, p. 65–86, 2016.
- SCHUERWEGH, A. J. *et al.* Influence of pro-inflammatory (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, n. 9, p. 681–687, 2003.
- SEGOVIA, S. A.; VICKERS, M. H.; REYNOLDS, C. M. The impact of maternal obesity on inflammatory processes and consequences for later offspring health outcomes.

Journal of Developmental Origins of Health and Disease. Anais of Cambridge University Press, 2017.

SHARMA, D.; SHARMA, P.; SHASTRI, S. Golden 60 minutes of newborn's life: Part 2: Term neonate. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.** 2017.

SILVA, J. C. *et al.* Obesidade materna e suas consequências na gestação e no parto: uma revisão sistemática. **FEMINA**, vol. 42, nº3, 2014.

SILVA, L. C. R.; ORTIGOSA, L. C. M.; BENARD, G. Anti-TNF- α agents in the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: Mechanisms of action and pitfalls. **Immunotherapy Future Medicine.** UK, 2010.

SILVA, N. A. *et al.* Bioactive Factors of Colostrum and Human Milk Exhibits a Day-Night Variation. **American Journal of Immunology**, v. 9, n. 2, p. 68–74, 2013.

TAYLOR, P. R. *et al.* Macrophage Receptors And Immune Recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 901–944, 2005.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772–783, 15 out. 2006.

UNICEF; WHO. **Diarrhoea** - Why children are still dying and what can be done: UNICEF and WHO launch report on the second greatest killer of children. Disponível em: https://www.unicef.org/media/media_51407.html. Acesso em: 15 abr. 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. **Aleitamento materno:** Prevalência e práticas de aleitamento materno em crianças brasileiras menores de 2 anos 4: ENANI 2019. - Documento eletrônico. - Rio de Janeiro, RJ: UFRJ, 2021. (108 p.). Coordenador geral, Gilberto Kac. Disponível em: <https://enani.nutricao.ufrj.br/index.php/relatorios/>. Acesso em: 12 dez 2021.

VASUDEVAN, C.; RENFREW, M.; MCGUIRE, W. Fetal and perinatal consequences of maternal obesity. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, 2011.

VICTORA, C. G. *et al.* Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **The Lancet:** Lancet Publishing Group. 2016.

WHO. World Health Organization. Division of Noncommunicable diseases. Programme of Nutrition Family and Reproductive Health. **Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a WHO Consultation on Obesity.** WHO: Geneva. 1999.

WHO. World Health Organization. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry.** Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995.

ZUMERLE, S. *et al.* Intercellular Calcium Signaling Induced by ATP Potentiates Macrophage Phagocytosis. **Cell Reports**, v. 27, n. 1, p. 1- 10.e4, 2019

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

I - TÍTULO DA PESQUISA: AVALIAÇÃO DE COMPONENTES SOLÚVEIS E CELULARES DE LEITE E SANGUE MATERNO.

1. Pesquisadores e instituições envolvidas: Profa. Dra. Adenilda Cristina Honorio-França - Campus Universitário do Araguaia - Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

2. Justificativa e objetivos: Avaliar componentes imunológicos presentes no colostro e sangue materno de mães com excesso de peso e sorologia positiva para giardíase. Por este motivo, para o desenvolvimento deste projeto, será necessário a coleta de leite materno (colostro) e sangue para avaliarmos se a parasitose e o excesso de peso podem influenciar na atividade de determinados componentes do sistema de defesa materno.

3. Procedimentos: Coleta de sangue, em um volume aproximado de 8 ml, por punção venosa e coleta de leite humano (colostro) excedente, cerca de 12 ml, por ordenha manual (retirada manual do leite, através de massagem e expressão das mamas).

4. Possíveis riscos e desconforto: Os riscos e desconforto são mínimos, pois a coleta de sangue e colostro é feita com técnica adequada por profissionais devidamente habilitados e com materiais descartáveis, mas poderá haver certo desconforto, resultante da expressão manual das mamas. Em caso de relato de qualquer incômodo, a coleta será interrompida imediatamente.

5. Benefícios previstos: Para as atuais participantes do estudo: incentivo à amamentação, assistência e orientações sobre a amamentação, melhora nos conhecimentos sobre os mecanismos de defesa imunológica presentes no leite, que são passados aos seus filhos durante a amamentação. Acredita-se que o benefício a ser obtido será um melhor conhecimento sobre a influência da giardíase e excesso de peso na qualidade do leite materno e seus componentes imunológicos, favorecendo o desenvolvimento de condutas futuras que poderão beneficiar as pacientes, evitando maiores riscos aos recém-nascidos.

Eu.....
fui informada dos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios desta pesquisa, descritos acima. Entendo que terei garantia de confidencialidade, ou seja, que apenas os resultados dos exames realizados com o sangue e leite materno serão divulgados e ninguém, além dos pesquisadores, terá acesso aos nomes dos participantes desta pesquisa. Entendo também, que tenho direito de receber, sempre que desejar, outras informações sobre o estudo, entrando em contato com as alunas pesquisadoras. Fui informada ainda, que a minha participação é voluntária e que, se eu preferir não participar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento, isso NÃO influenciará no meu atendimento junto ao Hospital. Compreendendo tudo o que me foi explicado sobre o estudo e, estando de acordo em participar, assino embaixo.

Assinatura do participante (ou do responsável, se menor):

Assinatura do pesquisador principal:

_____, ____/____/20____.

Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório-França. Rodovia BR-070, Km 5. Barra do Garças - Mato Grosso. CEP: 78600-000. E-mail: adrieleaqueiroz@hotmail.com

Alunas Pesquisadoras: Adriele Ataidés de Queiroz – 66 99214-8601;

Gabriella Regina Borges Gadenz – 65 999095252.



ANEXO B

UFMT - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MATO GROSSO -
CAMPUS DO ARAGUAIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DA OBESIDADE E DIABETE NA RELAÇÃO MATERNO-FETAL: REPERCUSSÕES NEUROIMUNOENDÓCRINAS.

Pesquisador: Adenilda Cristina Honorio França

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 87435318.2.0000.5587

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.619.235

Apresentação do Projeto:

O projeto está bem apresentado e possui data de início para 01/06/2018.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo primário do presente projeto é "Avaliar parâmetros imunológicos e hormonais, bem como os efeitos de colostrina, resistina e da melatonina sobre a atividade funcional de fagócitos presentes em sangue materno, sangue de cordão e colostro de mães obesas complicadas por diabete".

Também apresenta como Objetivo Secundário: "Avaliar no sangue e colostro de mães obesas e diabéticas a concentração de: Resistina Colostrina e melatonina; Citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, TNF, IFN-, TGF-); Quimiocinas (MCP-1, IL-8) Superóxido dismutase (SOD)- Avaliar a atividade funcional de fagócitos do sangue e do colostro de mães obesas e diabéticas na presença de resistina, colostrina e melatonina sobre a: Viabilidade celular Liberação de ânion superóxido; Liberação de cálcio intracelular Apoptose e Necrose".

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS
Bairro: Campus do Araguaia
UF: MT
Telefone: (66)3402-1121
CEP: 78.698-000
Município: PONTAL DO ARAGUAIA
E-mail: professoramaryaugusta@gmail.com

Prof. Aracy

UFMT - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MATO GROSSO -
CAMPUS DO ARAGUAIA



Continuação do Parecer: 2.619.235

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são definidos pelos pesquisadores como "mínimos" e estão apresentados no TCLE. Quanto aos benefícios, são relatados que: "As principais contribuições científicas da proposta é que visa elucidar o entendimento dos fatores neuroimunoendócrino presentes no sangue e leite materno de mães obesas e diabéticas com vistas a melhoria da qualidade de vida de mães obesas e diabéticas".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verifico que a temática estudada nesse projeto é de grande importância, visto que a obesidade e diabetes constituem patologias de grande frequência nos dias atuais e a relação destas com a gestação ainda precisa ser estudada. Iniciativas que busquem a prevenção de agravos durante o período da gestação devem ser incentivadas para contribuir com o enfrentamento desses problemas de saúde pública.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta o Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), citando os objetivos, riscos e benefícios da presente pesquisa.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou favorável a aprovação do presente projeto e submeto meu parecer ao colegiado do Comitê de Ética local.

Considerações Finais a critério do CEP:


Projeto aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1070539.pdf	20/04/2018 14:16:48		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_R.docx	20/04/2018 14:16:17	Adenilda Cristina Honorio França	Aceito

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS
 Bairro: Campus do Araguaia CEP: 78.698-000
 UF: MT Município: PONTAL DO ARAGUAIA E-mail: professoramarlyaugusta@gmail.com
 Telefone: (66)3402-1121

Amazônia

UFMT - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MATO GROSSO - 
CAMPUS DO ARAGUAIA

Continuação do Parecer: 2.619.235

Justificativa de Ausência	TCLE_R.docx	20/04/2018 14:16:17	Adenilda Cristina Honório França	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP_2018.doc	20/04/2018 14:15:57	Adenilda Cristina Honório França	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	11/04/2018 09:27:22	Adenilda Cristina Honório França	Aceito

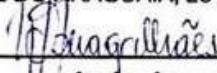
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTAL DO ARAGUAIA, 25 de Abril de 2018



Assinado por:

Marly Augusta Lopes de Magalhães
(Coordenador)

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS

Bairro: Campus do Araguaia

CEP: 78.698-000

UF: MT

Município: PONTAL DO ARAGUAIA

Telefone: (66)3402-1121

E-mail: professoramarlyaugusta@gmail.com