

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

**EFEITO DO LEITE MATERNO NA PREVENÇÃO
DA RETINOPATIA DA PREMATURIDADE**

TESE DE DOUTORADO

LUCIANA TEIXEIRA FONSECA

Porto Alegre, Brasil
2016

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

EFEITO DO LEITE MATERNO NA PREVENÇÃO DA RETINOPATIA DA PREMATURIDADE

LUCIANA TEIXEIRA FONSECA

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Soibermann Procianoy
Co-Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Silveira

Porto Alegre, Brasil
2016

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

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

24 DE MAIO DE 2016

E FOI AVALIADA PELA BANCA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Pedro Celiny Ramos Garcia

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo José Cauduro Maróstica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dra. Andrea Lúcia Corso

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Fonseca, Luciana Teixeira
EFEITO DO LEITE MATERNO NA PREVENÇÃO DA
RETINOPATIA DA PREMATURIDADE / Luciana Teixeira
Fonseca. -- 2016.
172 f.

Orientador: Renato Soibelman Procianoy.
Coorientadora: Rita de Cássia Silveira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Retinopatia da Prematuridade. 2. Leite Materno. 3. Recém-nascido de muito baixo peso. 4. IGF-1. 5. Prematuridade. I. Procianoy, Renato Soibelman, orient. II. Silveira, Rita de Cássia, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico esta tese ao meu marido Ciarlo e aos meus filhos Bernardo e Carolina, que dão sentido maior à minha vida.

Agradecimentos

- Aos meus pais **Paulo Rogerio Paim Teixeira** e **Marisa Helena Montagna Teixeira**, incentivadores sempre em minha vida.
- Ao meu marido **Ciarlo Barragana Fonseca**, por todo apoio, companheirismo e amor, indispensáveis para eu concluir esta tese.
- Aos meus filhos **Bernardo Teixeira Fonseca** e **Carolina Teixeira Fonseca**, por me fazerem sentir feliz e realizada todos os dias.
- À **equipe da UTI Neonatal do Hospital da Criança Conceição**, em especial à **Dra. Denise Senna**, que ao dividir comigo a coleta de dados tornou mais leve essa etapa tão desgastante do trabalho.
- À **Vania Naomi Hirakata**, pelo auxílio na análise estatística.
- À **Rosane Blanguer**, secretária do PPGSCA pelo apoio.
- Aos **pacientes e seus familiares** pela confiança em participar desta pesquisa.
- Ao **Dr. Renato Soibermann Procianoy**, pela excelente orientação, competência e disponibilidade, atendendo sempre prontamente aos meus questionamentos.
- À **Dra. Rita de Cássia Silveira** pelo apoio, incentivo e amizade.

*“Não deixe de fazer algo de que gosta
devido à falta de tempo...
A única falta que terá será a desse tempo
que, infelizmente, nunca mais voltará”.*
(Mário Quintana)

RESUMO

Introdução: A retinopatia da prematuridade (ROP) é uma das principais causas de cegueira e morbidade visual na infância. É uma doença ocular vasoproliferativa secundária à vascularização inadequada da retina dos recém-nascidos (RNs) prematuros (PMTs), cuja etiologia é multifatorial e não está completamente elucidada. Dentre os fatores implicados na sua patogênese estão a exposição da retina em desenvolvimento a níveis anormais de oxigênio e a deficiência do fator de crescimento insulínico-1 (*insulin-like growth factor-1, IGF-1*). O leite materno (LM) contém *IGF-1* e pode ter um efeito protetor contra o desenvolvimento da ROP.

Objetivos: Avaliar o possível efeito protetor do LM contra a ROP, através da comparação da quantidade de LM recebida entre os pacientes que desenvolveram ROP e aqueles livres da doença. Tentar determinar a quantidade mínima necessária e o momento em que o RN precisa receber o LM para que esse efeito seja significativo.

Pacientes e métodos: Estudo de coorte observacional incluindo RNs com peso de nascimento (PN) inferior a 1500 gramas e / ou com idade gestacional (IG) inferior a 32 semanas, nascidos no período de janeiro de 2011 a outubro de 2014 e internados nas primeiras 24 horas de vida na UTI Neonatal do Hospital da Criança Conceição (HCC) em Porto Alegre.

Resultados: A prevalência da ROP em qualquer grau foi de 31% (100 casos em 323 pacientes) e a de ROP grave foi de 9% (29 casos em 323 pacientes). A mediana da quantidade de LM recebida pelos pacientes foi de 10,2mL/kg/dia entre os pacientes sem ROP (amplitude interquartil 1,5-25,5) e de 4,9 mL/kg/dia entre os pacientes com ROP (0,3-15,4). A quantidade de LM recebida nas primeiras seis semanas de vida foi inversamente associada à incidência de ROP em qualquer grau e de ROP grave nas

análises univariadas, mas a significância estatística não se manteve após análise multivariada para controle de fatores confundidores na maioria dos períodos avaliados, exceto na sexta semana de vida.

Conclusão: Pequenas quantidades de LM não são suficientes para prevenção de ROP em PMTs de risco para a doença.

Palavras-chave: Retinopatia da prematuridade e leite materno.

ABSTRACT

Introduction: Retinopathy of prematurity (ROP) is one of the major causes of blindness and visual morbidity in childhood. It is a vasoproliferative eye disease secondary to inadequate vascularization of the retina in premature neonates. Its etiology is multifactorial and it is not completely elucidated. The exposure of the developing retina to abnormal oxygen levels and the deficiency of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) are among the factors involved in its pathogenesis. Breast milk (BM) contains IGF-1 and may have a protective effect against the development of ROP.

Objectives: To evaluate the possible protective effect of BM against ROP by comparing the amount of breast milk received among patients who developed ROP and those who were disease-free. To attempt to determine both the required minimum amount and the time in which a neonate needs to receive BM for this effect to be significant.

Patients and methods: Observational cohort study of newborns with a birth weight below 1500 grams and/or gestational age less than 32 weeks, born from January 2011 to October 2014 and hospitalized within their first 24 hours of life in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) at the Hospital da Criança Conceição (HCC), in Porto Alegre, Brazil.

Results: The prevalence of ROP at any degree was of 31% (100 cases in 323 patients) and of severe ROP was of 9% (29 cases in 323 patients). The median amount of BM received by patients was 10.2 mL/kg/day among patients without ROP (interquartile range 1.5-25.5) and 4.9 mL/kg/day among patients with ROP (0.3-15.4). The amount of breast milk received in the first six weeks of life was inversely associated with the incidence of ROP in any degree and of severe ROP in the univariate analyses. The statistical significance was not maintained after a multivariate analysis to control for confounding

factors in the majority of the periods evaluated, except in the sixth week of life.

Conclusion: Small amounts of BM are not enough to prevent ROP in premature newborns at risk of the disease.

Keywords: Retinopathy of prematurity, breast milk.

LISTA DE FIGURAS

Tese

Figura 1- Representação esquemática do fundo de olho	24
Figura 2- Estágio 1: Linha de demarcação	24
Figura 3- Estágio 2: Crista elevada	25
Figura 4- Estágio 3: Proliferação fibrovascular a partir da crista	25
Figura 5- Estágio 4a: Descolamento de retina extrafoveal	26
Figura 6- Estágio 4b: Descolamento de retina incluindo a fóvea	26
Figura 7- Estágio 5: Descolamento total da retina	27
Figura 8- Doença plus	27

Artigo 3

Figura 1- Curva ROC	153
---------------------------	-----

Artigo 3 em inglês

Figure 1- ROC Curve	171
---------------------------	-----

LISTA DE TABELAS

Tese

Tabela 1- Classificação Internacional da ROP	23
Tabela 2- Indicação de tratamento	28

Artigo 1

Tabela 1 – Comparação entre pacientes incluídos no estudo e óbitos antes de completar avaliação oftalmológica	74
Tabela 2- Associação entre fatores estudados e ROP na análise univariada	75
Tabela 3- Fatores significativamente associados à ROP na análise multivariada	76
Tabela 4- Associação entre fatores estudados e ROP grave na análise univariada	77
Tabela 5- Fatores significativamente associados à ROP grave na análise multivariada	78

Artigo 1 em inglês

Table 1 – Comparison between patients included in the study and deaths before completing ophthalmologic evaluation	94
Table 2- Association between the variables studied and ROP in the univariate analysis	95
Table 3- Variables significantly associated with ROP in the multivariate analysis	96
Table 4- Association between the variables studied and severe ROP in the univariate analysis	97
Table 5- Risk factors significantly associated with severe ROP in the multivariate analysis	98

Artigo 2

Tabela 1- Fatores significativamente associados à ROP na análise	
--	--

univariada	113
Tabela 2- Fatores significativamente associados à ROP na análise multivariada	114
Tabela 3- Fatores significativamente associados à ROP grave na análise univariada	115
Tabela 4- Fatores significativamente associados à ROP grave na análise multivariada	116

Artigo 2 em inglês

Table 1- Variables significantly associated with ROP in the univariate analysis	130
Table 2- Variables significantly associated with ROP in the multivariate analysis	131
Table 3- Risk factors significantly associated with severe ROP in the univariate analysis	132
Table 4- Risk factors significantly associated with severe ROP in the multivariate analysis	133

Artigo 3

Tabela 1- Associação entre fatores estudados e DBP na análise univariada	151
Tabela 2- Fatores significativamente associados à DBP na análise multivariada	152

Artigo 3 em inglês

Table 1- Association between the factors studied and BPD in univariate analysis	169
Table 2- Factors significantly associated with BPD in multivariate analysis	170

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHAD	Concentrado de hemácias
CPAP	<i>Continuous positive airway pressure</i> – Pressão positiva contínua nas vias aéreas
CTC	Corticóide
DBP	Displasia broncopulmonar
ECN	Enterocolite necrosante
FL	Fórmula láctea
HCC	Hospital da Criança Conceição
HNSC	Hospital Nossa Senhora da Conceição
HPIV	Hemorragia peri-intraventricular
IC	Intervalo de confiança
IG	Idade gestacional
<i>IGF-1</i>	<i>Insulin-like growth factor-1</i> – Fator de crescimento insulínico tipo 1
LM	Leite materno
NPT	Nutrição parenteral total
O ₂	Oxigênio
OR	<i>Odds Ratio</i> – Razão de chances
PCA	Persistência do canal arterial
PMT	Prematuro
RN	Recém-nascido
RNEBP	Recém-nascido de extremo baixo peso
RNMBP	Recém-nascido de muito baixo peso
ROP	Retinopatia da prematuridade
SDR	Síndrome do desconforto respiratório
<i>SNAPPE II</i>	<i>Score for neonatal acute physiology perinatal extension II</i> – Escore para fisiologia neonatal aguda com extensão perinatal II
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UTI	Unidade de terapia intensiva
<i>VEGF</i>	<i>Vascular endothelial growth factor</i> – Fator de crescimento endotelial vascular
VM	Ventilação mecânica

Nota: Algumas siglas foram mantidas na sua versão original, em inglês, por serem assim mundialmente reconhecidas.

SUMÁRIO

1- Introdução	16
2- Revisão da literatura	19
2.1- A Retinopatia da Prematuridade	19
2.2- O papel do <i>IGF-1</i>	29
2.3- O Leite Materno	31
2.4- O <i>IGF-1</i> no Leite Materno	33
2.5- Associação entre ROP e ingesta de LM	34
3- Justificativa	38
4- Objetivos	39
4.1- Objetivo geral	39
4.2- Objetivos específicos	39
5- Metodologia	40
5.1- Delineamento da pesquisa	40
5.2- População	40
5.3- Critérios de exclusão	40
5.4- Variáveis estudadas	40
5.5- Logística	43
5.6- Processamento e Análise de Dados	43
6- Aspectos Éticos	46
7- Referências	47
8- Artigo 1- Efeito do Leite Materno na Prevenção da Retinopatia da Prematuridade	58
9- Artigo 1 em inglês	79
10- Artigo 2- Sepses Fúngicas como Fator de Risco Independente para Retinopatia da Prematuridade	99
11- Artigo 2 em inglês	117
12- Artigo 3- Associação entre Ingesta de Leite Materno e Desenvolvimento de Displasia Broncopulmonar	134
13- Artigo 3 em inglês	154
14- Conclusões	172
15- Apêndices	174
Apêndice 1- Protocolo da pesquisa	174
Apêndice 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	176

1- INTRODUÇÃO

A retinopatia da prematuridade (ROP) é uma doença com potencial de causar cegueira que está se tornando mais prevalente com a melhoria dos serviços neonatais em muitos países nos últimos anos (QUINN *et al.*, 2010). É uma doença ocular vasoproliferativa secundária à vascularização incompleta da retina dos prematuros (PMTs) (FIELDER E REYNOLDS, 2001).

O curso natural da ROP pode levar à cegueira, causando um peso social e financeiro para a sociedade. A visão irreversivelmente prejudicada também impede o desenvolvimento cognitivo e psicomotor adequado das crianças afetadas (WHEATLEY *et al.*, 2002).

A etiologia é multifatorial e não está completamente elucidada. Dentre os fatores implicados na sua patogênese estão a exposição da retina em desenvolvimento a níveis anormais de oxigênio (CAMPBELL, 1951; PATZ *et al.* 1952; PATZ, 1975) e a deficiência do fator de crescimento insulínico-1 (*insulin-like growth factor-1, IGF-1*) (HELLSTROM *et al.*, 2001).

O leite humano contém *IGF-1* (OZGURTAS *et al.*, 2010), portanto pode ter um efeito protetor contra o desenvolvimento da ROP.

A associação entre ingesta de leite materno (LM) e ROP já foi estudada, com resultados conflitantes. Hylander e cols. encontraram menor incidência de ROP entre RNs de muito baixo peso (RNMBP, PN <1500 gramas) alimentados com LM quando comparados aos alimentados exclusivamente com fórmula láctea (FL) (HYLANDER *et al.*, 2001). Heller e cols. não encontraram associação entre ingesta de LM e risco reduzido de ROP grave (tratada cirurgicamente) em recém-nascidos (RNs) de extremo baixo peso (RNEBP, PN <1000 gramas) (HELLER *et al.*, 2007). Kao e cols. compararam a

incidência de ROP entre RNs que receberam LM em qualquer quantidade versus RNs que receberam exclusivamente FL e não encontraram associação significativa entre alimentação com LM e risco de ROP (KAO *et al.*, 2011). Manzoni e cols. compararam RNs que receberam LM exclusivo com RNs que receberam apenas FL para PMT e a incidência de ROP em qualquer estágio foi significativamente mais baixa em RNs alimentados com LM (MANZONI *et al.*, 2013). O motivo destas divergências pode estar na quantidade de LM recebida e no momento em que o PMT recebe este leite. Até hoje não se estudou a quantidade diária de LM recebida pelos RNs com e sem ROP. A maioria dos estudos compara RNs que receberam LM exclusivo com RNs com alimentação mista ou com FL exclusiva ou RNs que recebem LM em qualquer quantidade com aqueles com FL exclusiva. É possível que o efeito protetor do LM só se manifeste quando ingerido em quantidades maiores, ou ainda em um momento determinado, possivelmente nas primeiras semanas de vida, quando a deficiência de *IGF-1* está relacionada com ROP (HELLSTROM *et al.*, 2001).

Publicações recentes reforçaram a hipótese de que o LM realmente tem efeito protetor contra ROP. Zhou e cols. concluíram em uma metanálise que, com base nas limitadas evidências atuais, em RNs muito prematuros a alimentação com leite humano potencialmente desempenha um papel protetor na prevenção de ROP em qualquer estágio e da ROP grave (ZHOU *et al.*, 2015). Ginovart e cols. demonstraram uma associação entre a exposição precoce a FL em RNMBP e o desenvolvimento de ROP, e sugeriram que uma dieta inicial com leite humano, desprovida de produtos contendo leite de vaca, pode ajudar a prevenir ROP (GINOVART *et al.*, 2016).

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito protetor do LM contra a ROP através da comparação da quantidade de LM recebida entre os pacientes que desenvolveram ROP e entre aqueles livres da doença. Objetiva também determinar a

quantidade mínima necessária e o momento em que o RN precisa receber o LM para que esse efeito seja significativo.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- A Retinopatia da Prematuridade:

A ROP foi primeiramente percebida como importante causa de cegueira nas décadas de 1940 e 1950 em países industrializados, com o aumento da taxa de sobrevivência de bebês PMTs. O fator de risco dominante para esta “primeira epidemia” foi a suplementação irrestrita de oxigênio, sem monitorização (CAMPBELL, 1951; PATZ, 1975). Com a restrição ao uso do oxigênio em meados de 1950, a cegueira decorrente de ROP reduziu, mas houve um aumento concomitante da mortalidade e da paralisia cerebral nos bebês PMTs (CROSS, 1973). Com a melhoria nos cuidados neonatais ao longo das próximas décadas, com métodos cada vez mais precisos de monitorização e melhor manejo das complicações neonatais e perinatais, os bebês menores e mais imaturos passaram a sobreviver, e a cegueira por ROP começou a reemergir, ocasionando a "segunda epidemia da ROP" (FLYNN *et al.*, 1992).

Na última década, um aumento da frequência de cegueira por ROP tem sido documentado em países de renda média e áreas urbanas dos países de baixa renda, onde os cuidados neonatais estão melhorando rapidamente, possibilitando a sobrevivência de bebês menores e mais imaturos. Estudos de crianças nas escolas para cegos sugerem que a ROP está se tornando uma importante causa de cegueira na China, sudeste e sul da Ásia, América Latina e Europa Oriental, especialmente em centros urbanos de industrialização recente. É a "terceira epidemia" de ROP. Suas causas são mistas. Para os locais em que os cuidados são semelhantes aos encontrados em países desenvolvidos, a prematuridade extrema e o peso muito baixo ao nascer são os fatores de risco dominantes. Em outras maternidades, com recursos humanos e tecnológicos limitados, a inadequação do

atendimento neonatal é provavelmente o maior contribuinte para o desenvolvimento da ROP (QUINN *et al.*, 2010).

Os programas de rastreio, incluindo exames de fundo de olho sistemáticos na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal das crianças em situação de risco para a ROP, fornecem a melhor possibilidade de diagnosticar a doença, a fim de estabelecer um tratamento adequado antes da progressão para estágios mais avançados e cegueira. Os critérios de inclusão em programas de rastreio variam muito entre os países. No Brasil, em 2002, foi estabelecido que a triagem para a detecção precoce da ROP deve ser realizada em todos os PMTs com PN <1.500 gramas e / ou idade gestacional (IG) <32 semanas. O exame oftalmológico inicial deve ser realizado entre a quarta e a sexta semana após o nascimento, por meio de oftalmoscopia indireta binocular e após a dilatação da pupila, e repetido de acordo com os achados do exame inicial. A triagem pode também incluir, a critério do neonatologista assistente, os PMTs com maior PN ou IG que estão em maior risco de desenvolver ROP devido às condições clínicas (ZIN *et al.*, 2007; FORTES FILHO *et al.*, 2011).

A frequência da ROP é variável. Um estudo multicêntrico nos Estados Unidos encontrou uma incidência geral de ROP de 68% entre as crianças com PN \leq 1250g (GOOD *et al.*, 2005). A ROP é uma das três principais causas de cegueira na infância neste país (KONG *et al.*, 2012).

No Brasil, a incidência de ROP encontrada entre RNs com PN <1.500 gramas e IG < 32 semanas variou de 25,5 a 53,4% (CARRION *et al.*, 2011; FORTES FILHO *et al.*, 2009); sendo inversamente proporcional ao PN e a IG (LERMANN *et al.*, 2006). Estudo em Porto Alegre encontrou uma incidência de ROP de 48,9% em RNs com PN \leq 1000g e de 18,2% em RNs com PN entre 1000 e 1500g (FORTES FILHO *et al.*, 2009).

Diversos fatores de risco foram associados ao desenvolvimento da ROP. Fortes Filho e cols. estudaram os principais fatores de risco para o desenvolvimento de ROP de acordo com a IG. Entre RNs com IG inferior a 28 semanas, IG, gemelaridade e uso de eritropoetina foram fatores estatisticamente significativos. Nos RNs com IG entre 29 e 32 semanas, IG e necessidade de transfusão sanguínea foram significativos. Entre RNs com IG igual ou maior a 32 semanas, necessidade de ventilação mecânica (VM), seps e necessidade de transfusão sanguínea mostraram-se significativos para ROP. PN e volume de transfusão de sangue foram fatores significativos para a ocorrência de ROP em todos os grupos. Os autores concluíram que os pacientes com menor IG desenvolveram ROP devido à imaturidade geral, enquanto os bebês maiores desenvolveram ROP por serem "mais doentes", com mais comorbidades (FORTES FILHO *et al.*, 2010).

A ROP é uma doença composta por duas fases: uma fase inicial de retardo do crescimento vascular seguida de uma segunda fase de proliferação de vasos. RNs PMTs têm a retina incompletamente vascularizada, com uma zona avascular periférica. Esta primeira fase da ROP ocorre desde o nascimento até a idade pós-menstrual de cerca de 30-32 semanas. Com o desenvolvimento da criança, a retina não vascularizada torna-se cada vez mais metabolicamente ativa, levando à hipóxia tecidual. A segunda fase da ROP é caracterizada pela neovascularização da retina induzida pela hipóxia. Esta fase vasoproliferativa começa em torno de 32-34 semanas de idade pós-menstrual. A hipóxia estimula a produção de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor, VEGF*), conduzindo, nos casos mais graves, o crescimento vascular descontrolado para dentro do vítreo (CHEN *et al.*, 2011).

O *VEGF* tem papel crucial na indução da neovascularização patológica. A hiperóxia mostrou induzir retinopatia em animais recém-nascidos com retinas incompletamente vascularizadas. Isto sugeriu que algum fator regulado pelo oxigênio

estivesse envolvido. A expressão do *VEGF* é regulada pelo oxigênio e se mostrou importante em ambas as fases da ROP (AIELLO *et al.*, 1995). A regulação negativa da expressão de *VEGF* pela hiperóxia pode ser em parte responsável pela vaso-obliteração e cessação do crescimento normal dos vasos da retina de PMTs que desenvolvem ROP (PIERCE *et al.*, 1996).

A Classificação Internacional da ROP definiu a doença de acordo com sua gravidade (estadiamentos 1-5), localização (zonas I-III) e extensão em horas (1-12h), com ou sem doença *plus* (dilatação arteriolar e tortuosidade venosa), cuja presença seria um indicador de atividade da doença (*An international classification of ROP*, 1984; *An international classification of ROP. II*, 1987). Mais recentemente foi publicada uma atualização dessa classificação (*ICROP-revisited*), sendo reconhecida uma forma grave de doença posterior, a delimitação da Zona I e a existência da doença pré-plus (*International Committee for the Classification of ROP*, 2005) (Tabela 1 e Figuras 1-8).

Tabela 1- Classificação Internacional da ROP

Estágio 1	Linha branca e plana que separa a retina vascular da avascular
Estágio 2	Crista elevada
Estágio 3	Proliferação fibrovascular a partir da crista
Estágio 4	A proliferação pode provocar um descolamento de retina subtotal, (4a, extrafoveal; 4b, descolamento incluindo a fôvea)
Estágio 5	Descolamento total de retina (funil aberto ou fechado)
Doença Limiar (se não tratada pode apresentar resultados anatômicos ruins em 50% dos casos)	Retinopatia estágio 3, em zona I ou II, com, pelo menos, cinco horas de extensão contínuas ou oito horas intercaladas, na presença de doença plus (dilatação arteriolar e venodilatação)
Doença pré-limiar tipo 1	Qualquer ROP em zona I com plus (doença posterior agressiva) Estágio 3, zona I, sem plus Estágio 2 ou 3 em zona II, com plus
Doença pré-limiar tipo 2	Estágio 1 ou 2, zona I, sem plus Estágio 3, zona 2, sem plus

Fonte: Zin e colaboradores (2007).

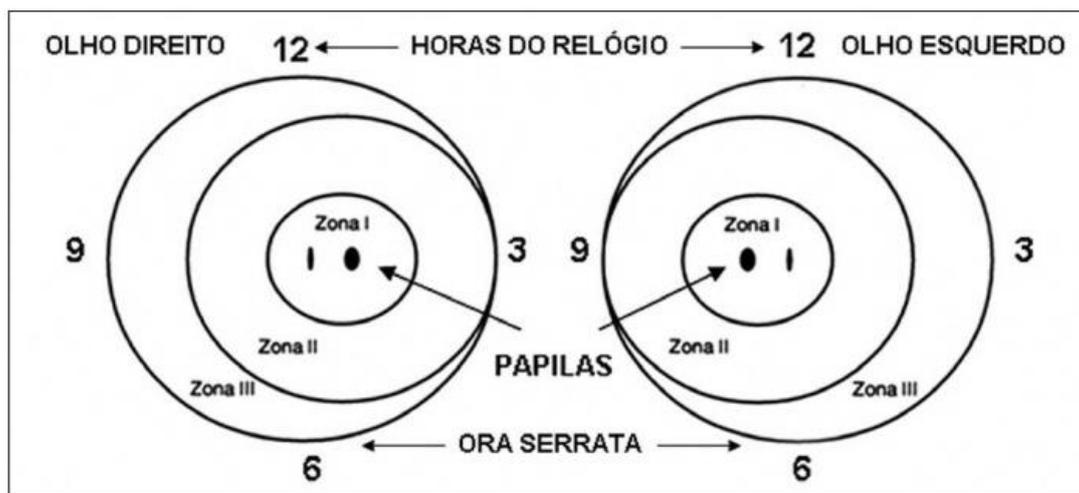


Figura 1- Representação esquemática do fundo de olho

Fonte: Zin e colaboradores, 2007.

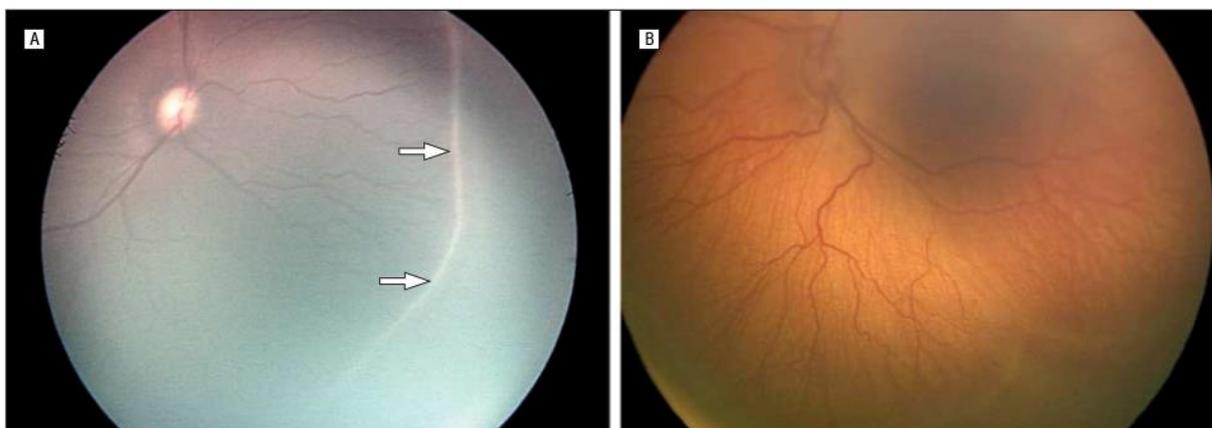


Figura 2- Estágio 1: Linha de demarcação

Fonte: *An International Committee for the Classification of ROP*, 2005.

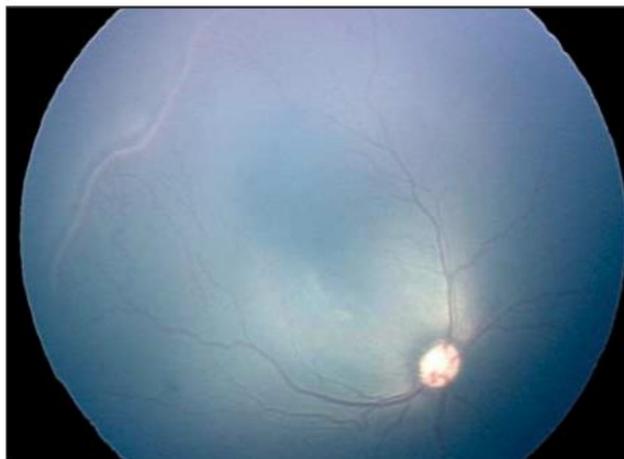


Figura 3- Estágio 2: Crista elevada

Fonte: *An International Committee for the Classification of ROP*, 2005.

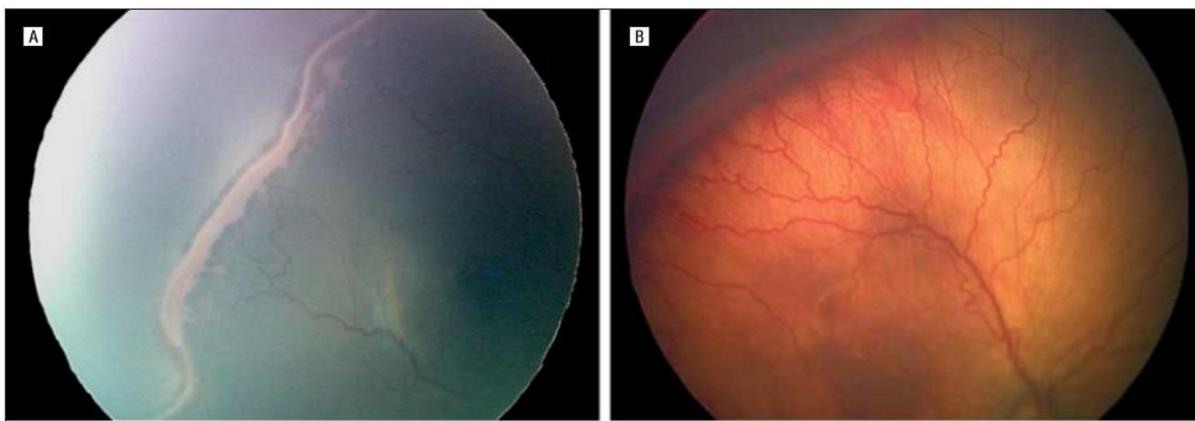


Figura 4- Estágio 3: Proliferação fibrovascular a partir da crista

Fonte: *An International Committee for the Classification of ROP*, 2005.



Figura 5- Estágio 4a: Descolamento de retina extrafoveal

Fonte: *An International Committee for the Classification of ROP*, 2005.



Figura 6- Estágio 4b: descolamento de retina incluindo a fóvea

Fonte: *An International Committee for the Classification of ROP*, 2005.

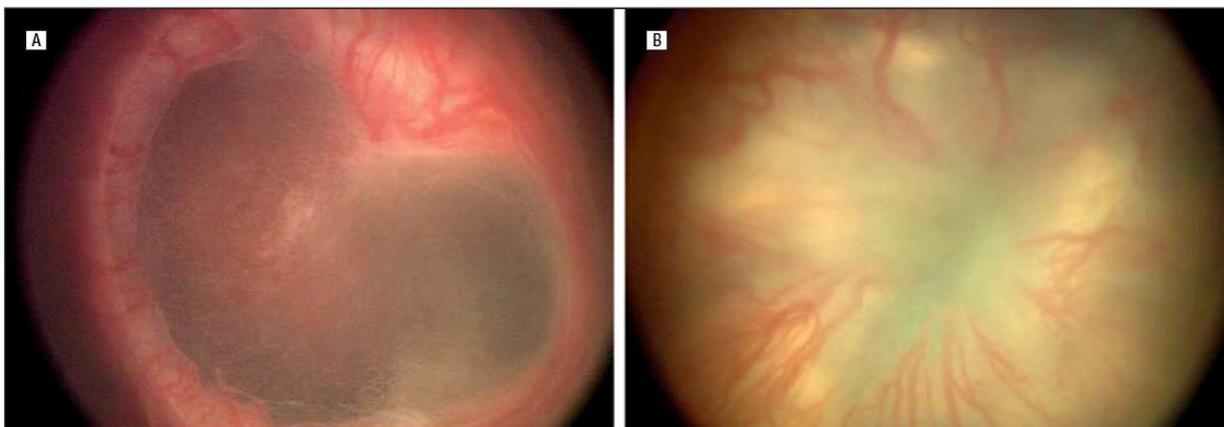


Figura 7- Estágio 5: Descolamento total da retina

Fonte: *An International Committee for the Classification of ROP*, 2005.

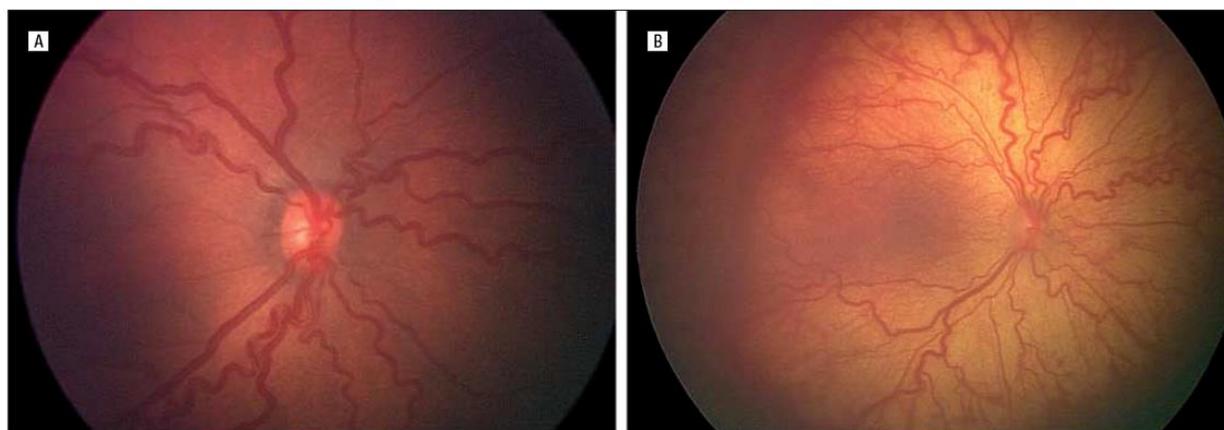


Figura 8- Doença plus: dilatação arteriolar e venodilatação

Fonte: *An International Committee for the Classification of ROP*, 2005.

Classicamente, de acordo com o CRYO-ROP, quando o diagnóstico de doença limiar era feito, o tratamento pela crioterapia ou laser estaria indicado (*Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group*, 1988, 1993 e 1996). Posteriormente, com o ETROP, foi demonstrado que o tratamento precoce, quando comparado ao convencional, está associado a uma redução no risco de baixa visão (19,5% vs. 14,5%; P= 0,01) e de dano estrutural ao olho (15,6% vs. 9,1%; P<0,001) (*Early Treatment for ROP Cooperative Group*, 2003) (Tabela 2).

Tabela 2- Indicação de Tratamento

Pré-limiar tipo 1 (ETROP): Preferencial
Zona 1: qualquer estágio com plus
Zona 1: estágio 3
Zona 2: ROP 2 ou 3 com plus
Doença limiar (CRYO-ROP): não mais a única indicação
Retinopatia estágio 3, em zona I ou II, com pelo menos 5 horas de extensão contínuas ou 8 horas intercaladas, na presença de doença plus

Fonte: Zin e colaboradores, 2007.

O seguimento oftalmológico após a alta é indispensável em todos os RNs de risco para ROP. Quanto ao prognóstico, cerca de 46% dos PMTs apresentam alguma alteração oftalmológica como estrabismo, ambliopia e erros refrativos até o quinto ano de vida (HOLMSTRÖM *et al.*, 1988), independentemente de terem sido submetidos a tratamento ou não (SCHALIJ-DELFOSS *et al.*, 2000). Com o tratamento dos pacientes com doença limiar, com crioterapia ou fotocoagulação a laser, consegue-se evitar a perda de visão em cerca de 70 a 80% dos casos (GOOD *et al.*, 2006). Entretanto, muitas das crianças tratadas

apresentam posteriormente acuidade visual não muito satisfatória (HOLMSTRÖM *et al.*, 2006, *Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group*, 2001).

2.2- O Papel do *IGF-1*:

O surgimento da ROP também está relacionado com o *IGF-1*. O *IGF-1* é um importante fator de crescimento somático, que está relacionado ao PN e a IG. Após o nascimento prematuro, os níveis de *IGF-1* não são mantidos iguais aos níveis intra-útero (LINEHAM *et al.*, 1986), talvez por causa da perda de fontes de *IGF-1* como a placenta e o líquido amniótico, que é ingerido pelo feto. Os níveis de *IGF-1* no líquido amniótico aumentam rapidamente a partir do segundo para o terceiro trimestre, momento em que os PMTs que estão em risco de desenvolvimento de ROP nascem (BONA *et al.*, 1994). Além disso, muitos PMTs estão subnutridos, o que também se associa a baixos níveis de *IGF-1* (SMITH *et al.*, 1997).

Foi demonstrado em estudo, que os níveis séricos de *IGF-1*, medidos nas primeiras 4 a 6 semanas de vida em PMTs com PN <1.500 gramas e IG <32 semanas, foram muito mais baixos em PMTs com ROP quando comparados com os que não desenvolveram ROP (VILLEGAS-BECERRIL *et al.*, 2005).

Apesar de o *VEGF* ter papel significativo no desenvolvimento dos vasos sanguíneos retinianos, ele é insuficiente quando os níveis de *IGF-1* são baixos. Hellstrom e cols. demonstraram em estudo com camundongos que a falta de *IGF-1* impede o crescimento normal da vasculatura da retina, a despeito da presença do *VEGF*. Resultados dos mesmos autores obtidos a partir de crianças PMTs com IG inferior a 32 semanas sugerem que, se o nível de *IGF-1* é suficiente após o nascimento, o desenvolvimento vascular da retina ocorre normalmente e a ROP não se desenvolve. Quando o *IGF-1* é

persistentemente baixo, os vasos param de crescer, a retina avascular em amadurecimento torna-se hipóxica e *VEGF* acumula-se no vítreo. Com o aumento do *IGF-1* até um nível crítico, com altos níveis de *VEGF* presentes, o processo de neovascularização da retina é acionado. O desenvolvimento da ROP nesse estudo foi fortemente associado a um período prolongado de *IGF-1* baixo seguido de um aumento até um limiar em que se iniciou a ROP proliferativa. Crianças com níveis iniciais mais altos de *IGF-1* apresentaram um desenvolvimento vascular mais próximo do normal e não desenvolveram ROP. Estes dados indicam que o nível sérico de *IGF-1* em lactentes PMTs pode prever quais crianças desenvolverão ROP e sugere ainda que a restauração precoce de *IGF-1* em PMTs para níveis normais pode prevenir a doença. (HELLSTROM *et al.*, 2001).

O *IGF-1* é um mediador primário dos efeitos do hormônio do crescimento, que promove o crescimento pós-natal através da sua estimulação endócrina e da sua produção local (RODRIGUEZ *et al.*, 2007; OHLSSON *et al.*, 2009). Tem sido demonstrado que o ganho de peso por si só pode ser usado para indicar bebês PMTs com maior risco de desenvolver ROP. Um baixo ganho ponderal foi associado com a severidade da ROP em quatro sobreviventes de um nascimento de quintúplios com idênticas IGs e semelhantes PNs (HALL *et al.*, 1995). Também foi demonstrado experimentalmente que ratos submetidos a um retardo de crescimento desenvolveram com mais frequência e mais severamente neovascularização retiniana (HOLMES E DÜFFNER, 1996). Foi sugerido, a partir de dados de ganho ponderal pós-natal num grupo de 111 PMTs, que o ganho de peso abaixo de 50% sobre o PN nas primeiras seis semanas de vida poderia indicar um importante risco para o aparecimento da ROP em suas formas mais graves (WALLACE *et al.*, 2000). Um estudo prospectivo do tipo caso-controle documentou características de crescimento perinatal em 31 PMTs que desenvolveram ROP doença limiar e 31 PMTs de mesma IG que não desenvolveram ROP e concluiu que PMTs pequenos para a IG (PN <

percentil 10 para IG) e PMTs com restrição de crescimento (PN < percentil 25 para IG) tiveram risco aumentado de desenvolver ROP doença limiar. O ganho de peso absoluto (gramas/dia) também foi associado com um risco aumentado para o desenvolvimento de ROP doença limiar (ALLEGAERT *et al.*, 2003). O ganho de peso pós-natal deficiente é um fator de risco importante e independente para o desenvolvimento de ROP grave e é capaz de prevê-la na maioria dos pacientes que necessitam tratamento (FORTES FILHO *et al.*, 2009).

2.3- O Leite Materno:

Há evidências substanciais que ligam a alimentação de RNMBP com LM durante a hospitalização na UTI Neonatal a uma redução do risco de morbidades a curto e longo prazos. A alimentação de PMTs com LM reduz o risco de diversos desfechos negativos da prematuridade, como sepse tardia e enterocolite necrotizante (ECN), assim como reduz a duração da hospitalização na UTI Neonatal (SCHANLER *et al.*, 2005).

As propriedades únicas do leite humano promovem uma melhor defesa do hospedeiro e uma melhor função gastrointestinal em comparação com a alimentação com fórmula infantil (SCHANLER *et al.*, 1999). Os mecanismos pelos quais o leite humano fornece essa proteção são variados e incluem propriedades nutricionais, bioativas, imunomoduladoras e epigenéticas, além de componentes específicos do leite humano, tais como o tipo e a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa e proteínas de fácil digestão, e o número extraordinário de oligossacarídeos (PATEL. *et al.*, 2007, MILLER E MCVEAGH, 1999). O leite humano contém também várias linhas de células-tronco indiferenciadas, com o potencial de impactar em uma variedade de desfechos de saúde durante toda a vida do indivíduo (CREGAN *et al.*, 2007).

O leite humano contém ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (*long chain polyunsaturated fatty acids*, LCPUFAs) e enzimas antioxidantes, incluindo o inositol, nutriente essencial ao crescimento e sobrevivência das células humanas (JENSEN *et al.*, 1999; FRIEL *et al.*, 2002). O leite humano reduz o estresse oxidativo (SHOJI *et al.*, 2007, YAO *et al.*, 2010) proporcionando uma melhor proteção antioxidante em comparação com as fórmulas para lactentes devido à presença de componentes enzimáticos específicos, tais como a superóxido dismutase humana (LUGONJA *et al.*, 2013, FRIEL *et al.*, 2002). O leite humano também contém muitas centenas de milhares de moléculas bioativas distintas que protegem contra a infecção e a inflamação e contribuem para a maturação imunológica, desenvolvimento de órgãos, e colonização microbiana saudável (BALLARD *et al.*, 2013).

A alimentação de PMTs com LM parece ter impacto também no desenvolvimento cognitivo. Vohr e cols. relataram uma relação dose-resposta entre a quantidade de leite humano recebida durante a estadia de RNEBP na UTI Neonatal e contagens em testes cognitivos e de desenvolvimento padronizados aos 18 e 30 meses de idade corrigida, além de um risco reduzido de reinternação hospitalar durante o primeiro ano de vida (VOHR *et al.*, 2006, VOHR *et al.*, 2007).

A alimentação de PMTs com LM não precisa ser exclusiva para conferir benefícios, mas o maior benefício parece estar ligado a altas “doses”, ou a alimentação exclusiva com LM (MEIER *et al.*, 2010).

Como o leite humano reduz a incidência e / ou severidade de morbidades relacionadas à prematuridade, a alimentação de PMTs com LM tem uma relação indireta com os custos de saúde durante a hospitalização na UTI Neonatal (JOHNSON *et al.*, 2014).

2.4- O *IGF-1* no Leite Materno:

O *IGF-1* se relaciona com o ganho de peso perinatal e com o surgimento da ROP e está presente no leite humano. Nagashima e cols. determinaram os níveis de *IGF-1* no leite humano, leite de vaca e fórmulas infantis a base de leite de vaca através de radioimunoensaio. O teor de *IGF-1* no leite humano não foi afetado pela IG ou PN e ele foi constantemente excretado até 10 dias pós-parto. O teor de *IGF-1* no leite humano foi significativamente mais elevado do que no leite de vaca e o *IGF-1* não foi detectado nas FLs infantis (NAGASHIMA *et al.*, 1990).

Um estudo experimental em leitões recém-nascidos demonstrou que o *IGF-1* do leite administrado através de sonda orogástrica foi bem absorvido pelo seu trato gastrointestinal (XU E WANG, 1996). O *IGF-1* do leite materno parece ser bem absorvido pelos RNs. Um estudo na Turquia avaliou a relação entre os níveis séricos de *IGF-1* em RNs e sua nutrição, IG e PN. Foram incluídos 60 RNs: 30 alimentados com LM e 30 alimentados com FL infantil. Foram obtidas amostras de soro de todos os RNs no primeiro e no sétimo dia de vida e os níveis de *IGF-1* foram determinados por imunoensaio. Os RNs alimentados com LM apresentaram níveis mais elevados de *IGF-1* no soro em comparação aos controles (BÜYÜKKAYHAN *et al.*, 2003). Outro estudo no mesmo país comparou as concentrações de *IGF-1* no leite de mães de RNs PMTs com o leite de mães de RNs a termo. Amostras de LM foram coletadas de 29 mães de PMTs (IG<37 semanas) e de 29 mães de RNs a termo (IG>38 semanas) no terceiro, sétimo e vigésimo oitavo dia pós-parto. O *IGF-1* foi medido por método de radioimunoensaio. Os níveis de *IGF-1* no leite das mães de PMTs foram significativamente mais elevados do que no leite das mães dos bebês a termo neste estudo (OZGURTAS *et al.*, 2010).

2.5- Associação entre ROP e ingesta de LM:

A associação entre ingesta de LM e ROP já foi estudada, com resultados inicialmente conflitantes. Publicações recentes têm reforçado a existência de um efeito protetor do LM contra a ROP.

Hylander e cols. realizaram um estudo incluindo 174 RNMBP que sobreviveram até receber nutrição enteral e avaliação oftalmológica para triagem de ROP. Esses bebês faziam parte de um grupo de 283 RNMBP admitidos em uma UTI Neonatal em Georgetown no período entre janeiro de 1992 e setembro de 1993. O tipo de alimentação (LM versus FL exclusiva), a presença de ROP e variáveis potencialmente confundidoras foram analisados retrospectivamente a partir de registros médicos. ROP foi considerada presente quando qualquer estágio de ROP foi diagnosticado em qualquer idade durante a hospitalização na UTI Neonatal. Regressão logística múltipla foi utilizada para controlar possíveis confundidores. Os principais preditores de ROP foram similares em ambos os grupos, incluindo IG, tempo de VM e tempo de uso de oxigênio (O₂) suplementar. A incidência de ROP diferiu significativamente entre os grupos: 41% entre os alimentados com LM contra 63,5% entre os alimentados com FL exclusiva (p=0,005). Alimentação com LM foi relacionada independentemente com redução de risco de ROP (*Odds ratio*, OR: 0,42, Intervalo de confiança, IC 95%: 0,19 – 0,93, p=0,03), controlando para IG, tempo de oxigenioterapia, Apgar no 5º minuto e raça. Alimentação com LM foi relacionada independentemente com redução de risco de ROP (OR: 0,46, 95% IC: 0,18 – 0,91, p=0,03), controlando para PN, tempo de oxigenioterapia, Apgar no 5º minuto e raça. Os autores concluíram que a alimentação com LM em RNMBP está associada a uma menor incidência de ROP quando comparada à alimentação com FL exclusiva, após ajuste para variáveis confundidoras (HYLANDER *et al.*, 2001).

Heller e cols. realizaram uma análise secundária de dados coletados para um ensaio clínico com suplementação de glutamina em RNEBP. Dentre os 1433 participantes desse ensaio, foram incluídos 1057 RNs que tinham dados disponíveis sobre ingesta de LM e ocorrência de ROP grave (definida no estudo como ROP tratada cirurgicamente). O volume de ingesta do leite foi contabilizado como volume médio (mL/Kg/dia) e a média de volume proporcional (proporção do total de nutriente ingerido) desde o nascimento até a alta ou transferência. Usando regressão logística, foram estimados o OR e o IC 95% para ingesta de LM em qualquer volume e, dentre os que receberam LM, para cada 10mL/Kg/dia e cada 10% de aumento em volume. Dos 1057 RNs incluídos nesta coorte, 788 (75%) receberam alguma quantidade de LM. Dentre eles, a média de volume ingerida foi 30 mL/Kg/dia (amplitude interquartil 6-83 mL/Kg/dia) e a média de volume proporcional de LM foi 0,18 (0,03-0,66). Cento e sessenta e seis RNs (15%) desenvolveram ROP grave. A ingesta de LM não teve associação com risco reduzido de ROP grave neste estudo (HELLER *et al.*, 2007).

Kao e cols. conduziram um estudo caso-controle para examinar os efeitos da bilirrubina e do LM em RNs de risco para ROP (PN<1500g ou IG <32 semanas). Os casos (66 RNs com ROP) foram pareados aos controles (66 RNs sem ROP) baseado em fatores que sabidamente afetam o risco de ROP. Eles compararam a incidência de ROP entre RNs que receberam LM em qualquer quantidade (da própria mãe ou de banco de leite) versus RNs que receberam exclusivamente FL para alimentação, e não encontraram associação significativa entre alimentação com LM e risco de ROP (KAO *et al.*, 2011).

Manzoni e cols. realizaram uma segunda análise de dados coletados em dois ensaios clínicos randomizados multicêntricos consecutivos entre 2004 e 2008 em uma rede de 11 UTIs neonatais da Itália. Esses dois trabalhos tinham como objetivo verificar a efetividade do uso profilático do Fluconazol (MANZONI *et al.*, 2007) e da

suplementação de lactoferrina bovina (MANZONI *et al.*, 2009) na prevenção de infecção fúngica invasiva e sepse tardia em RNMBP, respectivamente. Eles testaram a hipótese de que a alimentação com LM fresco exclusivo poderia prevenir ROP de qualquer estágio definida pelo estudo ETROP (GOOD *et al.*, 2005) em RNMBP, comparados aos alimentados com FL. A triagem sistemática para ROP fazia parte do protocolo dos dois estudos. Análise univariada foi realizada para encontrar associações significativas entre ROP e fatores possivelmente associados, dentre eles, o tipo de alimentação (LM ou FL para PMT). Quando uma associação era identificada através do $p < 0,05$, era realizada regressão logística para determinar os fatores significativamente associados à ROP. Nesses estudos, 314 RNs receberam LM exclusivo (grupo A) e 184 RNs receberam FL para PMT. (280 RNs que receberam ambos os leites ou não atingiram 50mL/Kg/dia de ingesta de leite no momento da ocorrência da ROP foram excluídos do estudo). As características clínicas dos RNs não diferiram entre os grupos, particularmente quanto à presença de fatores de risco conhecidos para ROP. De maneira geral, a incidência de ROP em qualquer estágio foi significativamente mais baixa em RNs alimentados com LM (11 de 314; 3,5%) quando comparado aos neonatos alimentados com FL (29/184; 15,8%) (RR 0,14; IC 95% 0,05-0,69). Após regressão logística multivariada controlando os potenciais fatores confundidores que foram significativamente associados com ROP na análise univariada (PN, IG, dias em uso de O₂, infecção fúngica sistêmica, nascimentos fora do hospital e hiperglicemia), o tipo de alimentação persistiu significativo, sendo LM protetor com $p=0,01$ (MANZONI *et al.*, 2013).

Em uma metanálise recém-publicada, Zhou e cols. selecionaram estudos longitudinais comparando a incidência de ROP entre RNs alimentados com LM e FL. Para ROP em qualquer estágio, os ORs (IC 95%) foram os seguintes: LM exclusivo versus FL em qualquer quantidade: 0,29 (0,12 - 0,72); LM predominante versus FL

predominante: 0,51 (0,26 - 1,03); LM qualquer quantidade versus FL exclusiva: 0,54 (0,15 - 1,96); e LM exclusivo versus FL exclusiva: 0,25 (0,13 - 0,49). Para ROP grave, eles foram de 0,11 (0,04 - 0,30), 0,16 (0,06 - 0,43), 0,42 (0,08-2,18), e 0,10 (0,04 - 0,29), respectivamente. Os autores concluíram que, com base nas limitadas evidências atuais, em RNs muito prematuros a alimentação com leite humano potencialmente desempenha um papel protetor na prevenção de ROP em qualquer estágio e da ROP grave (ZHOU *et al.*, 2015).

Ginovart e cols. demonstraram uma associação entre a exposição precoce a FL em RNMBP e o desenvolvimento de ROP, e sugeriram que uma dieta inicial com leite humano, desprovida de produtos contendo leite de vaca, pode ajudar a prevenir ROP (GINOVART *et al.*, 2016).

3- JUSTIFICATIVA

O LM pode ter um efeito protetor contra a ROP. Estudos sobre o assunto ainda são escassos. Se comprovado mais este benefício do LM (cujos benefícios nutricionais e imunológicos já são inquestionáveis), o estímulo à alimentação com LM, que já é bastante intenso em RNs a termo, ganharia força maior também entre os PMTs. O maior incentivo à alimentação do PMT com LM beneficiaria aos pacientes da UTI Neonatal, que receberiam a nutrição ideal e às instituições hospitalares como um todo, que reduziriam seus custos não apenas com FL específica para PMT, mas também com as patologias passíveis de prevenção pelo LM.

4- OBJETIVOS

4.1- Objetivo geral:

- Determinar se o LM tem efeito protetor contra a ROP.

4.2- Objetivos específicos:

- Comparar a quantidade de LM recebida entre os pacientes que desenvolveram ROP e aqueles livres da doença.
- Definir a quantidade e o momento no qual a ingesta do LM é efetiva na prevenção da ROP.

5- METODOLOGIA

5.1- Delineamento da pesquisa:

Estudo de coorte observacional, com dados retrospectivos e prospectivos. O fator em estudo é a quantidade de LM recebida pelos RNs nos primeiros 42 dias de vida e os desfechos são ROP em qualquer grau e ROP grave.

5.2- População:

A população da pesquisa foi constituída por PMTs com PN inferior a 1500g e / ou com IG inferior a 32 semanas, internados na UTI Neonatal do Hospital da Criança Conceição (HCC) no período de janeiro de 2011 a junho de 2014.

5.3- Critérios de exclusão:

Foram excluídos os pacientes transferidos de outro hospital que chegaram ao HCC com mais de 24 horas de vida, pacientes com malformações congênitas maiores e pacientes que evoluíram ao óbito antes de completar a avaliação oftalmológica.

5.4- Variáveis estudadas:

As variáveis estudadas foram obtidas a partir das informações contidas no prontuário hospitalar do RN. São as seguintes:

- **Dados Maternos e do Parto:** Pré-natal, uso de corticoide (CTC) antenatal, infecção ovular, tempo de bolsa rota superior a 18 horas, pré-eclâmpsia e via de parto.

- **Dados do RN:**

- Sexo.
- PN.
- IG: definida por ecografia quando havia ecografia obstétrica realizada até 12 semanas de IG ou pelo método *New Ballard* (BALLARD *et al.*, 1991) na ausência de ecografia precoce.
- Classificação do peso para a IG: pequeno, adequado ou grande para a IG, conforme classificação de Alexander (ALEXANDER *et al.*, 1996).
- Apgar no 5º minuto.
- *SNAPPE II*: escore de gravidade (*Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*, RICHARDSON *et al.*, 1993).
- Transferência de outro hospital.
- Gemelaridade.

- Dados da evolução do RN na UTI:

- Síndrome do desconforto respiratório (SDR): diagnosticada na presença de sinais de desconforto respiratório com necessidade de 40% ou mais de oxigênio e de reposição de surfactante exógeno.
- Sepses precoce, sepsis tardia e sepsis fúngica: diagnosticadas pela presença de sinais clínicos de sepsis e confirmadas por hemocultura.
- Uso de dopamina.
- Hiperglicemia.
- ECN: definida pela presença de sinais clínicos da doença, acompanhados de pneumatoses intestinais ou pneumoperitônio ao RX.

- Displasia broncopulmonar (DBP): definida pela necessidade de oxigênio suplementar por período maior ou igual a 28 dias, conforme consenso de 2005 (EHRENKRANZ *et al.*, 2005).
- Hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV (HPIV III/IV): determinada através de exames de ultrassom cerebral seriados, conforme rotina assistencial do serviço, utilizando a classificação de Papile (PAPILE *et al.*, 1978).
- Tempo de VM.
- Tempo de uso de *CPAP* (*Continuous positive airway pressure*) nasal.
- Tempo total de uso de oxigênio.
- Persistência do canal arterial (PCA), confirmado por ecocardiograma.
- Número de transfusões de concentrado de hemácias (CHAD) ao longo da internação na UTI Neonatal.
- Tempo de uso de nutrição parenteral (NPT).
- Idade de início da alimentação enteral.
- Idade que atingiu dieta enteral plena.
- Tempo de internação.

- **Dados da alimentação:** foi verificada a quantidade exata de LM recebida por dia em mL/kg/dia desde o nascimento até que os RNs completassem 42 dias de vida ou recebessem alta hospitalar. A quantidade total de leite recebida por dia também foi avaliada (quantidade total de leite = LM + FL, já que os pacientes não receberam leite humano de banco de leite durante o período do estudo).

- **Dados da avaliação oftalmológica:** Desenvolvimento e gravidade da ROP e necessidade de tratamento cirúrgico para ROP por fotocoagulação a laser. O estadiamento

da doença foi realizado de acordo com a Classificação Internacional da ROP (*International Committee for the Classification of ROP*, 2005). Os RNs foram acompanhados pelo oftalmologista até que completassem a vascularização da retina.

5.5- Logística:

Os dados retrospectivos foram pesquisados nos prontuários no Serviço de Arquivo Médico e Estatística do Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC). A parte prospectiva da pesquisa foi realizada através do acompanhamento dos pacientes durante sua internação na UTI Neonatal e na Unidade de Cuidados Intermediários e após a alta no ambulatório de oftalmologia até que completassem a avaliação oftalmológica.

Cada RN admitido no estudo teve sua ficha preenchida (protocolo da pesquisa, apêndice 1). O Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE, apêndice 2) foi lido com a mãe ou responsável e assinado pelo mesmo na parte prospectiva da pesquisa.

O tipo de leite que os RNs receberam dependia da disponibilidade de LM no lactário (obtido através da ordenha das mamas das mães) e da prescrição do médico assistente, que rotineiramente dá preferência ao LM, exceto na presença de contraindicações. Não havia leite humano de banco de leite disponível durante o período do estudo. O tipo de leite recebido (LM ou FL) era registrado rotineiramente pela equipe de enfermagem em todas as dietas recebidas pelos RNs.

Os exames de mapeamento de retina dos RNs em risco para ROP fazem parte da rotina assistencial do Serviço de Neonatologia do HCC, assim como seu acompanhamento ambulatorial após a alta hospitalar, realizado pelo mesmo médico oftalmologista especializado em ROP.

5.6- Processamento e Análise de Dados:

O tamanho da amostra calculado foi de 292 pacientes. O cálculo foi baseado em uma incidência de ROP de 28% (dados locais), objetivando detectar uma redução de ROP em 50% com poder de 80% e nível de significância estatística de 0,05, conforme o estudo de Hylander e cols. que demonstrou menor incidência de ROP entre RNs de muito baixo peso alimentados com LM quando comparados aos alimentados exclusivamente com FL (HYLANDER *et al.*, 2001).

Inicialmente os pacientes foram divididos em dois grupos: com ROP (qualquer grau) e sem ROP.

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão (distribuição simétrica) ou mediana e amplitude interquartil (distribuição assimétrica). As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas.

Para comparar as variáveis quantitativas foi aplicado o teste t de Student (distribuição simétrica) ou o teste U de Mann-Whitney (distribuição assimétrica). Para avaliar a associação entre as variáveis qualitativas, foram empregados os testes qui-quadrado e exato de Fisher.

As análises foram realizadas verificando a quantidade de LM recebida durante todo o período do estudo (primeiros 42 dias de vida) e também semanalmente (semana 1, semana 2, semana 3, semana 4, semana 5 e semana 6), na tentativa de avaliar o momento em que a ingesta de LM é importante para prevenir ROP.

Foi realizada uma análise multivariada através de regressão de Poisson com ajuste para variâncias robustas para a determinação das razões de prevalências ajustadas para os principais fatores envolvidos. Alguns fatores significativos na análise univariada foram excluídos da análise multivariada devido a multicolinearidade.

Posteriormente efetuou-se uma nova divisão de grupos: com ROP grave (ROP grau ≥ 3) e sem ROP ou com ROP leve (grau ≤ 2) e todas as análises foram repetidas.

O nível de significância estatística adotado foi $p < 0,05$ e as análises foram realizadas no programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versão 18.0.

6- ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo não implicou em nenhuma alteração na rotina da UTI Neonatal do HCC e os participantes envolvidos no estudo não foram submetidos a nenhum tipo de risco.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e da UFRGS. Os dados pessoais confidenciais permaneceram em sigilo e a identidade dos pacientes nunca foi exposta.

Foi aplicado o TCLE aos responsáveis pelos RNs incluídos na parte prospectiva da pesquisa quando os mesmos autorizaram a participação dos RNs. Não foi possível aplicar o TCLE na parte retrospectiva da pesquisa, pois esses pacientes já haviam tido alta hospitalar. Sua aplicação não é indispensável, já que o projeto não previa nenhuma intervenção na assistência ao paciente. Os dados foram pesquisados no prontuário e foi mantido o total anonimato dos pacientes participantes. Foi obtido um termo de concordância do Serviço de Arquivo Médico e Estatística do HNSC para consulta dos prontuários.

Os dados foram utilizados apenas para esta pesquisa e serão armazenados durante cinco anos. Ao término deste período serão destruídos.

7- REFERÊNCIAS

AIELLO, Lloyd P.; PIERCE, Erica A.; FOLEY, Eliot D.; TAKAGI, Hitoshi; CHEN, Helen; RIDDLE, Lavon; FERRARA, Napoloene; KINGttli, George L.; SMITH, Lois E.H. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. **Proc Natl Acad Sci USA**; vol. 92, n. 23, p. 10457-61, 1995.

ALEXANDER, G.R.; HIMES, J.H.; KAUFMAN, R.B.; MOR J.; KOGAN, M. A United States national reference for fetal growth. **Obstet Gynecol**; vol. 87, n. 2, p.163-8, 1996.

ALEXANDER, G.R.; HIMES, J.H.; KAUFMAN, R.B.; MOR J.; KOGAN, M. A United States national reference for fetal growth. **Obstet Gynecol**; vol. 87, n. 2, p.163-8, 1996.

ALLEGAERT, K.; VANHOLE, C.; CASTEELS, I.; NAULAERS, G.; DEBEER, A.; COSSEY, V. et al. Perinatal growth characteristics and associated risk of developing threshold retinopathy of prematurity. **J AAPOS**; vol. 7, n. 1, p. 34-7, 2003.

AN INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF RETINOPATHY OF PREMATURITY. Prepared by an International Committee. **Br J Ophthalmol**; vol. 68, n. 10, p.690-7, 1984.

AN INTERNATIONAL COMMITTEE FOR THE CLASSIFICATION OF RETINOPATHY OF PREMATURITY. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. **Arch Ophthalmol**; vol. 123, n. 7, p. 991-9, 2005.

AN INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF RETINOPATHY OF PREMATURITY II. The classification of retinal detachment. The International

Committee for the Classification of the Late Stages of Retinopathy of Prematurity. **Arch Ophthalmol**; vol. 105, n.7, p. 906-12, 1987.

BALLARD, J.L.; KHOURY, J.C.; WEDIG, K.; WANG, L.; EILERS-WALSMAN, B.L.; LIPP, R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. **J Pediatr**; vol. 119, n. 3, p. 417-23, 1991.

BALLARD, Olivia; MORROW, Ardythe L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatr Clin North Am**, vol. 60, n. 1, p. 49-74, 2013.

BONA, G.; AQUILI, C.; RAVANINI, P.; GALLINA, M.R.; CIGOLOTTI, A.C.; ZAFFARONI, M.; PANICCIA, P.; MUSSA, f. Growth hormone, insulin-like growth Factor-I and somatostatin in human fetus, newborn, mother plasma and amniotic fluid. **Panminerva Med**; vol. 36, n. 1, p. 5-12, 1994.

BÜYÜKKAYHAN, D.; TANZER, F.; ERSELCAN, T.; CINAR, Z.; YÖNEM, O. Umbilical serum insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in newborns: effects of gestational age, postnatal age, and nutrition. **Int J Vitam Nutr Res**, vol. 73, n. 5; p. 343-6, 2003.

CAMPBELL, K. Intensive oxygen therapy as a possible cause of retrolental fibroplasia: a clinical approach. **Med J Australia**, vol. 2, n. 2, p.48-50, 1951.

CARRION, J.Z.; FORTES Filho, J.B.; TARTARELLA, M.B.; ZIN, A.; JORNADA Jr, ID. Prevalence of retinopathy of prematurity in Latin America. **Clin Ophthalmol**, n. 5, p.1687-95, 2011.

CHEN, J.; STAHL, A.; HELLSTROM, A.; SMITH, L.E. Current update on retinopathy of prematurity: screening and treatment. **Curr Opin Pediatr**; vol. 23, n. 2, p.173-8, 2011.

CREGAN, M.D.; FAN, Y.; APPELBEE, A.; BROWN, M.L.; KLOPCIC, B.; KOPPEN, J.; et al. Identification of nestin-positive putative mammary stem cells in human breastmilk. **Cell Tissue Res**, vol. 329, n. 1, p. 29-36, 2007.

CRYOTHERAPY FOR RETINOPATHY OF PREMATURITY COOPERATIVE GROUP. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Preliminary results. **Arch Ophthalmol**; vol. 106, n.4, p. 471-9, 1988.

CRYOTHERAPY FOR RETINOPATHY OF PREMATURITY COOPERATIVE GROUP. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. 3 1/2-year outcome - structure and function. **Arch Ophthalmol**; vol. 111. n. 3, p. 339-44, 1993.

CRYOTHERAPY FOR RETINOPATHY OF PREMATURITY COOPERATIVE GROUP. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Snellen visual acuity and structural outcome at 5 1/2 years after randomization. **Arch Ophthalmol**; vol. 114, n.4; p. 417-24, 1996.

CRYOTHERAPY FOR RETINOPATHY OF PREMATURITY COOPERATIVE GROUP. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity: ophthalmological outcomes at 10 years. **Arch Ophthalmol**; vol. 119, n. 8, p.1110-8, 2001.

CROSS, C.W. Cost of preventing retrolental fibroplasias? **Lancet**, vol. 2, n. 7835, p. 954-956, 1973.

EARLY TREATMENT FOR RETINOPATHY OF PREMATURITY COOPERATIVE GROUP. Revised indications for the treatment of retinopathy of prematurity: results of the early treatment for retinopathy of prematurity randomized trial. **Arch Ophthalmol**; vol. 121, n. 12, p. 1684-94, 2003.

EHRENKRANZ, R.A.; WALSH, M.C.; VOHR, B.R.; JOBE, A.H.; WRIGHT, L.L.; FANAROFF, A.A.; WRAFE, L.A.; POOLE, K. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. National Institutes of Child Health and human Development Neonatal Research Network. **Pediatrics**, vol. 116, n.6, p. 1353-60, dez. 2005.

FIELDER, Alistair R.; REYNOLDS, James D. Retinopathy of prematurity: clinical aspects. **Semin Neonatol**, vol. 6, n. 6, p. 461-75, 2001.

FLYNN, J.T.; BANCALARI, E.; SNYDER, E.S.; GOLDBERG, R.N.; FEUER, W.; CASSADY, J.; SCHIFFMAN, J.; FELDMAN, H.I.; BACHYNSKI, B.; BUCLKEY, E, et al. A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity. **N Engl J Med**, vol. 326, n. 16, p. 1050-54, 1992.

FORTES FILHO, J.B.; BONOMO, P.P.; MAIA, M.; PROCIANOY, R.S. Weight gain measured at 6 weeks after birth as a predictor for severe retinopathy of prematurity: study with 317 very low birth weight preterm babies. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, vol. 247, n. 6, p. 831-6, 2009.

FORTES FILHO, J.B.; ECKERT, Gabriela U.; PROCIANOY, L.; BARROS, C.K.; PROCIANOY, Renato S. Incidence and risk factors for retinopathy of prematurity in very low and in extremely low birth weight infants in a unit-based approach in southern Brazil. **Eye**, vol. 23, n. 1, p.25-30, 2009.

FORTES FILHO, João B.; ECKERT, Gabriela U.; TARTARELLA, M.B.; PROCIANOY, Renato S. Prevention of retinopathy of prematurity. **Arq Bras Oftalmol**, vol. 74, n.3, p.217-21, 2011.

FORTES FILHO, João B.; ECKERT, Gabriela U.; VALIATTI, Fabiana B.; COSTA, Marlene C.; BONOMO, Pedro P.; PROCIANOY, Renato S. Prevalence of retinopathy of prematurity: an institutional cross-sectional study of preterm infants in Brazil. **Rev. Panm. Salud Publica**, vol. 26, n. 3, p. 216-20, 2009.

FORTES FILHO, João B.; ECKERT, Gabriela U.; VALIATTI, Fabiana B.; SANTOS, P.; da COSTA, Marlene C.; PROCIANOY, Renato S. The influence of gestational age on the dynamic behavior of other risk factors associated with retinopathy of prematurity (ROP). **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, vol. 248, n. 6, p. 893-900, 2010.

FRIEL, James K.; MARTIN, Sean M.; LANGDON, Matthew.; HERZBERG, Gene R.; BUETTNER, Garry R. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. **Pediatr Res**, vol. 51, n. 5, p. 612-8, 2002.

GINOVART, Gemma; GICH, I.; VERD, Sergio. Human milk feeding protects very low-birth-weight infants from retinopathy of prematurity: a pre-post cohort analysis. **J Matern Fetal Neonatal Med**, p. 1-6, 2016.

GOOD, W.V. Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. The Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Study: structural findings at age 2 years. **Br J Ophthalmol**, vol. 90. n. 11, p. 1378-82, 2006.

GOOD, W.V.; HARDY, R.A.; DOBSON, V.; PALMER, E.A.; PHELPS, D.L.; QUINTOS, M.; et al. Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. The incidence and course of retinopathy of prematurity: findings from the early treatment for retinopathy of prematurity study. **Pediatrics**, n. 16, p.15-23, 2005.

HALL, J.G.; FREEDMAN, S.F.; KYLSTRA, J.A. Clinical course and systemic correlates of retinopathy of prematurity in quintuplets. **Am J Ophthalmol**, vol. 119, n. 5, p. 658-60, 1995.

HELLER, C.D.; O'SHEA M.; YAO, Q; LANGER, J.; EHRENKRANZ, R.A.; PHEPLS, D.L., et al. Human milk intake and retinopathy of prematurity in extremely low birth weight infants. NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**, vol. 120, n. 1, p. 1-9, 2007.

HELLSTROM, A.; PERRUZZI, C.; JU, M.; ENGSTROM, E.; HARD, AL.; LIU, J.L.; et al. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. **Proc Natl Acad Sci USA**, vol. 98, n. 10, p.5804-8, 2001.

HOLMES, J.M.; DUFFNER, L.A. The effect of postnatal growth retardation on

abnormal neovascularization in the oxygen exposed neonatal rat. **Curr Eye Res**, vol. 15, n. 4, p. 403-9,1996.

HOLMSTRÖM, M.; el AZAZI, M.; KUGELBERG, U. Ophthalmological long-term follow up of preterm infants: a population based prospective study of the refraction and its development. **Br J Ophthalmol**, vol. 82, n. 11, p. 1265-71, 1998.

HOLMSTRÖM, G.; RYDBERG, A.; LARSSON, E. Prevalence and development of strabismus in 10-year-old premature children: a population-based study. **J Pediatr Ophthalmol Strabismus**, vol. 43, n. 6, p. 346-52, 2006.

HYLANDER, M.A.; STROBINO, D.M.; PEZZULLO, J.C.; DHANIREDDY, R. Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birthweight infants. **J Perinatol**, vol. 21, n. 6, p. 356-62, 2001.

JENSEN, R.G. Lipids in human milk. **Lipids**, vol. 34, n. 12, p. 1243-71, 1999.

JOHNSON, T.J.; PATEL, A.L.; BIGGER, H.R.; ENGSTROM, J.L.; MEIER, P.P. Economic Benefits and Costs of Human Milk Feedings: A Strategy to Reduce the Risk of Prematurity-Related Morbidities in Very-Low-Birth-Weight Infants. **Adv Nutr**, n. 5, p. 207-12, 2014.

KAO, J.S.; DAWSON, J.D.; MURRAY, J.C.; DAGLE, J.M.; BERENDS, S.K.; GILLEN, S.B.; et al. Possible roles of bilirubin and breast milk in protection against retinopathy of prematurity. **Acta Paediatr**, vol. 100, n. 3, p. 347-51, 2011.

KONG, L.; FRY, M.; AL-SAMARRAIE, M.; GILBERT, C.; STEINKULLER, P.G. An update on progress and the changing epidemiology of causes of childhood blindness worldwide. **AAPOS**, vol. 16, n. 6, p. 501-7, 2012.

LERMANN, Viviane L.; FORTES FILHO, João B.; PROCIANOY, Renato S. The prevalence of retinopathy of prematurity in very low birth weight newborn

infants. **J Pediatr**, vol. 82, n. 1, p. 27-32, 2006.

LINEHAM, J.D.; SMITH, R.M.; DAHLENBURG, G.W.; KING, R.A.; HASLAM, R.R.; STUART, M.C.; et al. Circulating insulin-like growth factor I levels in newborn premature and full-term infants followed longitudinally. **Early Hum Dev**, vol. 13, n. 1, p. 37-46, 1986.

LUGONJA, N.; SPASIĆ, S.D.; LAUGIER, O.; NIKOLIĆ-KOKIĆ, A.; SPASOJEVIĆ, I.; OREŠČANIN-DUŠIĆ, Z.; et al. Differences in direct pharmacologic effects and antioxidative properties of mature breast milk and infant formulas. **Nutrition**, vol. 29, n. 2, p. 431-5, 2013.

MANZONI, P.; RINALDI, M.; CATTANI, S.; PUGNI, L.; ROMEO, M.G.; MESSNER, H.; et al. Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections; Italian Society of Neonatology. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. **JAMA**, vol. 302, n. 13, p. 1421–8, 2009.

MANZONI, P.; STOLFI, I.; PEDICINO, R.; VAGNARELLI, F.; MOSCA, F.; PUGNI, L.; et al. Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections, Italian Society of Neonatology. Human milk feeding prevents retinopathy of prematurity (ROP) in preterm VLBW neonates. **Early Hum Dev**, vol. 89, n.1, p. 64-8, 2013.

MANZONI, Paolo; STOLFI, Ilaria; PUGNI, Lorenza; DECEMBRINO, L.; MAGNANI, C.; VETRANO, G.; et al.; Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections; Italian Society of Neonatology. A multicenter, randomized trial of prophylactic fluconazole in preterm neonates. **N Engl J Med**, vol. 356, n. 24, p. 2483-95, 2007.

MEIER, P.P.; ENGSTROM, J.L.; PATEL, A.L.; JEGIER, B.J.; BRUNS, N.E. Improving the use of human milk during and after the NICU stay. **Clin Perinatol**, vol. 37, n. 1, p.217-45, 2010.

MILLER, J.; McVEAGH, P. Human milk oligosaccharides: 130 reasons to breast-feed. **Br J Nutr**, vol. 82, n. 55, p.333-5, 1999.

NAGASHIMA, K.; ITOH, K.; KUROUME, T. Levels of insulin-like growth factor I in full- and preterm human milk in comparison to levels in cow's milk and in milk formulas. **Biol Neonate**, vol. 58, n. 6, p.343-6,1990.

OHLSSON, C.; MOHAN, S.; SJOGREN, K.; TIVESTEN, A.; ISGAARD, J.; ISAKSSON, O.; et al. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. **Endocr Rev**, vol. 30, n. 5, p. 494–535, 2009.

OZGURTAS, T.; AYDIN, I.; TURAN, O.; KOC, E.; HIRFANOGLU, I.M.; ACIKEL, C.H.; et al. Vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor levels in human milk of mothers with term and preterm neonates. **Cytokine**, vol. 50, n. 2, p. 192-4, 2010.

PAPILE, L.A.; BURSTEIN, J.; BURSTEIN, R.; KOFFLER, H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. **J Pediatr**, n. 92, p. 529-34, 1978.

PATEL, A.L.; MEIER, P.P.; ENGSTROM, J.L. The evidence for use of human milk in very low-birthweight preterm infants. **Neoreviews**, vol. 8, n.11, p. 459-466, 2007.

PATZ, A. The role of oxygen in retrolental fibroplasia. **Albrecht Von Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol**, vol. 195, n. 2, p. 77-85, 1975.

PATZ, A.; HOECK, L.E.; DE LA CRUZ, E. Studies on the effect of high oxygen administration in retrolental fibroplasia: I. Nursery observations. **Am J Ophthalmol**, vol. 35, n. 9, p. 1248-53, 1952.

PIERCE, E.A.; FOLEY, E.D.; SMITH, L.E. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. **Arch**

Ophthalmol, vol. 114, n. 10, p. 1219-28, 1996.

QUINN, G.E.; GILBERT, C.; DARLOW, B.A.; ZIN, A. Retinopathy of prematurity: an epidemic in the making. **Chin Med J (Engl)**, vol. 123, n. 20, p. 2929-37, 2010.

RICHARDSON, D.K.; GRAY, J.E.; McCORMICK, M.C.; WORKMAN, K.; GOLDMANN, D.A. Score for Neonatal Acute Physiology: a physiologic severity index for neonatal intensive care. **Pediatrics**, vol. 91, n. 3, p. 617-23, 1993.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T.R.; DAY, I.N. Molecular genetics of human growth hormone, insulin-like growth factors and their pathways in common disease. **Hum Genet**. Vol. 122, n. 1, p.1-21, 2007.

SCHALIJ-DELFOOS, N.E.; GRAAF, M.E.; TREFFERS, W.F.; ENGEL, J.; CATS, B.P. Long term follow up of premature infants: detection of strabismus, amblyopia, and refractive errors. **Br J Ophthalmol**, vol. 84, n. 9, p. 963-7, 2000.

SCHANLER, R.J.; SHULMAN, R.J.; LAU, C. Feeding strategies for premature infants: beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. **Pediatrics**, vol. 103, n. 6 (Pt1), p. 1150-7, 1999.

SCHANLER, R.J.; LAU, C.; HURST, N.M.; SMITH, E.O. Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. **Pediatrics**, vol. 116, n. 2, p.400-6, 2005.

SHOJI, H.; KOLETZKO, B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, vol. 10, n. 3, p.324-8, 2007.

SMITH, W.J.; UNDERWOOD, L.E.; KEYES, L.; CLEMMONS, D.R. Use of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein measurements to monitor feeding of premature infants. **J Clin Endocrinol Metab**, vol. 82, n. 12, p. 3982-8, 1997.

VILLEGAS, Becerril E.; FERNÁNDEZ, Molina F.; GONZÁLEZ, R.;
GALLARDO, Galera J.M. Serum IGF-I levels in retinopathy of prematurity. New indications for ROP screening. **Arch Soc Esp Oftalmol**, vol. 80, n. 4, p. 233-8, 2005.

VOHR, B.R.; POINDEXTER, B.B.; DUSICK, A.M.; MCKINLEY, L.T.;
WRIGHT, L.L.; LANGER, J.C.; et al. Beneficial effects of breast milk in the neonatal intensive care unit on the developmental outcome of extremely low birth weight infants at 18 months of age. **Pediatrics**, vol. 118, n. 1, p. 115–23, 2006.

VOHR, B.R.; POINDEXTER, B.B.; DUSICK, A.M.; MCKINLEY, L.T.;
HIGGINS, R.D.; LANGER, J.C.; et al. Persistent beneficial effects of breast milk ingested in the neonatal intensive care unit on outcomes of extremely low birth weight infants at 30 months of age. **Pediatrics**, vol. 120, n. 4, p.953–9, 2007.

WALLACE, D.K.; KYLSTRA, J.A.; PHILLIPS, S.J.; HALL, J.G. Poor postnatal weight gain: a risk factor for severe retinopathy of prematurity. **J AAPOS**, vol. 4, n. 6, p. 343-7, 2000.

WHEATLEY, C.M.; DICKINSON, J.L.; MACKEY, D.A.; CRAIG, J.E.; SALE, M.M. Retinopathy of prematurity: recent advances in our understanding. **Br J Ophthalmol**, vol. 86, n. 6, p. 696-700, 2002.

XU, R.J.; WANG, T. Gastrointestinal absorption of insulinlike growth factor-I in neonatal pigs. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, vol. 23, n. 4, p. 430-7, 1996.

YAO, L.; FRIEL, J.K.; SUH, M.; DIEHL-JONES, W.L. Antioxidant properties of breast milk in a novel in vitro digestion/enterocyte model. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, vol. 50, n. 6, p. 670-6, 2010.

ZIN, A.; FLORÊNCIO, T.; FORTES FILHO, J.B.; NAKANAMI, C.R.; GIANINI, N.; GRAZIANO, R.M.; et al. Proposta de diretrizes brasileiras do exame e tratamento de retinopatia da prematuridade (ROP). **Arq Bras Oftalmol**, vol. 70,

n. 5, p. 875-83, 2007.

ZHOU, J.; SHUKLA, V.V.; JOHN, D.; CHEN, C. Human Milk Feeding as a Protective Factor for Retinopathy of Prematurity: A Meta-analysis. **Pediatrics**, vol. 136, n. 6, p.1576-86, 2015.

8- ARTIGO 1

Associação entre Ingesta de Leite Materno e Desenvolvimento de Retinopatia da Prematuridade

Luciana T Fonseca, MD (1) (2)

Denise C Senna, MD (1)

Gabriela U Eckert, MD, PhD (3)

Rita C Silveira, MD, PhD (2) (3)

Renato S Procianoy, MD, PhD (2) (3)

(1) Hospital da Criança Conceição (HCC)

(2) Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

(3) Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Departamento de Pediatria, Serviço de Neonatologia, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Hospital da Criança Conceição, Porto Alegre, RS, Brasil.

Palavras chave: Retinopatia da Prematuridade (ROP); Leite Materno; Recém-nascido de muito baixo peso; IGF-1; Prematuridade.

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

RESUMO

Introdução: A retinopatia da prematuridade (ROP) é uma das principais causas de cegueira e morbidade visual na infância. É uma doença ocular vasoproliferativa secundária à vascularização inadequada da retina dos recém-nascidos (RN) prematuros (PMT). Sua etiologia é multifatorial e não está completamente elucidada. Dentre os fatores implicados na sua patogênese estão a exposição da retina em desenvolvimento a níveis anormais de oxigênio e a deficiência do fator de crescimento insulínico-1 (*insulin-like growth factor-1, IGF-1*). O leite materno (LM) contém *IGF-1* e pode ter um efeito protetor contra o desenvolvimento da ROP.

Objetivos: Avaliar o possível efeito protetor do LM contra a ROP, através da comparação da quantidade de leite materno recebida entre os pacientes que desenvolveram ROP e aqueles livres da doença. Tentar determinar a quantidade mínima necessária e o momento em que o RN precisa receber o LM para que esse efeito seja significativo.

Pacientes e métodos: Estudo de coorte observacional incluindo RNs com peso de nascimento (PN) inferior a 1500 gramas e / ou com idade gestacional (IG) inferior a 32 semanas, nascidos no período de janeiro de 2011 a outubro de 2014 e internados nas primeiras 24 horas de vida na UTI Neonatal do Hospital da Criança Conceição (HCC) em Porto Alegre.

Resultados: A prevalência da ROP em qualquer grau foi de 31% (100 casos em 323 pacientes) e a de ROP grave foi de 9% (29 casos em 323 pacientes). A mediana da quantidade de LM recebida pelos pacientes foi de 10,2mL/kg/dia entre os pacientes sem ROP (amplitude interquartil 1,5-25,5) e de 4,9 mL/kg/dia entre os pacientes com ROP (0,3-15,4). A quantidade de leite materno recebida nas primeiras seis semanas de vida

foi inversamente associada à incidência de ROP em qualquer grau e de ROP grave nas análises univariadas, mas a significância estatística não se manteve após análise multivariada para controle de fatores confundidores na maioria dos períodos avaliados, exceto na sexta semana de vida.

Conclusão: Pequenas quantidades de LM não são suficientes para prevenção de ROP em PMTs de risco para a doença.

Palavras-chave: Retinopatia da prematuridade e leite materno.

INTRODUÇÃO

A ROP é uma doença com potencial de causar cegueira que está se tornando mais prevalente com a melhoria dos serviços neonatais em muitos países nos últimos anos¹. É uma doença ocular vasoproliferativa secundária à vascularização incompleta da retina dos PMTs².

O curso natural da ROP pode levar à cegueira, causando um peso social e financeiro para a sociedade. A visão irreversivelmente prejudicada também impede o desenvolvimento cognitivo e psicomotor adequado das crianças afetadas³.

A etiologia é multifatorial e não está completamente elucidada. Dentre os fatores implicados na sua patogênese estão a exposição da retina em desenvolvimento a níveis anormais de oxigênio⁴⁻⁶ e a deficiência de *IGF-1*⁷.

O leite humano contém *IGF-1*⁸, portanto pode ter um efeito protetor contra o desenvolvimento da ROP.

A associação entre ingesta de LM e ROP já foi estudada, com resultados conflitantes. Heller e cols. não encontraram associação entre ingesta de LM e risco reduzido de ROP grave (tratada cirurgicamente) em RNs de extremo baixo peso (RNEBP, PN <1000 gramas)⁹. Hylander e cols. encontraram menor incidência de ROP entre RNs de muito baixo peso (RNMBP, PN <1500 gramas) alimentados com LM quando comparados aos alimentados exclusivamente com FL¹⁰. Kao e cols. compararam a incidência de ROP entre RNs que receberam LM em qualquer quantidade (da própria mãe ou de banco de leite) versus RNs que receberam exclusivamente fórmula láctea para alimentação, e não encontraram associação significativa entre alimentação com LM e risco de ROP¹¹. Manzoni e cols. compararam 314 RNs que receberam LM exclusivo com 184 RNs que receberam apenas FL para PMT (280 RNs que receberam ambos os leites ou

não atingiram 50mL/kg/dia de ingesta de leite no momento da ocorrência da ROP foram excluídos do estudo). A incidência de ROP em qualquer estágio foi significativamente mais baixa em RNs alimentados com LM quando comparado aos neonatos alimentados com FL¹².

O motivo das divergências pode estar na quantidade de LM recebida pelos PMTs. É possível que o efeito protetor do LM só se manifeste quando ingerido em quantidades maiores, ou em um momento determinado, possivelmente nas primeiras semanas de vida, quando a deficiência de *IGF-1* está relacionada com ROP⁷.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor do LM contra a ROP através da comparação da quantidade de leite materno recebida entre os pacientes que desenvolveram ROP e aqueles livres da doença. Objetivou também determinar a quantidade mínima necessária e o momento em que o RN precisa receber o LM para que esse efeito seja significativo.

PACIENTES E MÉTODOS

População e logística:

A população da pesquisa foi constituída por todos os RNs com PN inferior a 1500g e / ou com IG inferior a 32 semanas, internados na UTI Neonatal do HCC no período de janeiro de 2011 a outubro de 2014. Foram excluídos os pacientes transferidos de outros hospitais que chegaram ao HCC com mais de 24 horas de vida, pacientes com malformações congênitas maiores e pacientes que evoluíram ao óbito antes de completar a avaliação oftalmológica.

Trata-se de um estudo de coorte observacional, com dados retrospectivos e prospectivos. Os dados retrospectivos foram pesquisados nos prontuários no Serviço de Arquivo Médico e Estatística. A parte prospectiva da pesquisa foi realizada através do acompanhamento dos pacientes durante sua internação na UTI Neonatal, na Unidade de Cuidados Intermediários e, após a alta, no ambulatório de Oftalmologia.

As variáveis avaliadas foram as seguintes: 1- Dados maternos e do parto: Pré-natal, uso de corticóide (CTC) antenatal, infecção ovular, pré-eclâmpsia e via de parto. 2- Dados do RN: Sexo, PN, IG (definida por ecografia quando havia US obstétrica realizada até 12 semanas de IG ou por Ballard na ausência de ecografia precoce), classificação do peso para a IG (pequeno, adequado ou grande para a IG), Apgar no 5º minuto, SNAPPE 2 (escore de gravidade), transferência de outro hospital e gemelaridade. 3- Dados da evolução do RN na UTI: Síndrome do desconforto respiratório (SDR), sepse precoce, sepse tardia, sepse fúngica confirmadas por hemocultura (hmc), uso de dopamina, hiperglicemia, enterocolite necrotizante (ECN), displasia broncopulmonar (DBP), hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV (HPIV III / IV), tempo de ventilação mecânica (VM), tempo de uso de *CPAP* nasal, tempo total de uso de oxigênio (O₂), persistência do canal arterial (PCA), número de transfusões de concentrado de hemácias (CHAD) ao longo da internação na UTI Neonatal, tempo de uso de nutrição parenteral (NPT), idade de início da alimentação enteral, idade que atingiu dieta enteral plena e tempo de internação. 4- Dados da alimentação: A quantidade de leite materno recebida foi verificada diariamente, em mL/kg/dia, desde o nascimento dos RNs até que completassem 6 semanas de vida ou recebessem alta hospitalar. 5- Dados da avaliação oftalmológica: Desenvolvimento e gravidade da ROP e necessidade de tratamento cirúrgico para ROP por fotocoagulação a laser. O estadiamento da doença foi realizado de acordo

com a Classificação Internacional da ROP (*International Committee for the Classification of ROP*, 2005). Os exames de mapeamento de retina fazem parte da rotina assistencial do Serviço de Neonatologia do HCC e foram realizados pela mesma médica oftalmologista capacitada. O acompanhamento oftalmológico era iniciado durante a internação hospitalar e mantido via ambulatório após a alta. O seguimento foi considerado completo quando os pacientes foram acompanhados até 40 semanas de IG corrigida ou apresentaram retinas totalmente vascularizadas ou com mínima área avascular.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e da UFRGS e foi aplicado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos pais dos pacientes da parte prospectiva da pesquisa.

Análise estatística:

O tamanho da amostra calculado foi de 292 pacientes. O cálculo foi baseado em uma incidência de ROP de 28% (dados locais), objetivando detectar uma redução de ROP em 50% com poder de 80% e nível de significância estatística de 0,05; conforme o estudo de Hylander e cols. que demonstrou menor incidência de ROP entre RNs de muito baixo peso alimentados com LM quando comparados aos alimentados exclusivamente com FL¹⁰.

Inicialmente os pacientes foram divididos em dois grupos: com ROP (qualquer grau) e sem ROP.

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão (distribuição simétrica) ou mediana e amplitude interquartil (distribuição assimétrica). As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas.

Para comparar as variáveis quantitativas foi aplicado o teste t de Student (distribuição simétrica) ou o teste U de Mann-Whitney (distribuição assimétrica). Para avaliar

a associação entre as variáveis qualitativas, foram empregados os testes qui-quadrado e exato de Fisher.

As análises foram realizadas verificando a quantidade de LM recebida durante todo o período do estudo (primeiros 42 dias de vida) e também semanalmente (semana 1, semana 2, semana 3, semana 4, semana 5 e semana 6), na tentativa de avaliar o momento em que a ingesta de LM é importante para prevenir ROP.

Foi realizada uma análise multivariada através de regressão de Poisson com ajuste para variâncias robustas para a determinação das razões de prevalências ajustadas para os principais fatores envolvidos. Alguns fatores significativos na análise univariada foram excluídos da análise multivariada devido a multicolinearidade.

Posteriormente efetuou-se uma nova divisão de grupos: com ROP grave (ROP grau ≥ 3) e sem ROP ou com ROP leve (grau ≤ 2) e todas as análises foram repetidas.

O nível de significância estatística adotado foi $p < 0,05$ e as análises foram realizadas no programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versão 18.0.

RESULTADOS

No período do estudo, 456 RNs com PN <1500 g e / ou IG <32 semanas foram internados na UTI Neonatal do HCC nas primeiras 24h de vida. Destes, 12 pacientes foram excluídos por malformações congênitas maiores e 102 por óbito antes de completar avaliação oftalmológica. Um total de 342 pacientes foram inicialmente incluídos no estudo. Dezenove pacientes foram perdidos por não terem completado a avaliação oftalmológica (não compareceram nas consultas de acompanhamento ambulatorial). Participaram da análise final 323 pacientes. Comparados aos pacientes incluídos no estudo, aqueles que morreram antes de completar a avaliação oftalmológica tinham menor peso

de nascimento, menor idade gestacional, menor uso de corticóide antenatal, maiores taxas de infecção ovular e maior gravidade, com escores *SNAPPE II* mais altos (tabela 1).

A prevalência da ROP em qualquer grau foi de 31% (100 casos) e a de ROP grave foi de 9% (29 casos). A quantidade média de leite materno recebida por dia nos primeiros 42 dias de vida foi de 13,7mL/kg/dia (19,1% da quantidade total de leite recebida no período). A quantidade média de fórmula láctea recebida por dia nesse mesmo período foi de 57,9mL/kg/dia (80,9% da quantidade total de nutrição enteral recebida no período).

Na análise inicial (pacientes com ROP em qualquer grau *versus* sem ROP), a mediana da quantidade de LM recebida pelos pacientes foi de 10,2mL/kg/dia entre os pacientes sem ROP (amplitude interquartil 1,5-25,5) e de 4,9 mL/kg/dia entre os pacientes com ROP (0,3-15,4). A presença de ROP teve associação estatisticamente significativa na análise univariada com diversos fatores estudados, dentre eles a quantidade de leite materno recebida nos primeiros 42 dias de vida e separadamente em todas as 6 semanas avaliadas (tabela 2).

Após análise multivariada, apenas sepse fúngica, PCA, IG e quantidade de LM recebida na semana 6 mantiveram-se significativamente associados ao desenvolvimento de ROP (tabela 3).

Na segunda análise (pacientes com ROP grave *versus* sem ROP ou com ROP leve) a mediana da quantidade de LM recebida pelos pacientes foi de 8,4mL/kg/dia (1,3-23,1) entre os pacientes sem ROP grave e de 2,4mL/kg/dia (0,12-12,6) entre os pacientes com ROP grave.

A presença de ROP grave teve associação estatisticamente significativa na análise univariada com diversos fatores avaliados, dentre eles a quantidade de LM recebida

ao longo dos 42 primeiros dias de vida e separadamente nas semanas 1, 4, 5 e 6 (tabela 4).

Após análise multivariada, apenas sepse fúngica, DBP e tempo de VM mantiveram-se significativamente associados ao desenvolvimento de ROP grave (tabela 5).

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, apesar do LM ter se mostrado protetor contra ROP na análise univariada em todos os períodos avaliados, apenas a quantidade de LM recebida na 6ª semana de vida manteve significância estatística após ajuste para variáveis confundidoras. A grande maioria dos prematuros em risco para ROP na nossa população recebe uma alimentação mista, com pouca quantidade de LM e predomínio de FL. A quantidade média de LM recebida por dia nos primeiros 42 dias de vida na nossa população foi muito baixa, de apenas 13,7mL/kg/dia (19,1% da quantidade total de leite recebida no período).

Possivelmente essa quantidade baixa de LM não é suficiente para prevenir ROP. Outro fator que pode ter contribuído para os nossos achados é que quase todo o LM ordenhado no HCC é pasteurizado. Apenas o LM que é ordenhado à beira do leito na hora da dieta é oferecido fresco (prática ainda pouco frequente na nossa unidade). Todo LM congelado foi pasteurizado e não apenas descongelado durante o período do estudo. Sabe-se que o processo de pasteurização reduz as quantidades de *IGF-1* do LM. No estudo de Goelz e cols., o aquecimento por 30 minutos reduziu a quantidade de *IGF-1* do LM em 39,4%¹³. Também é possível que o LM seja importante na prevenção da ROP em um momento mais tardio, como a partir da sexta semana de vida, momento em que

conseguimos demonstrar efeito protetor do LM contra ROP apesar das pequenas quantidades de LM recebidas pelos RNs estudados.

A partir do estudo de Manzoni e cols. de 2013¹², o efeito protetor do LM exclusivo (fresco ou congelado e descongelado) comparado à FL exclusiva parece ter ficado bem estabelecido. Spiegler e cols., em estudo recém-publicado, também compararam RNMBPs que receberam LM exclusivo com aqueles que receberam somente FL e a alimentação exclusiva com FL esteve associada a risco maior para o desenvolvimento de DBP, ECN e ROP¹⁴. Estudos anteriores apresentavam resultados conflitantes, possivelmente devido a diferenças na quantidade de LM recebida pelos RNs estudados. Por exemplo: Heller e cols. não encontraram associação entre ingesta de LM e risco reduzido de ROP tratada cirurgicamente em RNEBP, mas a ingesta de LM era baixa na população deste estudo, correspondendo a apenas cerca de 15% do volume total de nutrição durante a hospitalização⁹. Já Hylander e cols. encontraram menor incidência de ROP entre RNMBP alimentados com LM quando comparados aos alimentados exclusivamente com FL, pois a taxa de aleitamento materno entre mães de RNMBP na população deste estudo foi de 57%, bastante alta quando comparada aos 36% reportados nacionalmente nos Estados Unidos¹⁰. Uma metanálise recém-publicada reforçou esta hipótese. Zhou e cols. selecionaram estudos longitudinais comparando a incidência de ROP entre RNs alimentados com LM e FL. Para ROP em qualquer estágio, os ORs (IC 95%) foram os seguintes: LM exclusivo versus FL em qualquer quantidade: 0,29 (0,12 - 0,72); LM predominante versus FL predominante: 0,51 (0,26 - 1,03); LM qualquer quantidade versus FL exclusiva: 0,54 (0,15 - 1,96); e LM exclusivo versus FL exclusiva: 0,25 (0,13 - 0,49). Para ROP grave, eles foram de 0,11 (0,04 - 0,30), 0,16 (0,06 - 0,43), 0,42 (0,08-2,18), e 0,10 (0,04 - 0,29), respectivamente. Os autores concluíram que, com base nas limitadas evidências atuais, em RNs muito prematuros a alimentação

com leite humano potencialmente desempenha um papel protetor na prevenção de ROP em qualquer estágio e da ROP grave¹⁵. Esta metanálise deixou clara a associação entre a quantidade de LM recebida e o poder de proteção contra ROP, sendo este indiscutível quando a alimentação com LM é exclusiva, e difícil de demonstrar quando a alimentação é mista.

Quanto à importância do LM em um período mais tardio, outros autores obtiveram resultado semelhante: Okamoto e cols. conduziram um estudo com o objetivo de identificar os possíveis fatores de risco para a progressão da ROP até o descolamento de retina em RNEBP. Eles encontraram uma diferença marcante na ingestão diária de leite humano entre as crianças com e sem descolamento de retina quando pareados pela IG em um período pós-natal específico: 5 a 7 semanas de idade pós-natal¹⁶.

Sabe-se que a deficiência de *IGF-1* nas primeiras semanas de vida está relacionada com ROP⁷; entretanto, outros componentes presentes no LM podem influenciar no desenvolvimento da ROP e contribuir para esse efeito protetor em um período mais tardio. As precárias defesas antioxidantes do PMT e sua reduzida habilidade em sintetizar ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (*long chain polyunsaturated fatty acids*, LCPUFAs) já foram implicadas na patogênese da ROP^{17, 18}. O inositol é um nutriente essencial ao crescimento e sobrevivência das células humanas cuja administração em pretermos resultou em menor incidência de ROP¹⁹; além disso, as chances de desenvolver ROP grave são maiores entre as crianças com baixa concentração sérica de inositol²⁰. O leite humano contém LCPUFAs e enzimas antioxidantes, incluindo o inositol^{21, 22}.

Como pontos positivos do nosso estudo podemos citar que tentamos superar os problemas metodológicos de estudos prévios através de um projeto desenhado especificamente para identificar a quantidade de LM necessária para prevenção de ROP em

RNs de risco para a doença. Devemos apontar também o sucesso do seguimento, já que apenas 19 de 342 pacientes (5,5%) foram perdidos por não retornarem ao ambulatório para completar avaliação oftalmológica.

Nosso estudo foi limitado pela pequena quantidade de LM que os RNs em risco para ROP receberam na população estudada. Isto serve de alerta para a necessidade de intensificarmos o incentivo à ordenha de leite pelas mães dos PMTs para alimentação dos seus bebês. Independente da proteção para ROP, é sabido que a alimentação de PMTs com leite humano reduz o risco de diversos desfechos negativos da prematuridade como sepse tardia e ECN, assim como reduz a duração da hospitalização na UTI Neonatal²³.

Podemos concluir que LM em pequena quantidade não é suficiente para prevenção de ROP. Estudos futuros precisam incluir RNs que recebam um maior aporte de LM para tentar encontrar um possível ponto de corte, uma quantidade mínima de LM a partir da qual se consiga demonstrar efeito protetor contra ROP. Análises por períodos também seriam interessantes, com atenção especial a um momento mais tardio, como 5^a a 8^a semanas de vida, já que nosso estudo, apesar das limitações, conseguiu demonstrar efeito protetor significativo do LM contra ROP quando analisada a quantidade de LM recebida na sexta semana de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Vania Naomi Hirakata pelo auxílio na análise estatística.

REFERÊNCIAS

1. QUINN, G.E.; GILBERT, C.; DARLOW, B.A.; ZIN, A. Retinopathy of prematurity: an epidemic in the making. **Chin Med J**, vol. 123, n.20, p. 2929-37, 2010.
2. FIELDER, A.R.; REYNOLDS, J.D. Retinopathy of prematurity: clinical aspects. **Semin Neonatol**, vol. 6, n. 6, p. 461-75, 2001.
3. WHEATLEY, C.M.; DICKINSON, J.L.; MACKEY, D.A.; CRAIG, J.E.; SALE, M.M. Retinopathy of prematurity: recent advances in our understanding. **Br J Ophthalmol**, vol. 86, n. 6, p. 696-700, 2002.
4. CAMPBELL, K. Intensive oxygen therapy as a possible cause of retrolental fibroplasia: a clinical approach. **Med J Australia**, n. 2, p.48-50, 1951.
5. PATZ, A.; HOECK, L.E.; DE LA CRUZ. Studies on the effect of high oxygen administration in retrolental fibroplasia: I. Nursery observations. **Am J Ophthalmol**, n. 35, p.1248-53, 1952.
6. PATZ, A. The role of oxygen in retrolental fibroplasia. **Albrecht Von Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol**, n. 195, p.77-85, 1975.
7. HELLSTROM, A.; PERRUZZI, C.; JU, M.; ENGSTROM, E.; HARD, A.L.; LIU, J.L.; et al. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 98, p. 5804-8, 2001.
8. OZGURTAS, T.; AYDIN, I.; TURAN, O.; KOC, E.; HIRFANOGLU, I.M.; ACIKEL, C.H.; et al. Vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor levels in human milk of mothers with term and preterm neonates. **Cytokine**, vol. 50, n. 2, p. 192-4, 2010.

9. HELLER, C.D.; O'SHEA, M.; YAO, Q.; LANGER, J.; EHRENKRANZ, R.A.; PHELPS, D.L.; et al. Human milk intake and retinopathy of prematurity in extremely low birth weight infants. **Pediatrics**, vol. 120, n. 1, p. 1-9, 2007.
10. HYLANDER, M.A.; STROBINO, D.M.; PEZZULLO, J.C.; DHANIREDDY, R. Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birth weight infants. **J Perinatol**, vol. 21, n. 6, p. 356-62, 2001.
11. KAO, J.S.; DAWSON, J.D.; MURRAY, J.C.; DAGLE, J.M.; BERENDS, S.K.; GILLEN, S.B.; et al. Possible roles of bilirubin and breast milk in protection against retinopathy of prematurity. **Acta Paediatr**, vol. 100, n. 3, p. 347-51, 2011.
12. MANZONI, P.; STOLFI, I.; PEDICINO, R.; VAGNARELLI, F.; MOSCA, F.; PUGNI, L.; et al; Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections, Italian Society of Neonatology. Human milk feeding prevents retinopathy of prematurity (ROP) in preterm VLBW neonates. **Early Hum Dev**, vol. 89, n.1, p. 64-8, 2013.
13. GOELZ, R.; HIHN, E.; Hamprecht K, Dietz K, Jahn G, Poets C, et al. Effects of different CMV-heat-inactivation-methods on growth factors in human breast milk. **Pediatr Res**, vol. 65, n. 4, p. 458-61, 2009.
14. SPIEGLER, J.; PREUß, M.; GEBAUER, C.; BENDIKS, M.; HERTING, E.; GÖPEL, W.; German Neonatal Network GNN. Does Breastmilk Influence the Development of Bronchopulmonary Dysplasia? **J Pediatr**, n. 169, p. 76-80, 2016.
15. ZHOU, J.; SHUKLA, V.V.; JOHN, D.; CHEN, C. Human Milk Feeding as a Protective Factor for Retinopathy of Prematurity: A Meta-analysis. **Pediatrics** vol. 136, n. 6, p. 1576-86, 2015.

16. OKAMOTO, T.; SHIRAI, M.; KOKUBO, M.; TAKAHASHI, S.; KAJINO, M.; TAKASE, M. et al. Human milk reduces the risk of retinal detachment in extremely low-birth weight infants. **Pediatr Int**, vol. 49, n. 6, p. 894-7, 2007.
17. ASIKAINEN, T.M.; WHITE, C.W. Pulmonary antioxidant defenses in the preterm newborn with respiratory distress and bronchopulmonary dysplasia in evolution: implications for antioxidant therapy. **Antioxid Redox Signal**, vol. 6, n. 1, p. 155-67, 2004.
18. CONNOR, W.E.; NEURINGER, M.; REISBICK, S. Essential fatty acids: the importance of n-3 fatty acids in the retina and brain. **Nutr Rev**, n. 50, p. 21-9, 1992.
19. HALLMAN, M.; BRY, K.; HOPPU, K. et al. Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, n. 326, p. 1233-9, 1992.
20. FRIEDMAN, C.A.; McVEY, J.; BORNE, M.J.; JAMES, M.; MAY, W.L.; TEMPLE, D.M. et al. Relationship between serum inositol concentration and development of retinopathy of prematurity: a prospective study. **J Pediatr Ophthalmol Strabismus**, vol. 37, n. 2, p. 79-86, 2000.
21. JENSEN, R.G. Lipids in human milk. **Lipids**, vol. 34, n.12, p. 1243-71, 1999.
22. FRIEL, J.K.; MARTIN, S.M.; LANGDON, M.; HERZBERG, G.R.; BUETTNER, G.R. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. **Pediatr Res**, n. 51, p. 612-8, 2002.
23. SCHANLER, R.J.; LAU, C.; HURST, N.M.; SMITH, E.O. Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. **Pediatrics**, vol. 116, n. 2, p. 400-6, 2005.

Tabela 1 – Comparação entre pacientes incluídos no estudo e óbitos antes de completar avaliação oftalmológica

	Pacientes incluídos 323 patients	Óbitos 102 pacientes	Valor de p
Pré-natal	295 (91,3%)	90 (88,5%)	0,496
CTC antenatal	216 (66,9%)	43 (42,3%)	<0,001
Infecção ovular	32 (10,0%)	23 (22,9%)	0,023
BR > 18 horas	66 (20,4%)	16 (16,2%)	0,416
Pré-eclâmpsia	114 (35,3%)	25 (24,8%)	0,060
Sexo masculino	162 (50,2%)	53 (52,4%)	0,776
Apgar 5' < 7	53 (16,4%)	57 (56,3%)	<0,001
Peso de Nascimento	1200,8 ± 264,3	785,1 ± 206,0	<0,001
Idade gestacional	30,1 ± 2,3	26,1 ± 2,8	<0,001
<i>SNAPPE II</i>	15 (8-29)	53 (40-70,5)	<0,001

Dados expressos em média ± desvio padrão, mediana e amplitude interquartil, ou em proporção (%) quando aplicável. CTC, corticoide; BR, bolsa rota; *SNAPPE II*, *Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*.

Tabela 2 – Associação entre fatores estudados e ROP na análise univariada

	RNs sem ROP 223 pacientes (69%)	RNs com ROP 100 pacientes (31%)	Valor de p
Pré-natal	206 (92,4%)	89 (89%)	0,425
CTC antenatal	152 (68,2%)	64 (64%)	0,544
Infecção ovular	25 (11,2%)	17 (17%)	0,253
Pré-eclâmpsia	84 (37,7%)	30 (30%)	0,262
Parto vaginal	74 (33,2%)	37 (37%)	0,581
Sexo masculino	107 (48%)	55 (55%)	0,332
Pequeno para IG	103 (46,2%)	34 (34%)	0,085
Gemelaridade	48 (21,5%)	15 (15%)	0,240
Transferência	17 (7,6%)	8 (8%)	0,923
Apgar 5' <7	23 (10,5%)	29 (29%)	<0,001
SDR	99 (44,4%)	86 (86%)	<0,001
Sepse precoce (hmc+)	4 (1,8%)	1 (1%)	0,635
Sepse tardia (hmc+)	57 (25,6%)	57 (57%)	<0,001
Sepse fúngica (hmc+)	6 (2,7%)	12 (12%)	0,002
Uso dopamina	49 (22%)	44 (44%)	<0,001
Hiperglicemia	19 (8,5%)	17 (17%)	0,034
ECN	19 (8,5%)	19 (19%)	0,009
DBP	37 (16,6%)	57 (57%)	<0,001
HPIV III / IV	5 (2,2%)	17 (17%)	<0,001
PCA	31 (13,9%)	47 (47%)	<0,001
Peso de nascimento	1272 ± 237	1041 ± 253	<0,001
Idade gestacional	30,8 ± 2	28,6 ± 2,2	<0,001
SNAPPE II	13 (5-23)	25 (13-47,5)	<0,001
Nº CHAD	1 (0-2)	5 (2-9)	<0,001
Tempo de VM	0 (0-3)	9,5 (1-38,5)	<0,001
Tempo de CPAPn	3 (1-8)	8,5 (3-15)	<0,001
Tempo de O ₂	5 (1-16)	35 (11-65,5)	<0,001
Tempo de NPT	3 (2-6)	6 (3,5-10)	<0,001
Início dieta enteral	4,7 (2-6)	6 (3,5-10)	<0,001
Enteral plena	16 (2-24)	28,5 (17-40)	<0,001
Tempo de internação	48 ± 20	80 ± 39	<0,001
LM 42 dias	10,2 (1,5-25,5)	4,9 (0,3-15,4)	0,005
LM semana 1	0,43 (0-4,3)	0 (0-1,1)	0,003
LM semana 2	7 (0-22,6)	1,4 (0-10,5)	0,003
LM semana 3	5,9 (0-23)	2,2 (0-16,7)	0,034
LM semana 4	7,9 (0-27,6)	1,4 (0-14,5)	0,015
LM semana 5	6,9 (0-34,1)	1,3 (0-14,3)	0,003
LM semana 6	4 (0-37)	0 (0-15)	0,016

Dados expressos em média ± desvio padrão, mediana e amplitude interquartil, ou em proporção (%) quando aplicável. ROP, retinopatia da prematuridade; RN, recém-nascido; CTC, corticoide; IG, idade gestacional; SDR, síndrome do desconforto respiratório; hmc, hemocultura; ECN, enterocolite necrosante; DBP, displasia broncopulmonar; HPIV III/IV, hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV; PCA, persistência do canal arterial; SNAPPE II, *Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*; CHAD, concentrado de hemácias; VM, ventilação mecânica; CPAPn, *nasal continuous positive airway pressure*; O₂, oxigênio; NPT, nutrição parenteral total; LM, leite materno.

Tabela 3 – Fatores significativamente associados à ROP na análise multivariada

	Risco relativo	IC 95%	Valor de p
Sepse fúngica (hmc+)	1,47	1,06-2,03	0,021
PCA	1,58	1,18-2,12	0,002
Idade gestacional	0,87	0,80-0,95	0,002
LM semana 6	0,99	0,98-1,00	0,041

Também participaram da análise multivariada mas não mantiveram significância estatística: sepse tardia, ECN, DBP, HPIV III ou IV, SNAPPEII e tempo de VM. ROP, retinopatia da prematuridade; IC, intervalo de confiança; hmc, hemocultura; PCA, persistência do canal arterial; LM, leite materno; ECN, enterocolite necrosante; DBP, displasia broncopulmonar; HPIV III/IV, hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV; *SNAPPE II*, *Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*; VM, ventilação mecânica.

Tabela 4 – Associação entre fatores estudados e ROP grave na análise univariada

	RNs sem ROP grave 294 pacientes (91%)	RNs com ROP grave 29 pacientes (9%)	Valor de p
Pré-natal	288 (91,8%)	25 (86,2%)	0,298
Infecção ovular	37 (12,6%)	5 (17,2%)	0,560
CTC pré-natal	202 (68,7%)	14 (48,2%)	0,029
Pré-eclâmpsia	109 (37%)	5 (17,2%)	0,044
Parto vaginal	97 (33%)	14 (48,2%)	0,105
Sexo masculino	146 (49,7%)	16 (55,2%)	0,571
Pequeno para IG	127 (43,2%)	10 (34,5%)	0,433
Gemelaridade	59 (20,1%)	4 (13,8%)	0,623
Transferência	22 (7,5%)	3 (10,3%)	0,480
Apgar 5' <7	40 (13,8%)	12 (42,9%)	<0,001
SDR	157 (53,4%)	28 (96,6%)	0,003
Sepse precoce (hmc+)	5 (1,7%)	0 (0%)	1,000
Sepse tardia (hmc+)	97 (33%)	17 (58,6%)	0,008
Sepse fúngica (hmc+)	11 (3,7%)	7 (24,1%)	<0,001
Uso dopamina	76 (25,9%)	17 (58,6%)	<0,001
Hiperglicemia	29 (9,9%)	7 (24,1%)	0,019
ECN	28 (9,5%)	10 (34,5%)	<0,001
DBP	69 (23,5%)	25 (86,2%)	<0,001
HPIV III / IV	14 (4,8%)	8 (27,6%)	<0,001
PCA	62 (21,1%)	16 (55,2%)	<0,001
Peso de nascimento	1230 ± 250	901 ± 211	<0,001
Idade gestacional	30,4 ± 2,2	27,5,6 ± 2,1	<0,001
<i>SNAPPE II</i>	15 (8-15)	39 (16,5-52,5)	<0,001
Nº CHAD	1 (0-3,3)	10 (5,5-16,5)	<0,001
Tempo de VM	0 (0-7)	49 (15,5-62,5)	<0,001
Tempo de CPAPn	3 (1-10)	9 (5-15)	0,028
Tempo de O ₂	7 (2-26,3)	68 (44-91)	<0,001
Tempo de NPT	16 (10,8-23,6)	35 (20-60)	<0,001
Início dieta enteral	4 (2-7)	6 (4-12)	0,006
Enteral plena	17 (13-28)	34 (22-53,5)	0,020
Tempo de internação	53 ± 23,6	106,8 ± 53,2	<0,001
LM 42 dias	8,4 (1,3-23,1)	2,4 (0,12-12,6)	0,034
LM semana 1	0 (0-3,6)	0 (0-1,3)	0,044
LM semana 2	5,6 (0-21,3)	0 (0-7,1)	0,087
LM semana 3	4,8 (0-21,2)	1,1 (0-15,7)	0,085
LM semana 4	6,6 (0-25)	0 (0-6,6)	0,048
LM semana 5	6 (0-28)	0 (0-10,9)	0,030
LM semana 6	3,6 (0-30)	0 (0-4,2)	0,042

Dados expressos em média ± desvio padrão, mediana e amplitude interquartil, ou em proporção (%) quando aplicável. ROP, retinopatia da prematuridade; RN, recém-nascido; CTC, corticoide; IG, idade gestacional; SDR, síndrome do desconforto respiratório; hmc, hemocultura; ECN, enterocolite necrosante; DBP, displasia broncopulmonar; HPIV III/IV, hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV; PCA, persistência do canal arterial; *SNAPPE II*, *Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*; CHAD, concentrado de hemácias; VM, ventilação mecânica; CPAPn, *nasal continuous positive airway pressure*; O₂, oxigênio; NPT, nutrição parenteral total; LM, leite materno.

Tabela 5 – Fatores de risco significativamente associados à ROP grave na análise multivariada

	Risco relativo	IC 95%	Valor de p
Sepse fúngica (hmc+)	3,64	1,57-8,41	0,003
DBP	4,2	1,28-13,82	0,018
Tempo de VM	1,01	1,01-1,02	<0,001

Também participaram da análise multivariada mas não mantiveram significância estatística: sepse tardia, ECN, PCA, HPIV III ou IV, *SNAPPE II*, IG e quantidade de LM recebida nos primeiros 42 dias de vida. ROP, retinopatia da prematuridade; IC, intervalo de confiança; hmc, hemocultura; DBP, displasia broncopulmonar; VM, ventilação mecânica; ECN, enterocolite necrosante; PCA, persistência do canal arterial; HPIV III/IV, hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV; *SNAPPE II*, *Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*; IG, idade gestacional; LM, leite materno.

9- ARTIGO 1 EM INGLÊS

Association between Human Breast Milk and Retinopathy of Prematurity

Running Title: Human Breast Milk and ROP

Luciana T Fonseca, MD (1) (2)

Denise C Senna, MD (1)

Gabriela U Eckert, MD, PhD (3)

Rita C Silveira, MD, PhD (2) (3)

Renato S Procianoy, MD, PhD (2) (3)

- (1) Hospital da Criança Conceição (HCC)
- (2) Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
- (3) Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Department of Pediatrics, Neonatology Section, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, and Hospital da Criança Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil.

Address for correspondence:

Renato S Procianoy: Rua Silva Jardim 1155 # 701, Porto Alegre, RS 90450-71 Brazil

e-mail:rprocianoy@gmail.com

PH; +55 51 33315726

Keywords: Retinopathy of Prematurity (ROP); Human Breast Milk; Very low Birth Weight; IGF-1; Prematurity

The authors declare no conflict of interest.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the possible protective effect of BM against ROP by comparing the amount of breast milk received among patients who developed ROP and those who were disease-free. To attempt to determine both the required minimum amount and the time in which a neonate needs to receive BM for this effect to be significant.

Methods: Cohort study of newborns with a birth weight below 1500 grams and/or gestational age less than 32 weeks, born from January 2011 to October 2014 and hospitalized within their first 24 hours of life in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) at the Hospital da Criança Conceição (HCC), in Porto Alegre- RS- Brazil.

Results: The prevalence of ROP at any degree was of 31% (100 cases in 323 patients) and of severe ROP was of 9% (29 cases in 323 patients). The median amount of BM received by patients was 10.2 mL/kg/day among patients without ROP (interquartile range 1.5-25.5) and 4.9 mL/kg/day among patients with ROP (0.3-15.4). The amount of breast milk received in the first six weeks of life was inversely associated with the incidence of ROP in any degree and of severe ROP in the univariate analyses. The statistical significance was not maintained after a multivariate analysis to control for confounding factors in the majority of the periods evaluated, except in the sixth week of life.

Conclusions: Small amounts of BM are not enough to prevent ROP in premature newborns at risk of the disease.

Keywords: Retinopathy of prematurity, breast milk.

INTRODUCTION

Retinopathy of prematurity (ROP) is a disease that has the potential to cause blindness and has become more prevalent with the improvement of neonatal services in many countries over the last years¹. It is a vasoproliferative eye disease secondary to the incomplete vascularization of the retina in premature infants².

The natural course of ROP may lead to blindness and cause a social and financial burden to society. The irreversibly impaired vision also prevents suitable cognitive and psychomotor development in the affected infants³.

Its etiology is multifactorial and it is not completely elucidated. The exposure of the developing retina to abnormal oxygen levels⁴⁻⁶ and IGF-1 deficiency⁷ are among the factors implied in its pathogenesis.

Human breast milk (BM) contains IGF-1⁸ and, therefore, may have a protective effect against the development of ROP.

The association between BM intake and ROP has already been studied with conflicting results. Heller et al. found no association between BM intake and reduced risk of severe ROP (surgically treated) in extremely low birth weight infants (ELBW, BW <1000 grams)⁹. Hylander et al. found lower ROP incidence among very low birth weight infants (VLBW, BW <1500 g) fed with BM compared to those fed exclusively with infant formula¹⁰. Kao et al. compared the incidence of ROP among newborns who received any amount of BM (from the mother herself or from a milk bank) versus newborns who received only infant formula and found no significant association between BM feeding and ROP risk¹¹. Manzoni et al. compared 314 newborns that were fed exclusively with BM with 184 newborns who received only formula for premature infants. The incidence of ROP at any stage was significantly lower in newborns fed with

BM compared with newborns fed with infant formula¹².

The reason for divergences may lie in the amount of BM received by premature infants. It is possible that the protective effect of BM manifests itself only when ingested in higher amounts, or at a given moment, possibly in the first weeks of life, when IGF-1 deficiency is related with ROP⁷.

The purpose of this study was to assess the protective effect of BM against ROP by comparing the amount of BM received among patients who developed ROP and those who did not have the disease. It also aimed to determine the minimum amount required and the time in which a newborn needs to receive BM for this effect to be significant.

PATIENTS AND METHODS

Population and logistics:

The study population comprised of all newborns with a BW lower than 1500g and/or with a gestational age less than 32 weeks, hospitalized at the HCC Neonatal Intensive Care Unit (NICU) from January 2011 to October 2014. Patients transferred from other hospitals who arrived at the HCC with more than 24 hours of life, patients with major congenital malformations and patients who died before completing ophthalmological assessment were excluded.

This is an observational cohort study with retrospective and prospective data. The retrospective data were collected using patient records in the Medical Archive and Statistics Service. The prospective portion of the research was conducted by monitoring patients during their stay at the NICU, Intermediate Care Unit and, after discharge, at the Ophthalmology Outpatient Clinic.

The variables evaluated were as follows: 1 – Mother’s delivery data: Prenatal care, use of antenatal corticosteroid (CTC), ovular infection, preeclampsia, and mode of delivery. 2 – Newborn data: Gender, BW, gestational age (established through echography when the obstetric ultrasound was performed up to 12 weeks of gestational age or by Ballard, in the absence of early ultrasound), weight classification for gestational age (small, appropriate or large for gestational age), 5th-minute Apgar score, SNAPPE 2 (severity score), transfer from another hospital, and twinning. 3 – Newborn NICU evolution data: Respiratory distress syndrome, early-onset sepsis, late-onset sepsis, fungal sepsis (all sepsis confirmed by blood culture), use of dopamine, hyperglycemia, necrotizing enterocolitis (NEC), bronchopulmonary dysplasia (BPD), intraventricular hemorrhage grade III or IV (IVH III/IV), duration of mechanical ventilation (MV), duration of nasal CPAP use, total duration of oxygen use (O₂), Patent ductus arteriosus (PDA), number of transfusions of red cell concentrates (RCC) during hospitalization at the NICU, duration of use of parenteral nutrition (PN), age at which enteral feeding started, age at which a full enteral diet was achieved, and length of hospital stay. 4 – Feeding data: The amount of breast milk received was checked on a daily basis as mL/kg/day from birth until the newborns completed six weeks of life or were discharged. 5 – Ophthalmological assessment data: Development and severity of ROP and need for surgical treatment of ROP using laser photocoagulation. Disease staging was performed according to the International Classification of ROP (International Committee for the Classification of ROP, 2005). Retina mapping tests are part of the routine care at the HCC Neonatology Service and were performed by the same trained ophthalmologist. The ophthalmologic follow-up was initiated during hospitalization and maintained on an outpatient basis after discharge. The follow-up was considered complete when patients were monitored up to 40 weeks of corrected

gestational age or had fully vascularized retinas or a minimum avascular area.

The research project was approved by the Research Ethics Committees at Grupo Hospitalar Conceição (GHC) and UFRGS, and an informed consent form was given to the parents of the patients in the prospective arm of the study.

Statistical analysis:

The calculated sample size comprised of 292 patients. The calculation was based on a ROP incidence of 28% (local data), aiming to detect a ROP reduction by 50% with 80% power and a level of statistical significance of 0.05, which was according to a study by Hylander et al. that demonstrated a lower ROP incidence among very low birth weight newborns fed with BM compared to those fed exclusively with infant formula¹⁰.

Initially, patients were divided into two groups: with ROP (at any degree) and without ROP.

The quantitative variables were described as mean and standard deviation (symmetrical distribution) or median and interquartile range (asymmetric distribution). The qualitative variables were described as absolute and relative frequencies.

To compare the quantitative variables, the Student's t-test (symmetrical distribution) or the Mann-Whitney test (asymmetric distribution) were applied. To evaluate the association between qualitative variables, the chi-square and Fisher exact tests were used.

The analyses were performed by checking the amount of BM intake throughout the study period (first 42 days of life) and also weekly (week 1, week 2, week 3, week 4, week 5, and week 6) in an attempt to evaluate the time when BM intake is important to prevent ROP.

A multivariate analysis was conducted using the Poisson regression with

adjustment for robust variances to determine the prevalence ratios adjusted for the key factors involved. Some significant factors in the univariate analysis were excluded from the multivariate analysis due to multicollinearity.

Subsequently, a new group division was performed: patients with severe ROP (ROP grade ≥ 3) and patients without or with mild ROP (grade ≤ 2), and all analyses were repeated.

The level of statistical significance adopted was $p < 0.05$ and the analyses were performed using the SPSS (Statistical Package for Social Science) software version 18.0.

RESULTS

In the study period, 456 newborns with a BW < 1500g and/or gestational age < 32 weeks were admitted into the HCC NICU in their first 24 hours of life. Of these, 12 patients were excluded due to major congenital malformations and 102 died before completing the ophthalmic evaluation. A total of 342 patients were initially enrolled in the study. Nineteen patients were lost because they did not complete the ophthalmic evaluation (they failed to attend the outpatient follow-up appointments). Three hundred twenty-three patients participated of the final analysis. Compared with patients in the study, those who died before completing the ophthalmologic evaluation had lower birth weight, lower gestational age, less use of antenatal corticosteroids, higher ovular infection rates and greater severity, with higher SNAPPE II scores (Table 1).

The prevalence of ROP at any degree was 31% (100 cases) and of severe ROP was of 9% (29 cases). The average amount of milk received daily in the first 42 days of life was 13.7mL/kg/day (19.1% of the total amount of milk received in the period). The

average amount of infant formula received per day during this same period was 57.9mL/kg/day (80.9% of the total amount of enteral nutrition received in the period).

In the initial analysis (patients with ROP at any degree versus patients without ROP), the median amount of BM received was 10.2 mL/kg/day among patients without ROP (interquartile range 1.5-25.5) and 4.9 mL/kg/day among patients with ROP (0.3-15.4). The presence of ROP had a statistically significant association in the univariate analysis with several variables studied, including the amount of breast milk received in the first 42 days of life and, separately, in all six weeks evaluated (Table 2).

Following the multivariate analysis, only fungal sepsis, PDA, gestational age and amount of BM received at week 6 remained significantly associated with the development of ROP (Table 3).

In the second analysis (patients with severe ROP versus patients without or with mild ROP), the median amount of BM received was 8.4mL/kg /day (1.3-23.1) among patients without severe ROP and 2.4mL/kg/day (0.12-12.6) in patients with severe ROP.

The presence of severe ROP had a statistically significant association in the univariate analysis with several variables studied, including the amount of breast milk received in the first 42 days of life and separately in weeks 1, 4, 5 and 6 (Table 4).

Following the multivariate analysis, only fungal sepsis, BPD and MV time remained significantly associated with the development of severe ROP (Table 5).

DISCUSSION

In our study, despite BM having shown a protective effect against ROP in the univariate analysis in all periods evaluated, only the amount of BM received in the 6th week of life maintained statistical significance after adjustment for confounding

variables. The vast majority of premature infants at risk for ROP in our population received a mixed diet, with a low amount of BM and predominance of infant formula. The mean amount of BM received per day in the first 42 days of life in our population was very low: only 13.7mL/kg/day (19.1% of the total amount of milk received in the period).

Possibly, this low amount of BM is not enough to prevent ROP. Another factor that may have contributed to our findings is that most of the BM milked at HCC is pasteurized. Only BM that is milked at the bedside at the time of feeding is offered fresh (a practice that is still infrequent in our unit). All frozen BM was pasteurized, not just thawed during the study period. The pasteurization process is known to reduce the amounts of IGF-1 in BM. In the study by Goelz et al., heating BM for 30 minutes reduced the amount of IGF-1 in BM by 39.4%¹³. It is also possible that BM is important in the prevention of ROP at a later moment, such as from the sixth week of life, a time at which we were able to demonstrate the protective effect of BM against ROP despite the small amounts of BM received by the newborns under study.

Following the study by Manzoni et al, in 2013¹², the protective effect of exclusive BM (fresh or frozen and thawed) compared with the exclusive infant formula seems to have been well established. Spiegler et al., in a newly published study, also compared very low birth weight newborns who were exclusively given BM with those who received only infant formula, and exclusive formula feeding was associated with a greater risk for the development of BPD, NEC and ROP¹⁴. Previous studies showed conflicting results, possibly due to differences in the amount of BM received by the newborns under study. For example, Heller et al. found no association between BM intake and reduced risk of ROP surgically treated in extremely low birth weight infants, but the BM intake was low in the study population, accounting for only about 15% of

the total feeding volume during hospitalization⁹. Hylander et al. found a lower incidence of ROP among VLBW infants fed with BM compared to those fed exclusively with infant formula, since the breastfeeding rate among mothers of VLBW infants in the study population was 57%, which is quite high when compared with 36% as reported nationally in the United States¹⁰. A recently published meta-analysis supported this hypothesis. Zhou et al. selected longitudinal studies comparing the incidence of ROP among newborns fed with BM and infant formula. For ROP at any stage, the ORs (95% CI) were the following: BM alone versus infant formula in any amount: 0.29 (0.12-0.72); Predominant BM versus predominant infant formula: 0.51 (0.26-1.03); BM in any amount versus infant formula alone: 0.54 (0.15-1.96); and BM alone versus infant formula alone: 0.25 (0.13-0.49). For severe ROP, they were 0.11 (0.04-0.30), 0.16 (0.06-0.43), 0.42 (0.08-2.18) and 0.10 (0.04-0.29), respectively. The authors concluded that, based on the limited current evidence, in very premature newborns, human milk feeding potentially plays a protective role in the prevention of ROP at any stage and of severe ROP¹⁵. This meta-analysis clearly demonstrated the association between the amount of BM received and the protective power against ROP, which is undeniable when BM feeding is exclusive and difficult to demonstrate when feeding is mixed.

As for the importance of BM in a later period, other authors obtained a similar result. Okamoto et al. conducted a study to identify possible risk factors for the progression of ROP up to retinal detachment in ELBW infants. They found a substantial difference in the daily intake of human milk among infants with and without retinal detachment when paired by gestational age in a specific postnatal period of 5 to 7 weeks of postnatal age¹⁶.

IGF-1 deficiency in the first weeks of life is known to be related to ROP⁷; however, other components present in the BM may influence the development of ROP

and contribute to the protective effect in a later period. The poor antioxidant defenses of the premature infant and their reduced ability to synthesize long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) have been implicated in the pathogenesis of ROP^{17,18}. Inositol is an essential nutrient for the growth and survival of human cells and its administration to preterm infants resulted in a lower incidence of ROP¹⁹; additionally, the chances of developing severe ROP are higher among children with a low serum inositol concentration²⁰. Human milk contains LCPUFAs and antioxidant enzymes, including inositol^{21,22}.

As positive points of our study, we can mention that we tried to overcome methodological problems of previous studies by using a design specifically aimed at identifying the amount of BM needed for the prevention of ROP in newborns at risk for the disease. We should also highlight the successful follow-up, given that only 19 of 342 patients (5.5%) were lost because they did not return to the outpatient clinic to complete the ophthalmic assessment.

Our study was limited by the small amount of BM that newborns at risk for ROP received in this population. This serves as a warning for the need to strengthen the incentives for milking by mothers of preterms. Regardless of the protection against ROP, feeding premature infants with human milk is known to reduce the risk of different negative outcomes of prematurity, such as late-onset sepsis and NEC, and also reduces the length of hospitalization at the NICU²³.

We can conclude that BM in a small amount is not enough to prevent ROP. Further studies will need to include newborns who receive a higher BM supply to attempt to find a possible cut-off point, that is, a minimal amount of BM from which a protective effect against ROP can be demonstrated. Analyses per periods would also be interesting, with special attention to a later time, such as the 5th to the 8th week of life,

since our study, despite its limitations, was able to demonstrate a significant protective effect of BM against ROP when the amount of BM received at the 6th week of life was analyzed.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Vania Naomi Hirakata for her help in the statistical analysis.

REFERENCES

1. QUINN, G.E.; GILBERT, C.; DARLOW, B.A.; ZIN, A. Retinopathy of prematurity: an epidemic in the making. **Chin Med J**, vol. 123, n.20, p. 2929-37, 2010.
2. FIELDER, A.R.; REYNOLDS, J.D. Retinopathy of prematurity: clinical aspects. **Semin Neonatol**, vol. 6, n. 6, p. 461-75, 2001.
3. WHEATLEY, C.M.; DICKINSON, J.L.; MACKEY, D.A.; CRAIG, J.E.; SALE, M.M. Retinopathy of prematurity: recent advances in our understanding. **Br J Ophthalmol**, vol. 86, n. 6, p. 696-700, 2002.
4. CAMPBELL, K. Intensive oxygen therapy as a possible cause of retrolental fibroplasia: a clinical approach. **Med J Australia**, n. 2, p.48-50, 1951.
5. PATZ, A.; HOECK, L.E.; DE LA CRUZ. Studies on the effect of high oxygen administration in retrolental fibroplasia: I. Nursery observations. **Am J Ophthalmol**, n. 35, p.1248-53, 1952.
6. PATZ, A. The role of oxygen in retrolental fibroplasia. **Albrecht Von Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol**, n. 195, p.77-85, 1975.
7. HELLSTROM, A.; PERRUZZI, C.; JU, M.; ENGSTROM, E.; HARD, A.L.; LIU, J.L.; et al. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 98, p. 5804-8, 2001.
8. OZGURTAS, T.; AYDIN, I.; TURAN, O.; KOC, E.; HIRFANOGLU, I.M.; ACIKEL, C.H.; et al. Vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor levels in human milk of mothers with term and preterm neonates. **Cytokine**, vol. 50, n. 2, p. 192-4, 2010.

9. HELLER, C.D.; O'SHEA, M.; YAO, Q.; LANGER, J.; EHRENKRANZ, R.A.; PHELPS, D.L.; et al. Human milk intake and retinopathy of prematurity in extremely low birth weight infants. **Pediatrics**, vol. 120, n. 1, p. 1-9, 2007.
10. HYLANDER, M.A.; STROBINO, D.M.; PEZZULLO, J.C.; DHANIREDDY, R. Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birth weight infants. **J Perinatol**, vol. 21, n. 6, p. 356-62, 2001.
11. KAO, J.S.; DAWSON, J.D.; MURRAY, J.C.; DAGLE, J.M.; BERENDS, S.K.; GILLEN, S.B.; et al. Possible roles of bilirubin and breast milk in protection against retinopathy of prematurity. **Acta Paediatr**, vol. 100, n. 3, p. 347-51, 2011.
12. MANZONI, P.; STOLFI, I.; PEDICINO, R.; VAGNARELLI, F.; MOSCA, F.; PUGNI, L.; et al; Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections, Italian Society of Neonatology. Human milk feeding prevents retinopathy of prematurity (ROP) in preterm VLBW neonates. **Early Hum Dev**, vol. 89, n.1, p. 64-8, 2013.
13. GOELZ, R.; HIHN, E.; Hamprecht K, Dietz K, Jahn G, Poets C, et al. Effects of different CMV-heat-inactivation-methods on growth factors in human breast milk. **Pediatr Res**, vol. 65, n. 4, p. 458-61, 2009.
14. SPIEGLER, J.; PREUß, M.; GEBAUER, C.; BENDIKS, M.; HERTING, E.; GÖPEL, W.; German Neonatal Network GNN. Does Breastmilk Influence the Development of Bronchopulmonary Dysplasia? **J Pediatr**, n. 169, p. 76-80, 2016.
15. ZHOU, J.; SHUKLA, V.V.; JOHN, D.; CHEN, C. Human Milk Feeding as a Protective Factor for Retinopathy of Prematurity: A Meta-analysis. **Pediatrics** vol. 136, n. 6, p. 1576-86, 2015.

16. OKAMOTO, T.; SHIRAI, M.; KOKUBO, M.; TAKAHASHI, S.; KAJINO, M.; TAKASE, M. et al. Human milk reduces the risk of retinal detachment in extremely low-birth weight infants. **Pediatr Int**, vol. 49, n. 6, p. 894-7, 2007.
17. ASIKAINEN, T.M.; WHITE, C.W. Pulmonary antioxidant defenses in the preterm newborn with respiratory distress and bronchopulmonary dysplasia in evolution: implications for antioxidant therapy. **Antioxid Redox Signal**, vol. 6, n. 1, p. 155-67, 2004.
18. CONNOR, W.E.; NEURINGER, M.; REISBICK, S. Essential fatty acids: the importance of n-3 fatty acids in the retina and brain. **Nutr Rev**, n. 50, p. 21-9, 1992.
19. HALLMAN, M.; BRY, K.; HOPPU, K. et al. Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, n. 326, p. 1233-9, 1992.
20. FRIEDMAN, C.A.; McVEY, J.; BORNE, M.J.; JAMES, M.; MAY, W.L.; TEMPLE, D.M. et al. Relationship between serum inositol concentration and development of retinopathy of prematurity: a prospective study. **J Pediatr Ophthalmol Strabismus**, vol. 37, n. 2, p. 79-86, 2000.
21. JENSEN, R.G. Lipids in human milk. **Lipids**, vol. 34, n.12, p. 1243-71, 1999.
22. FRIEL, J.K.; MARTIN, S.M.; LANGDON, M.; HERZBERG, G.R.; BUETTNER, G.R. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. **Pediatr Res**, n. 51, p. 612-8, 2002.
23. SCHANLER, R.J.; LAU, C.; HURST, N.M.; SMITH, E.O. Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. **Pediatrics**, vol. 116, n. 2, p. 400-6, 2005.

Table 1 – Comparison between patients included in the study and deaths before completing ophthalmologic evaluation

	Patients included 323 patients	Deaths 102 patients	P value
Prenatal care	295 (91.3%)	90 (88.5%)	0.496
Antenatal steroids	216 (66.9%)	43 (42.3%)	<0.001
Ovular infection	32 (10.0%)	23 (22.9%)	0.023
ROM > 18 hours	66 (20.4%)	16 (16.2%)	0.416
Preeclampsia	114 (35.3%)	25 (24.8%)	0.060
Male	162 (50.2%)	53 (52.4%)	0.776
5' Apgar score <7	53 (16.4%)	57 (56.3%)	<0.001
Birth weight	1200.8 ± 264.3	785.1 ± 206.0	<0.001
Gestational age	30.1 ± 2.3	26.1 ± 2.8	<0.001
SNAPPE II	15 (8-29)	53 (40-70.5)	<0.001

Date expressed as mean ± standard deviation, median and interquartile range, or in proportion (%) when applicable. ROM, rupture of membranes.

Table 2 – Association between the variables studied and ROP in the univariate analysis

	Newborns without ROP 223 patients (69%)	Newborns with ROP 100 patients (31%)	P value
Prenatal	206 (92.4%)	89 (89%)	0.425
Antenatal corticosteroids	152 (68.2%)	64 (64%)	0.544
Ovular infection	25 (11.2%)	17 (17%)	0.253
Preeclampsia	84 (37.7%)	30 (30%)	0.262
Vaginal delivery	74 (33.2%)	37 (37%)	0.581
Male gender	107 (48%)	55 (55%)	0.332
Small for gestational age	103 (46.2%)	34 (34%)	0.085
Transfer	17 (7.6%)	8 (8%)	0.923
Twinning	48 (21.5%)	15 (15%)	0.240
5 th -minute Apgar <7	23 (10.5%)	29 (29%)	<0.001
RDS	99 (44.4%)	86 (86%)	<0.001
Early-onset sepsis	4 (1.8%)	1 (1%)	0.635
Late-onset sepsis	57 (25.6%)	57 (57%)	<0.001
Fungal sepsis	6 (2.7%)	12 (12%)	0.002
Use of dopamine	49 (22%)	44 (44%)	<0.001
Hyperglycemia	19 (8.5%)	17 (17%)	0.034
NEC	19 (8.5%)	19 (19%)	0.009
BPD	37 (16.6%)	57 (57%)	<0.001
IVH III / IV	5 (2.2%)	17 (17%)	<0.001
PDA	31 (13.9%)	47 (47%)	<0.001
Birth weight	1272 ± 237	1041 ± 253	<0.001
Gestational age	30.8 ± 2	28.6 ± 2.2	<0.001
SNAPPE II	13 (5-23)	25 (13-47.5)	<0.001
No. of RCC transfusions	1 (0-2)	5 (2-9)	<0.001
MV duration	0 (0-3)	9.5 (1-38.5)	<0.001
Nasal CPAP duration	3 (1-8)	8.5 (3-15)	<0.001
Supplemental O ₂ days	5 (1-16)	35 (11-65.5)	<0.001
Parenteral Nutrition time	3 (2-6)	6 (3.5-10)	<0.001
Enteral feeding start	4.7 (2-6)	6 (3.5-10)	<0.001
Full enteral feeding	16 (2-24)	28.5 (17-40)	<0.001
Length of hospital stay	48 ± 20	80 ± 39	<0.001
BM 42 days	10.2 (1.5-25.5)	4.9 (0.3-15.4)	0.005
BM week 1	0.43 (0-4.3)	0 (0-1.1)	0.003
BM week 2	7 (0-22.6)	1.4 (0-10.5)	0.003
BM week 3	5.9 (0-23)	2.2 (0-16.7)	0.034
BM week 4	7.9 (0-27.6)	1.4 (0-14.5)	0.015
BM week 5	6.9 (0-34.1)	1.3 (0-14.3)	0.003
BM week 6	4 (0-37)	0 (0-15)	0.016

Data expressed as mean ± standard deviation, median and interquartile range or as a rate (%) when applicable. ROP, retinopathy of prematurity; RDS, respiratory distress syndrome; NEC, necrotizing enterocolitis; BPD, Bronchopulmonary dysplasia; IVH III / IV, Grade III or IV intraventricular hemorrhage; PDA, Patent ductus arteriosus; SNAPPE II, Score for neonatal acute physiology perinatal extension II; RCC, red cell concentrates; MV, mechanical ventilation; CPAP, continuous positive airway pressure; O₂, oxygen; BM, breast milk.

Table 3 – Variables significantly associated with ROP in the multivariate analysis

	Relative risk	95% CI	P value
Fungal sepsis	1.47	1.06-2.03	0.021
PDA	1.58	1.18-2.12	0.002
Gestational age	0.87	0.80-0.95	0.002
BM week 6	0.99	0.98-1.00	0.041

Also participated in the multivariate analysis, but did not maintain statistical significance: late-onset sepsis, NEC, BPD, IVH III/IV, SNAPPE II and MV time. ROP, retinopathy of prematurity; CI, confidence interval; PDA, Patent ductus arteriosus; BM, breast milk; NEC, necrotizing enterocolitis; BPD, Bronchopulmonary dysplasia; IVH III / IV, Grade III or IV intraventricular hemorrhage; SNAPPE II, Score for neonatal acute physiology perinatal extension II; MV, mechanical ventilation.

Table 4 – Association between the variables studied and severe ROP in the univariate analysis

	Newborns without severe ROP 294 patients (91%)	Newborns with severe ROP 29 patients (9%)	P value
Prenatal	288 (91.8%)	25 (86.2%)	0.298
Ovular infection	37 (12.6%)	5 (17.2%)	0.560
Antenatal corticosteroids	202 (68.7%)	14 (48.2%)	0.029
Preeclampsia	109 (37%)	5 (17.2%)	0.044
Vaginal delivery	97 (33%)	14 (48.2%)	0.105
Male gender	146 (49.7%)	16 (55.2%)	0.571
Small for gestational age	127 (43.2%)	10 (34.5%)	0.433
Transfer	22 (7.5%)	3 (10.3%)	0.480
Twinning	59 (20.1%)	4 (13.8%)	0.623
5th-minute Apgar <7	40 (13.8%)	12 (42.9%)	<0.001
RDS	157 (53.4%)	28 (96.6%)	0.003
Early-onset sepsis	5 (1.7%)	0 (0%)	1.000
Late-onset sepsis	97 (33%)	17 (58.6%)	0.008
Fungal sepsis	11 (3.7%)	7 (24.1%)	<0.001
Use of dopamine	76 (25.9%)	17 (58.6%)	<0.001
Hyperglycemia	29 (9.9%)	7 (24.1%)	0.019
NEC	28 (9.5%)	10 (34.5%)	<0.001
BPD	69 (23.5%)	25 (86.2%)	<0.001
IVH III / IV	14 (4.8%)	8 (27.6%)	<0.001
PDA	62 (21.1%)	16 (55.2%)	<0.001
Birth weight	1230 ± 250	901 ± 211	<0.001
Gestational age	30.4 ± 2.2	27.5.6 ± 2.1	<0.001
SNAPPE II	15 (8-15)	39 (16.5-52.5)	<0.001
No. of RCC Transfusions	1 (0-3.3)	10 (5.5-16.5)	<0.001
MV duration	0 (0-7)	49 (15.5-62.5)	<0.001
Nasal CPAP duration	3 (1-10)	9 (5-15)	0.028
Supplemental O ₂ days	7 (2-26.3)	68 (44-91)	<0.001
Parenteral Nutrition time	16 (10.8-23.6)	35 (20-60)	<0.001
Enteral feeding start	4 (2-7)	6 (4-12)	0.006
Full enteral feeding	17 (13-28)	34 (22-53.5)	0.020
Length of hospital stay	53 ± 23.6	106.8 ± 53.2	<0.001
BM 42 days	8.4 (1.3-23.1)	2.4 (0.12-12.6)	0.034
BM week 1	0 (0-3.6)	0 (0-1.3)	0.044
BM week 2	5.6 (0-21.3)	0 (0-7.1)	0.087
BM week 3	4.8 (0-21.2)	1.1 (0-15.7)	0.085
BM week 4	6.6 (0-25)	0 (0-6.6)	0.048
BM week 5	6 (0-28)	0 (0-10.9)	0.030
BM week 6	3.6 (0-30)	0 (0-4.2)	0.042

Data expressed as mean ± standard deviation, median and interquartile range or as a rate (%) when applicable. ROP, retinopathy of prematurity; RDS, respiratory distress syndrome; NEC, necrotizing enterocolitis; BPD, Bronchopulmonary dysplasia; IVH III / IV, Grade III or IV intraventricular hemorrhage; PDA, Patent ductus arteriosus; SNAPPE II, Score for neonatal acute physiology perinatal extension II; RCC, red cell concentrates; MV, mechanical ventilation; CPAP, continuous positive airway pressure; O₂, oxygen; BM, breast milk.

Table 5 – Risk factors significantly associated with severe ROP in the multivariate analysis

	Relative risk	95% CI	P value
Fungal sepsis	3.64	1.57-8.41	0.003
BPD	4.2	1.28-13.82	0.018
MV duration	1.01	1.01-1.02	<0.001

Also participated in the multivariate analysis, but did not maintain statistical significance: late-onset sepsis, NEC, PDA, IVH III/IV, SNAPPE II, gestational age and amount of BM received in the first 42 days of life. ROP, retinopathy of prematurity; CI, confidence interval; BPD, Bronchopulmonary dysplasia; MV, mechanical ventilation; NEC, necrotizing enterocolitis; PDA, Patent ductus arteriosus; IVH III / IV, Grade III or IV intraventricular hemorrhage; SNAPPE II, Score for neonatal acute physiology perinatal extension II; BM, breast milk.

10- ARTIGO 2

Sepse Fúngica como Fator de Risco Independente para Retinopatia da Prematuridade

Luciana T Fonseca, MD (1) (2)

Denise C Senna, MD (1)

Gabriela U Eckert, MD, PhD (3)

Rita C Silveira, MD, PhD (2) (3)

Renato S Procianoy, MD, PhD (2) (3)

(1) Hospital da Criança Conceição (HCC)

(2) Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

(3) Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Departamento de Pediatria, Serviço de Neonatologia, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Hospital da Criança Conceição, Porto Alegre, RS, Brasil.

Palavras chave: Retinopatia da Prematuridade (ROP); Sepse Fúngica; Candidemia; Recém-nascido de muito baixo peso; Prematuridade.

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

RESUMO

Introdução: A retinopatia da prematuridade (ROP) é uma doença de etiologia multifatorial secundária à vascularização inadequada da retina dos recém-nascidos (RNs) prematuros (PMTs). É uma das principais causas de cegueira e morbidade visual na infância. Diversos fatores de risco foram associados ao seu desenvolvimento, dentre eles a sepse fúngica (SF). No entanto, nem todos os estudos que avaliaram SF como fator de risco independente para ROP encontraram associação significativa.

Objetivo: Avaliar o papel da SF como fator de risco independente para ROP em qualquer grau e ROP grave em RNs de risco para ROP.

Pacientes e métodos: Estudo de coorte observacional incluindo RNs com peso de nascimento (PN) inferior a 1500 gramas e / ou com idade gestacional (IG) inferior a 32 semanas, nascidos no período de janeiro de 2011 a outubro de 2014 e internados nas primeiras 24 horas de vida na UTI Neonatal do Hospital da Criança Conceição (HCC) em Porto Alegre.

Resultados: A prevalência da ROP em qualquer grau foi de 31% (100 casos em 323 pacientes) e a de ROP grave foi de 9% (29 casos em 323 pacientes). A incidência de SF confirmada por hemocultura foi de 5,6% (18 casos em 323 pacientes). Dentre os pacientes que não desenvolveram ROP, 2,7% haviam apresentado SF durante a internação na UTI Neonatal. Dentre os pacientes que desenvolveram ROP, 12% haviam apresentado candidemia ($p=0,002$). Quando avaliados os pacientes quanto à ROP grave, a incidência de SF entre os RNs que não desenvolveram a doença foi de 3,7%, comparada a 24,1% entre aqueles com ROP grave ($p<0,001$). A significância estatística se manteve após análise multivariada para controle de fatores confundidores nas duas avaliações (ROP em qualquer grau e ROP grave).

Conclusão: A SF parece ser um fator de risco independente para o desenvolvimento de ROP em qualquer grau e de ROP grave em PMTs de risco para a doença.

Palavras-chave: Retinopatia da prematuridade, sepse fúngica, candidemia.

INTRODUÇÃO

A retinopatia da prematuridade (ROP) é uma doença ocular vasoproliferativa secundária à vascularização incompleta da retina dos recém-nascidos (RNs) prematuros (PMTs), cujo curso natural pode levar à cegueira¹. O comprometimento irreversível da visão pode prejudicar o desenvolvimento cognitivo e psicomotor das crianças afetadas². Baixo peso ao nascimento (PN), idade gestacional (IG) precoce e uso de oxigênio são os principais fatores de risco para ROP³⁻⁵.

A sepse fúngica (SF) está associada à significativa morbidade e mortalidade. Sua incidência varia amplamente entre os centros, provavelmente devido a diferenças nas práticas relacionadas com fatores de risco modificáveis, como a exposição a antibióticos empíricos e a duração da nutrição parenteral⁶. *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* são as espécies de fungo predominantemente isoladas em hemoculturas na maioria das UTIs neonatais⁷. A candidíase invasiva é uma causa emergente de sepse neonatal e é uma das principais causas de sepse tardia em RNs de muito baixo peso (RNMBP, PN<1500g)⁸⁻⁹. A candidíase invasiva em RNs de extremo baixo peso (RNEBP, PN<1000g) está associada a uma mortalidade de 30% e a comprometimento do desenvolvimento neurológico em mais de metade dos sobreviventes⁹. Os principais fatores de risco são o uso de múltiplos esquemas antibióticos, cateter venoso central, nutrição parenteral, imunodepressão, muito baixo peso ao nascer, e colonização fúngica¹⁰.

Muitos estudos demonstraram associação entre SF e o desenvolvimento de ROP¹¹⁻¹⁴ e uma metanálise realizada por Bharwani e Dhanireddy indicou que a SF invasiva está significativamente associada ao risco de desenvolver ROP grave e ROP

em qualquer grau em RNMBP¹⁵. Entretanto, nem todos os estudos que avaliaram SF como fator de risco independente para ROP encontraram associação significativa.

Manzoni e cols. encontraram associação significativa entre SF e ROP apenas em RNEBP, e apenas com ROP doença limiar¹⁶. Karlowicz e cols. concluíram em um estudo que candidemia pode não ser um fator de risco independente para ROP em RNEBP e que a associação clinicamente observada pode ser mediada pela idade IG¹⁷.

Este estudo teve como objetivo avaliar o papel da SF como fator de risco independente para ROP em qualquer grau e ROP grave em RNs de risco para a doença.

PACIENTES E MÉTODOS

A população da pesquisa foi constituída por RNs com PN inferior a 1500g e / ou com IG inferior a 32 semanas, internados na UTI Neonatal do HCC no período de janeiro de 2011 a outubro de 2014. Foram excluídos os pacientes transferidos de outros hospitais que chegaram ao HCC com mais de 24 horas de vida, pacientes com malformações congênitas maiores e pacientes que evoluíram ao óbito antes de completar a avaliação oftalmológica.

Esta é uma análise secundária de um estudo de coorte observacional, com dados retrospectivos e prospectivos, originalmente delineado para avaliar o efeito protetor do leite materno contra ROP. Os dados retrospectivos foram pesquisados nos prontuários no Serviço de Arquivo Médico e Estatística. A parte prospectiva da pesquisa foi realizada através do acompanhamento dos pacientes durante sua internação na UTI Neonatal, na Unidade de Cuidados Intermediários e, após a alta, no ambulatório de Oftalmologia.

As variáveis avaliadas foram as seguintes: 1- Dados maternos e do parto: Pré-natal, uso de corticoide (CTC) antenatal, infecção ovular, tempo de bolsa rota superior a 18 horas, pré-eclâmpsia e via de parto. 2- Dados do RN: Sexo, PN, IG (definida por ecografia quando havia US obstétrica realizada até 12 semanas de IG ou por Ballard na ausência de ecografia precoce), classificação do peso para a IG (pequeno, adequado ou grande para a IG), Apgar no 5º minuto, SNAPPE 2 (escore de gravidade), transferência de outro hospital e gemelaridade. 3- Dados da evolução do RN na UTI: Síndrome do desconforto respiratório (SDR), sepse tardia, sepse fúngica (confirmadas por hemocultura- hmc), uso de dopamina, hiperglicemia, enterocolite necrotizante (ECN), displasia broncopulmonar (DBP), hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV (HPIV III / IV), tempo de ventilação mecânica (VM), tempo de uso de CPAP nasal, tempo total de uso de oxigênio (O₂), persistência do canal arterial (PCA), número de transfusões de concentrado de hemácias (CHAD), tempo de uso de nutrição parenteral (NPT), idade de início da alimentação enteral, idade que atingiu dieta enteral plena, e tempo de internação. 4- Dados da alimentação: A quantidade de leite materno recebida foi verificada diariamente, em mL/kg/dia, desde o nascimento dos RNs até que completassem 6 semanas de vida ou recebessem alta hospitalar. 5- Dados da avaliação oftalmológica: Desenvolvimento e gravidade da ROP e necessidade de tratamento cirúrgico para ROP por fotocoagulação a laser. O estadiamento da doença foi realizado de acordo com a Classificação Internacional da ROP (*International Committee for the Classification of ROP*, 2005). Os exames de mapeamento de retina fazem parte da rotina assistencial do Serviço de Neonatologia do HCC e foram realizados pela mesma médica oftalmologista capacitada. O acompanhamento oftalmológico era iniciado durante a internação hospitalar e mantido via ambulatorial após a alta. O seguimento foi considerado completo quando

os pacientes foram acompanhados até 40 semanas de IG corrigida ou até apresentarem retinas totalmente vascularizadas ou com mínima área avascular.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e da UFRGS e foi aplicado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos pais dos pacientes da parte prospectiva da pesquisa.

Análise estatística:

O tamanho da amostra calculado foi de 288 pacientes. O cálculo foi baseado em uma incidência de ROP de 55% e de SF de 15%, conforme o estudo de Bharwani e Dhanireddy que demonstrou um aumento da incidência de ROP pela SF de 30%, com poder de 80% e nível de significância estatística de 0,05¹⁵.

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão (distribuição simétrica) ou mediana e amplitude interquartil (distribuição assimétrica). As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas.

Para comparar as variáveis quantitativas foi aplicado o teste t de Student (distribuição simétrica) ou o teste U de Mann-Whitney (distribuição assimétrica). Para avaliar a associação entre as variáveis qualitativas, foram empregados os testes qui-quadrado e exato de Fisher.

Foi realizada uma análise multivariada através de regressão de Poisson com ajuste para variâncias robustas para a determinação das razões de prevalências ajustadas para os principais fatores envolvidos. Alguns fatores significativos na análise univariada foram excluídos da análise multivariada devido a multicolinearidade.

Inicialmente os pacientes foram divididos em dois grupos: com ROP (qualquer grau) e sem ROP. Posteriormente efetuou-se uma nova divisão de grupos: com ROP

grave (ROP grau ≥ 3) e sem ROP ou com ROP leve (grau ≤ 2) e todas as análises foram repetidas.

O nível de significância estatística adotado foi $p < 0,05$ e as análises foram realizadas no programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versão 18.0.

RESULTADOS

No período do estudo, 456 RNs com PN < 1500g e / ou IG < 32 semanas foram internados na UTI Neonatal do HCC nas primeiras 24h de vida. Destes, 12 pacientes foram excluídos por malformações congênitas maiores e 102 por óbito antes de completar avaliação oftalmológica. Um total de 342 pacientes foi inicialmente incluído no estudo. Dezenove pacientes foram perdidos por não terem completado a avaliação oftalmológica (não compareceram nas consultas de acompanhamento ambulatorial). Participaram da análise final 323 pacientes.

A incidência da ROP em qualquer grau foi de 31% (100 casos) e a de ROP grave foi de 9% (29 casos). A incidência de SF confirmada por hemocultura foi de 5,6% (18 casos em 323 pacientes). Nenhum paciente apresentou sinais de endoftalmite por *Candida*. Dos 18 casos de fungemia, ocorreram 9 casos de *Candida albicans* (50%), 7 casos de *Candida parapsilosis* (38,9%) e 2 casos de *Candida sp* (11%).

Na análise inicial (pacientes com ROP em qualquer grau *versus* sem ROP), os dois grupos foram similares quanto à presença de pré-natal, uso de CTC antenatal, infecção ovular, tempo de bolsa rota superior a 18 horas e pré-eclâmpsia. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao sexo, classificação do peso para a IG, transferência de outro hospital, gemelaridade e incidência de

sepsis precoce. A presença de ROP teve associação estatisticamente significativa na análise univariada com diversos fatores estudados, dentre eles a SF (tabela 1). Dentre os pacientes que não desenvolveram ROP, 2,7% haviam apresentado SF durante a internação na UTI Neonatal. Dentre os pacientes que desenvolveram ROP, 12% haviam apresentado candidemia ($p=0,002$). Após análise multivariada, a SF manteve-se significativamente associada ao desenvolvimento de ROP (tabela 2).

Em uma segunda análise, quanto à presença de ROP grave, os dois grupos foram similares quanto à presença de pré-natal, infecção ovular e tempo de bolsa rota superior a 18 horas. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao sexo, classificação do peso para a IG, transferência de outro hospital, gemelaridade e incidência de sepsis precoce (tabela 3). A incidência de SF entre os RNs que não desenvolveram ROP grave foi de 3,7%, comparada a 24,1% entre aqueles com a doença ($P<0,001$). A significância estatística se manteve após análise multivariada para controle de fatores confundidores (tabela 4).

DISCUSSÃO

Em nosso estudo demonstramos que a ocorrência de sepsis fúngica confirmada por hemocultura está associada a um aumento do risco de desenvolvimento de ROP em qualquer grau e de ROP grave em RNs com PN inferior a 1500g e / ou com IG inferior a 32 semanas e esta associação permaneceu significativa após ajuste para fatores de confusão.

Embora nossa metodologia não permita estabelecer uma relação de causa e efeito, algumas hipóteses explicam a associação entre a SF e o desenvolvimento de

ROP. Em um modelo animal com ratos, foi demonstrado que a candidíase sistêmica induziu neovascularização renal e cerebral¹⁸. A infecção sistêmica por *Candida* pode lesar os vasos sanguíneos retinianos em desenvolvimento, o que estimula citocinas pró-inflamatórias, tornando-os mais vulneráveis a desenvolver ROP¹¹. Não se sabe se a candidemia modula a expressão de fatores angiogênicos conhecidos, como o fator de crescimento endotelial vascular, implicado na patogênese da ROP¹⁹⁻²⁰, mas a capacidade da *Candida albicans* em induzir fagocitose, causar dano das células endoteliais e liberação de citocinas e prostanóides por estas células é bem documentada²¹⁻²³.

As incidências de ROP em qualquer grau e de ROP grave na nossa amostra (31% e 9%, respectivamente) foram bastante semelhantes às encontradas por Manzoni e cols. (31,9% e 12,9%)¹⁶. Nossos achados também estão de acordo com a metanálise de Bharwani e Dhanireddy, que indicou que a SF invasiva está significativamente associada ao risco de desenvolver ROP grave e ROP em qualquer grau em RNMBP¹⁵.

Diferentemente de Manzoni e cols.¹⁶, a associação entre SF e ROP não se limitou a RNEBP no nosso estudo, nem à ROP doença limiar. Outra diferença, é que a incidência de SF nesse estudo foi bastante superior à nossa: 11,6% x 5,6%. Essas divergências podem dever-se aos critérios para diagnóstico de SF. Consideramos SF apenas os casos confirmados por hemocultura, enquanto Manzoni e cols. definiram SF invasiva quando alguma espécie de fungo era isolada em hemocultura, urina colhida por punção supra púbica estéril ou cateterismo vesical estéril com crescimento demais de 10000 organismos/mL, líquido cefalorraquidiano ou ponta de cateter intravascular (neste último caso limitado a pacientes com colonização periférica prévia pelas mesmas espécies). Nosso estudo também diverge de Karlowicz e cols., em que a associação entre SF e ROP não manteve significância estatística após ajuste para idade gestacional¹⁷. Este grupo, assim como nós, definiu SF quando houve crescimento de alguma espécie de

Candida em ao menos uma hemocultura, entretanto, a população avaliada por eles era diferente (apenas RNEBP), e o desfecho também (apenas ROP doença limiar).

Dentre os pontos positivos, podemos citar o sucesso do seguimento, já que apenas 19 de 342 pacientes (5,5%) foram perdidos por não retornarem ao ambulatório para completar avaliação oftalmológica. Esta é uma limitação de muitos estudos prévios sobre o assunto, que excluíram os pacientes sem avaliação oftalmológica.

Um ponto fraco do nosso estudo é tratar-se de uma análise secundária, já que o objetivo principal era avaliar o efeito do leite materno na prevenção da ROP. Apesar da SF não ter sido o principal fator de estudo, esta análise estava prevista desde o projeto inicial e todos os paciente incluídos no estudo tiveram suas hemoculturas revisadas quanto à presença de bactérias ou fungos.

Estudos futuros, possivelmente em modelos animais, devem elucidar se a associação entre SF e ROP é, ou não, causal. Se uma relação de causa e efeito for comprovada, estratégias para redução de SF como uso criterioso e pelo menor tempo possível de antibióticos de amplo espectro, cateteres venosos centrais e nutrição parenteral, podem impactar também na incidência de ROP. Outro aspecto a ser avaliado é se o uso de antifúngico profilático, que já demonstrou ser seguro e eficaz na prevenção de SF invasiva em prematuros²⁴, poderia ter impacto também na redução de ROP. A triagem para ROP deve ser realizada ainda mais de perto em pacientes com fungemia.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Vania Naomi Hirakata pelo auxílio na análise estatística.

REFERÊNCIAS

1. FIELDER, A.R.; REYNOLDS, J.D. Retinopathy of prematurity: clinical aspects. **Semin Neonatol**, vol. 6, n. 6, p. 461-75, 2001.
2. WHEATLEY, C.M.; DICKINSON, J.L.; MACKEY, D.A.; CRAIG, J.E.; SALE, M.M. Retinopathy of prematurity: recent advances in our understanding. **Br J Ophthalmol**, vol. 86, n. 6, p. 696-700, 2002.
3. CHEN, M.; CITIL, A; McCABE, F.; LEICHT, K.M.; FIASCONE, J.; DAMMANN, C.E., et al. Infection, oxygen, and immaturity: interacting risk factors for retinopathy of prematurity. **Neonatology**, n. 99, p. 125-32, 2011.
4. RAGHUVVEER, T.S.; BLOOM, B.T. A paradigm shift in the prevention of retinopathy of prematurity. **Neonatology**, n. 100, p. 116-29, 2011.
5. DARLOW, B.A.; HUTCHINSON, J.L.; HENDERSON-SMART, D.J.; DONOGHUE, D.A.; SIMPSON, J.M.; EVANS, N.J. Prenatal risk factors for severe retinopathy of prematurity among very preterm infants of the Australian and New Zealand Neonatal Network. **Pediatrics**, n. 115, p. 990-6, 2005.
6. GREENBERG, R.G.; BENJAMIN Jr, D.K. Neonatal candidiasis: diagnosis, prevention, and treatment. **J Infect**, vol. 69, n. 1, p. 19-22, 2014.
7. BALLOT, D.E.; BOSMAN, N.; NANA, T.; RAMDIN, T.; COOPER, P.A. Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country. **J Trop Pediatr**, vol. 59, n. 6, p. 460-4, 2013.
8. SHANE, A.L.; STOLL, B.J. Recent developments and current issues in the epidemiology, diagnosis, and management of bacterial and fungal neonatal sepsis. **Am J Perinatol**, vol. 30, n. 2, p. 131-41, 2013.
9. HUNDALANI, S.; PAMMI, M. Invasive fungal infections in newborns and current management strategies. **Expert Rev Anti Infect Ther**, vol. 11, n. 7, p.
10. TEZER, H.; CANPOLAT, F.E.; DILMEN, U. Invasive fungal infections

during the neonatal period: diagnosis, treatment and prophylaxis. **Expert Opin Pharmacother**, vol. 13, n. 2, p. 193-205, 2012.

11. MITTAL, M.; DHANIREDDY, R.; HIGGINS, R.D. Candida sepsis and association with retinopathy of prematurity. **Pediatrics**, n. 101, p. 654-7, 1998.
12. NOYOLA, D.E.; BOHRA, L.; PAYSSE, E.A.; FERNANDEZ, M.; COATS, D.K. Association of candidemia and retinopathy of prematurity in very low birthweight infants. **Ophthalmology**, vol. 109, n. 1, p. 80-4, 2002.
13. SANCHEZ, V.; del MORAL, T.; CLAURE, N.; VANBUSKIRK, S.; FLYNN, J.; BANCALARI, E. Sepsis as a risk factor for the development of retinopathy of prematurity in extremely low birth weight infants. **Pediatr Res**, n. 51, p. 367, 2002.
14. HAROON Parupia MF, DHANIREDDY, R. Association of postnatal dexamethasone use and fungal sepsis in the development of severe retinopathy of prematurity and progression to laser therapy in extremely low-birth-weight infants. **J Perinatol**, vol. 21, n. 4, p. 242-7, 2001.
15. BHARWANI, S.K.; DHANIREDDY, R. Systemic fungal infection is associated with the development of retinopathy of prematurity in very low birth weight infants: a meta-review. **J Perinatol**, vol. 28, n. 1, p. 61-6, 2007.
16. MANZONI, P.; MAESTRI, A.; LEONESSA, M.; MOSTERT, M.; FARINA, D.; GOMIRATO, G. Fungal and bacterial sepsis and threshold ROP in preterm very low birth weight neonates. **J Perinatol**, n. 26, p. 23-30, 2006.
17. KARLOWICZ, G.M.; GIANNONE, P.J.; PESTIAN, J.; MORROW, A.L.; SHULTS, J. Does candidemia predict threshold retinopathy of prematurity in extremely low birth weight (≤ 1000 g) neonates? **Pediatrics**, n. 105, p. 1036-40, 2000.
18. ASHMAN, R.B.; PAPADIMITRIOU, J.M. Endothelial cell proliferation associated with lesions of murine systemic candidiasis. **Infect Immunol**, n. 62, p. 5151-3, 1994.

19. PIERCE, E.A.; AVERY, R.L.; FOLEY, E.D.; AIELLO, L.P.; SMITH, L.E.H.
Vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 92, p. 905-9, 1995.
20. STONE, J.; CHAN-LING, T.; PE'ER, J.; ITIN, A.; GNESSIN, H.; KESHET, E.
Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, vol. 37, n.2, p. 290-2, 1996.
21. FILLER, S. G.; PFUNDER, A.S.; SPELLBERG, B.J.; SPELLBERG, J.P.; EDWARDS Jr, J.E.
Candida albicans stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. **Infect Immunol**, n. 64, p. 2609-17, 1996.
22. FILLER, S.G.; SWERDLOFF, J.N.; HOBBS, C.; LUCKETT, P.M.
Penetration and damage of endothelial cells by Candida albicans. **Infect Immunol**, n. 63, p. 976-83, 1995.
23. FILLER, S.G.; IBE, B.O.; LUCKETT, P.M.; RAJ, J.U.; EDWARDS Jr, J.E.
Candida albicans stimulates endothelial cell eicosanoid production. **J Infect Dis**, n. 164, p. 928-35, 1991.
24. ERICSON, J.E.; BENJAMIN, D.K.
Fluconazole prophylaxis for prevention of invasive candidiasis in infants. **Curr Opin Pediatr**, vol. 26, n. 2, p. 151-6, 2014.

Tabela 1 – Fatores significativamente associados à ROP na análise univariada

	RNs sem ROP 223 pacientes (69%)	RNs com ROP 100 pacientes (31%)	Valor de p
Apgar 5' <7	23 (10,5%)	29 (29%)	<0,001
SDR	99 (44,4%)	86 (86%)	<0,001
Sepse tardia (hmc+)	57 (25,6%)	57 (57%)	<0,001
Sepse fúngica (hmc+)	6 (2,7%)	12 (12%)	0,002
Uso dopamina	49 (22%)	44 (44%)	<0,001
Hiperglicemia	19 (8,5%)	17 (17%)	0,034
ECN	19 (8,5%)	19 (19%)	0,009
DBP	37 (16,6%)	57 (57%)	<0,001
HPIV III / IV	5 (2,2%)	17 (17%)	<0,001
PCA	31 (13,9%)	47 (47%)	<0,001
Peso de nascimento	1272 ± 237	1041 ± 253	<0,001
Idade gestacional	30,8 ± 2	28,6 ± 2,2	<0,001
<i>SNAPPE II</i>	13 (5-23)	25 (13-47,5)	<0,001
Nº CHAD	1 (0-2)	5 (2-9)	<0,001
Tempo de VM	0 (0-3)	9,5 (1-38,5)	<0,001
Tempo de <i>CPAPn</i>	3 (1-8)	8,5 (3-15)	<0,001
Tempo de O ₂	5 (1-16)	35 (11-65,5)	<0,001
Tempo de NPT	3 (2-6)	6 (3,5-10)	<0,001
Início dieta enteral	4,7 (2-6)	6 (3,5-10)	<0,001
Enteral plena	16 (2-24)	28,5 (17-40)	<0,001
Tempo de internação	48 ± 20	80 ± 39	<0,001
LM 42 dias	10,2 (1,5-25,5)	4,9 (0,3-15,4)	0,005

Dados expressos em média ± desvio padrão, mediana e amplitude interquartil, ou em proporção (%) quando aplicável. ROP, retinopatia da prematuridade; RN, recém-nascido; SDR, síndrome do desconforto respiratório; hmc, hemocultura; ECN, enterocolite necrosante; DBP, displasia broncopulmonar; HPIV III/IV, hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV; PCA, persistência do canal arterial; *SNAPPE II*, *Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*; CHAD, concentrado de hemácias; VM, ventilação mecânica; *CPAPn*, *nasal continuous positive airway pressure*; O₂, oxigênio; NPT, nutrição parenteral total; LM, leite materno.

Tabela 2 – Fatores significativamente associados à ROP na análise multivariada

	Risco relativo	IC 95%	Valor de p
Sepse fúngica (hmc+)	1,47	1,06-2,03	0,021
PCA	1,58	1,18-2,12	0,002
Idade gestacional	0,87	0,80-0,95	0,002

Também participaram da análise multivariada mas não mantiveram significância estatística: sepse tardia, ECN, DBP, HPIV III ou IV, *SNAPPE II*, tempo de VM e quantidade de LM recebida nos primeiros 42 dias de vida. ROP, retinopatia da prematuridade; IC, intervalo de confiança; hmc, hemocultura; PCA, persistência do canal arterial; ECN, enterocolite necrosante; DBP, displasia broncopulmonar; HPIV III/IV, hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV; *SNAPPE II*, *Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*; VM, ventilação mecânica; LM, leite materno.

Tabela 3 – Fatores de risco significativamente associados à ROP grave na análise univariada

	RNs sem ROP grave 294 pacientes (91%)	RNs com ROP grave 29 pacientes (9%)	Valor de p
CTC pré-natal	202 (68,7%)	14 (48,2%)	0,029
Pré-eclâmpsia	19 (37%)	5 (17,2%)	0,044
Apgar 5' <7	41 (13,8%)	12 (42,9%)	<0,001
SDR	157 (53,4%)	28 (96,6%)	0,003
Sepse tardia (hmc+)	97 (33%)	17 (58,6%)	0,008
Sepse fúngica (hmc+)	11 (3,7%)	7 (24,1%)	<0,001
Uso dopamina	76 (25,9%)	17 (58,6%)	<0,001
Hiperglicemia	29 (9,9%)	7 (24,1%)	0,019
ECN	28 (9,5%)	10 (34,5%)	<0,001
DBP	69 (23,5%)	25 (86,2%)	<0,001
HPIV III / IV	14 (4,8%)	8 (27,6%)	<0,001
PCA	62 (21,1%)	16 (55,2%)	<0,001
Peso de nascimento	1230 ± 250	901 ± 211	<0,001
Idade gestacional	30,4 ± 2,2	27,5,6 ± 2,1	<0,001
<i>SNAPPE II</i>	15 (8-15)	39 (16,5-52,5)	<0,001
Nº CHAD	1 (0-3,3)	10 (5,5-16,5)	<0,001
Tempo de VM	0 (0-7)	49 (15,5-62,5)	<0,001
Tempo de <i>CPAPn</i>	3 (1-10)	9 (5-15)	0,028
Tempo de O ₂	7 (2-26,3)	68 (44-91)	<0,001
Tempo de NPT	16 (10,8-23,6)	35 (20-60)	<0,001
Início dieta enteral	4 (2-7)	6 (4-12)	0,006
Enteral plena	17 (13-28)	34 (22-53,5)	0,020
Tempo de internação	53 ± 23,6	106,8 ± 53,2	<0,001
LM 42 dias	8,4 (1,3-23,1)	2,4 (0,12-12,6)	0,034

Dados expressos em média ± desvio padrão, mediana e amplitude interquartil, ou em proporção (%) quando aplicável. ROP, retinopatia da prematuridade; RN, recém-nascido; CTC, corticoide; SDR, síndrome do desconforto respiratório; hmc, hemocultura; ECN, enterocolite necrosante; DBP, displasia broncopulmonar; HPIV III/IV, hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV; PCA, persistência do canal arterial; *SNAPPE II*, *Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*; CHAD, concentrado de hemácias; VM, ventilação mecânica; *CPAPn*, *nasal continuous positive airway pressure*; O₂, oxigênio; NPT, nutrição parenteral total; LM, leite materno.

Tabela 4 – Fatores de risco significativamente associados à ROP grave na análise multivariada

	Risco relativo	IC 95%	Valor de p
Sepse fúngica (hmc+)	3,64	1,57-8,41	0,003
DBP	4,2	1,28-13,82	0,018
Tempo de VM	1,01	1,01-1,02	<0,001

Também participaram da análise multivariada mas não mantiveram significância estatística: sepse tardia, ECN, PCA, HPIV III ou IV, *SNAPPE II*, IG e quantidade de LM recebida nos primeiros 42 dias de vida. ROP, retinopatia da prematuridade; IC, intervalo de confiança; hmc, hemocultura; DBP, displasia broncopulmonar; VM, ventilação mecânica; ECN, enterocolite necrosante; PCA, persistência do canal arterial; HPIV III/IV, hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV; *SNAPPE II*, *Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*; IG, idade gestacional; LM, leite materno.

11- ARTIGO 2 EM INGLÊS**Fungal Sepsis as an Independent Risk Factor for Retinopathy of Prematurity****Running Title: Fungal Sepsis and ROP**

Luciana T Fonseca, MD (1) (2)

Denise C Senna, MD (1)

Gabriela U Eckert, MD, PhD (3)

Rita C Silveira, MD, PhD (2) (3)

Renato S Procianoy, MD, PhD (2) (3)

- (1) Hospital da Criança Conceição (HCC)
- (2) Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
- (3) Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Department of Pediatrics, Neonatology Section, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, and Hospital da Criança Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil.

Address for correspondence:

Renato S Procianoy: Rua Silva Jardim 1155 # 701, Porto Alegre, RS 90450-71 Brazil

e-mail:rprocianoy@gmail.com

PH; +55 51 33315726

Keywords: Retinopathy of Prematurity; Fungal Sepsis; Candidemia; very low birth weight infants, prematurity.

The authors have no conflict of interest to declare.

ABSTRACT

Introduction: Retinopathy of prematurity (ROP) is a multifactorial disease. Several risk factors have been associated with its development.

Objective: Evaluate the role of fungal sepsis as an independent risk factor for ROP in any grade and severe ROP.

Patients and methods: Cohort study of newborns with birth weight (BW) less than 1500 g and/or gestational age (GA) less than 32 weeks, who were born from January 2011 to October 2014 and hospitalized in the first 24 hours of life.

Results: The prevalence of ROP in any grade was 31%. The incidence of FS confirmed by blood culture was 5.6%. Among patients who did not develop ROP, 2.7% had FS during hospitalization in the NICU. Among patients who developed ROP, 12% had candidemia ($p = 0.002$). When patients were evaluated for severe ROP, the incidence of FS among newborns who did not develop the disease was 3.7%, compared with 24.1% among those with severe ROP ($p < 0.001$). The statistical significance persisted after multivariate analysis for any grade (ROP and severe ROP).

Conclusion: FS seems to be an independent risk factor for the development of ROP in any grade and severe ROP in premature babies at risk for the disease.

Keywords: Retinopathy of Prematurity; Fungal Sepsis; Candidemia; very low birth weight infants, prematurity

INTRODUCTION

Retinopathy of prematurity (ROP) is a vasoproliferative condition of the eye secondary to the incomplete vascularization of the retina in premature newborns, whose natural progression can lead to blindness¹. The irreversible vision impairment can affect the cognitive and psychomotor development of affected infants². Low birth weight (BW), gestational age (GA) and early use of oxygen are the main risk factors for ROP³⁻⁵.

Fungal Sepsis (FS) is associated with significant morbidity and mortality. Its incidence varies widely among centers, probably due to differences in practices related to modifiable risk factors, such as exposure to empiric antibiotics and duration of parenteral nutrition⁶. *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* are the fungal species that are predominantly isolated in blood cultures in most Neonatal Intensive Care Units (NICUs)⁷. Invasive candidiasis is an emerging cause of neonatal sepsis and a major cause of late-onset sepsis in newborns with very low birthweight (VLBW, BW <1500g)⁸⁻⁹. Invasive candidiasis in extremely low birthweight (ELBW, BW <1000g) newborns is associated with a mortality rate of 30% and neurodevelopmental disability in more than half of survivors⁹. The main risk factors are use of multiple antibiotic regimens, central venous catheter, parenteral nutrition, immunodepression, very low birthweight and fungal colonization¹⁰.

Many studies have shown an association between FS and the development of ROP¹¹⁻¹⁴ and a meta-analysis by Bharwani and Dhanireddy indicated that invasive FS is significantly associated with the risk of developing severe ROP and ROP in any grade in VLBW newborns¹⁵. However, not all studies evaluating FS as an independent risk factor for ROP found a significant association.

Manzoni et al. found a significant association between FS and ROP only in ELBW babies, and only with threshold ROP¹⁶. Karlowicz et al. concluded in a study that candidemia may not be an independent risk factor for ROP in ELBW newborns and the clinically observed association may be mediated by the GA¹⁷.

This study intended to evaluate the role of FS as an independent risk factor for ROP in any grade and severe ROP in newborns at risk for this disease.

PATIENTS AND METHODS

The study population consisted of newborns with BW lower than 1500g and/or at a GA lower than 32 weeks who were hospitalized at the NICU of HCC from January 2001 to October 2014. Patients transferred from other hospitals who arrived in HCC with over 24 hours of life, patients with major congenital malformations and patients who progressed to death before the ophthalmic examination was completed were excluded.

This is a secondary analysis of an observational cohort study using retrospective and prospective data originally designed to evaluate the protective effect of breast milk (BM) against ROP. Retrospective data were surveyed in patient records in the Medical Archive and Statistics Service. The prospective portion of the research was carried out by monitoring patients during their stay in the NICU, the Intermediate Care Unit and, after discharge, the Ophthalmology Clinic.

The variables evaluated were the following: 1- Maternal and delivery data: Prenatal examination, use of antenatal corticosteroids (CTC), ovular infection, time of premature rupture of membranes greater than 18 hours, preeclampsia and delivery route. 2- Data of newborn: Sex, BW, GA (defined by echography when an obstetric ultrasound

was performed up to 12 weeks of pregnancy or by the Ballard method in the absence of an early ultrasound), weight classification for GA (small, adequate or large for gestational age), Apgar score at 5 minutes, SNAPPE 2 (severity score), transfer to another hospital, and multiple births. 3- Data of the newborn progress in the NICU: Respiratory distress syndrome (RDS), early-onset sepsis, late-onset sepsis, FS (all sepsis confirmed by blood culture), use of dopamine, hyperglycemia, necrotizing enterocolitis (NEC), bronchopulmonary dysplasia (BPD), grade III or IV intraventricular hemorrhage (III/IV IVH), time of mechanical ventilation (MV), time of nasal CPAP use, total time of use of oxygen (O₂), patent ductus arteriosus (PDA), number of packed red blood cell transfusions (PRBC), time of use of parenteral nutrition (PN), age of beginning of enteral nutrition, age at which full enteral diet was reached, and length of hospital stay. 4- Feeding data: The amount of BM received was checked daily, in mL/kg/day, from birth until the newborns completed 42 days of life or were discharged. 5- Ophthalmologic assessment data: Development and severity of ROP and the need for surgical treatment for ROP by laser photocoagulation. Disease staging was performed according to the International Committee for the Classification of ROP, 2005. Retinal mapping tests are part of the routine care at the HCC Neonatology Service and were performed by the same trained ophthalmologist. Ophthalmologic monitoring was initiated during hospitalization and continued through visits to the outpatient clinic after discharge. Follow-up was considered complete when patients were followed up to 40 weeks of corrected GA or until they showed fully vascularized retinas or with a minimum avascular area.

The research project was approved by the Research Ethics Committee at Grupo Hospitalar Conceição (GHC) and UFRGS, and an Informed Consent Form was given to the parents of the patients in the prospective portion of the study.

Statistical analysis:

The calculated sample size was 288 patients. The calculation was based on a 55% incidence of ROP and 15% of FS, according to a study by Bharwani and Dhareddy that showed an increase in the incidence of ROP due to FS by 30%, with 80% power and statistical significance level of 0.05¹⁵.

Quantitative variables were described as mean and standard deviation (symmetrical distribution) or median and interquartile range (asymmetric distribution). The qualitative variables were described as absolute and relative frequencies.

To compare the quantitative variable, either Student's t test (symmetrical distribution) or the Mann-Whitney test (asymmetric distribution) was used. To evaluate the association between the qualitative variables, the chi-square and Fisher's exact tests were used.

A multivariate analysis using Poisson regression with adjustment for robust variance was carried out to determine the prevalence ratios adjusted for the main factors involved. Some significant factors in the univariate analysis were excluded from the multivariate analysis due to multicollinearity.

First, the patients were divided into two groups: with ROP (any grade) and without ROP. Later, the groups were divided again: with severe ROP (ROP grade ≥ 3) and without ROP or with mild ROP (grade ≤ 2), and all analyses were repeated.

The statistical significance level adopted was $p < 0.05$, and the analyses were performed using the SPSS (Statistical Package for Social Science) software version 18.0.

RESULTS

During the study period, 456 newborns with BW <1500g and/or GA <32 weeks were admitted to the HCC NICU in their first 24 hours of life. Of these, 12 patients were excluded due to major congenital malformations and 102 died before completing their ophthalmologic evaluation. A total of 342 patients were initially included in the study. Nineteen patients were lost because they did not complete the ophthalmologic evaluation (they did not attend the outpatient follow-up appointments). Three hundred twenty-three patients participated in the final analysis.

The incidence of ROP in any grade was 31% (100 cases) and of severe ROP was 9% (29 cases). The incidence of FS confirmed by blood culture was 5.6% (18 cases in 323 patients). No patient developed endophthalmitis signs due to *Candida*. Of 18 fungemia cases, there were 9 cases of *Candida albicans* (50%), 7 cases of *Candida parapsilosis* (38.9%) and 2 cases of *Candida sp* (11%).

In the initial analysis (patients with ROP in any grade versus without ROP), both groups were similar for the presence of prenatal examination, antenatal use of CTC, ovular infection, time of premature rupture of membranes exceeding 18 hours and preeclampsia. There were no statistically significant differences between groups regarding sex, weight classification for GA, transfer from another hospital, twin pregnancy and incidence of early-onset sepsis. The presence of ROP had a statistically significant association in the univariate analysis with various variables studied, including FS (Table 1). Among the patients who did not develop ROP, 2.7% had FS during hospitalization in the NICU. Among the patients who developed ROP, 12% had candidemia ($p = 0.002$). Following the multivariate analysis, FS remained significantly associated with the development of ROP (Table 2).

In a second analysis, when severe ROP was present, the two groups were similar for the presence of prenatal examination, ovular infection and time of premature rupture

of membranes exceeding 18 hours. There were no statistically significant differences either between groups regarding sex, weight classification for GA, transfer from another hospital, twin pregnancy and incidence of early-onset sepsis (Table 3). The incidence of FS between newborns that did not develop severe ROP was 3.7%, compared to 24.1% among those with the disease ($p < 0.001$). The statistical significance remained after the multivariate analysis to control for confounders (Table 4).

DISCUSSION

Our study showed that the occurrence of FS confirmed by blood culture is associated with an increased risk of ROP development in any grade and severe ROP in newborns with BW less than 1500g and/or GA less than 32 weeks and this association remained significant after adjustment for confounders.

Although our methodology does not establish a cause and effect relationship, some hypotheses explain the association between FS and the development of ROP. In an animal model with rats, systemic candidiasis was shown to induce renal and cerebral neovascularization¹⁸. Systemic *Candida* infection can damage developing retinal blood vessels, which stimulates pro-inflammatory cytokines, making them more vulnerable to the development of ROP¹¹. It is not known whether candidiasis modulates the expression of known angiogenic factors such as the vascular endothelial growth factor involved in the pathogenesis of ROP¹⁹⁻²⁰, but the ability of *Candida albicans* to induce phagocytosis, cause damage to endothelial cells and release of cytokines and prostanooids by these cells is well documented²¹⁻²³.

The incidence of ROP in any grade and of severe ROP in our sample (31% and 9%, respectively) was very similar to those found by Manzoni et al. (31.9% and

12.9%)¹⁶. Our findings are also consistent with the meta-analysis by Bharwani and Dhareddy, which indicated that invasive FS is significantly associated with the risk of developing severe ROP and ROP in any grade in VLBW newborns¹⁵.

Unlike Manzoni et al¹⁶, the association between FS and ROP was not limited to ELBW newborns or to threshold ROP in our study. Another difference is that the incidence of FS in their study was much higher than ours: 11.6% vs. 5.6%. These differences may be due to the criteria for diagnosis of FS. Only cases confirmed by blood culture were considered FS by us, while Manzoni et al. established the presence of invasive FS when some species of fungus were isolated from blood cultures, urine collected using sterile suprapubic aspiration or sterile urinary catheterization with growth of more than 10,000 organisms/mL, cerebrospinal fluid or tip of intravascular catheter (in the latter case, limited to patients with previous peripheral colonization by the same species). Our study also differs from Karlowicz et al., in which the association between FS and ROP did not remain statistically significant after adjustment for GA¹⁷. Like us, this group defined FS when there was growth of some species of *Candida* in at least one blood culture. However, the population evaluated by them was different (only ELBW newborns), and so was the outcome (only threshold ROP).

Among the positive points, we can mention the successful follow-up, as only 19 of 342 patients (5.5%) were lost because they failed to return to the outpatient clinic to complete the ophthalmologic evaluation. This is a limitation in many previous studies on the subject, which excluded patients who did not undergo ophthalmologic examination.

A weakness of our study is that it was a secondary analysis, since the main objective was to evaluate the effect of BM on the prevention of ROP. Although FS was not the main factor under study, this analysis was planned since the initial design and all

patients included in the study had their blood cultures reviewed for the presence of bacteria or fungi.

Future studies, possibly in animal models, should elucidate whether the association between FS and ROP is causal or not. If a cause and effect relationship is proven, strategies for the reduction of FS such as the judicious use of broad-spectrum antibiotics, central venous catheters and parenteral nutrition may also have an impact on the incidence of ROP. Another aspect to be evaluated is whether the use of a prophylactic antifungal agent, which has already proved to be safe and effective in preventing invasive FS in premature babies²⁴, could also have an impact on the reduction of ROP. Also, screening for ROP should be more thorough in patients with fungemia.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Vania Naomi Hirakata for her aid in the statistical analysis.

REFERENCES

1. FIELDER, A.R.; REYNOLDS, J.D. Retinopathy of prematurity: clinical aspects. **Semin Neonatol**, vol. 6, n. 6, p. 461-75, 2001.
2. WHEATLEY, C.M.; DICKINSON, J.L.; MACKEY, D.A.; CRAIG, J.E.; SALE, M.M. Retinopathy of prematurity: recent advances in our understanding. **Br J Ophthalmol**, vol. 86, n. 6, p. 696-700, 2002.
3. CHEN, M.; CITIL, A; McCABE, F.; LEICHT, K.M.; FIASCONE, J.; DAMMANN, C.E., et al. Infection, oxygen, and immaturity: interacting risk factors for retinopathy of prematurity. **Neonatology**, n. 99, p. 125-32, 2011.
4. RAGHUVVEER, T.S.; BLOOM, B.T. A paradigm shift in the prevention of retinopathy of prematurity. **Neonatology**, n. 100, p. 116-29, 2011.
5. DARLOW, B.A.; HUTCHINSON, J.L.; HENDERSON-SMART, D.J.; DONOGHUE, D.A.; SIMPSON, J.M.; EVANS, N.J. Prenatal risk factors for severe retinopathy of prematurity among very preterm infants of the Australian and New Zealand Neonatal Network. **Pediatrics**, n. 115, p. 990-6, 2005.
6. GREENBERG, R.G.; BENJAMIN Jr, D.K. Neonatal candidiasis: diagnosis, prevention, and treatment. **J Infect**, vol. 69, n. 1, p. 19-22, 2014.
7. BALLOT, D.E.; BOSMAN, N.; NANA, T.; RAMDIN, T.; COOPER, P.A. Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country. **J Trop Pediatr**, vol. 59, n. 6, p. 460-4, 2013.
8. SHANE, A.L.; STOLL, B.J. Recent developments and current issues in the epidemiology, diagnosis, and management of bacterial and fungal neonatal sepsis. **Am J Perinatol**, vol. 30, n. 2, p. 131-41, 2013.
9. HUNDALANI, S.; PAMMI, M. Invasive fungal infections in newborns and current management strategies. **Expert Rev Anti Infect Ther**, vol. 11, n. 7, p.
10. TEZER, H.; CANPOLAT, F.E.; DILMEN, U. Invasive fungal infections

- during the neonatal period: diagnosis, treatment and prophylaxis. **Expert Opin Pharmacother**, vol. 13, n. 2, p. 193-205, 2012.
11. MITTAL, M.; DHANIREDDY, R.; HIGGINS, R.D. Candida sepsis and association with retinopathy of prematurity. **Pediatrics**, n. 101, p. 654-7, 1998.
 12. NOYOLA, D.E.; BOHRA, L.; PAYSSE, E.A.; FERNANDEZ, M.; COATS, D.K. Association of candidemia and retinopathy of prematurity in very low birthweight infants. **Ophthalmology**, vol. 109, n. 1, p. 80-4, 2002.
 13. SANCHEZ, V.; del MORAL, T.; CLAURE, N.; VANBUSKIRK, S.; FLYNN, J.; BANCALARI, E. Sepsis as a risk factor for the development of retinopathy of prematurity in extremely low birth weight infants. **Pediatr Res**, n. 51, p. 367, 2002.
 14. HAROON Parupia MF, DHANIREDDY, R. Association of postnatal dexamethasone use and fungal sepsis in the development of severe retinopathy of prematurity and progression to laser therapy in extremely low-birth-weight infants. **J Perinatol**, vol. 21, n. 4, p. 242-7, 2001.
 15. BHARWANI, S.K.; DHANIREDDY, R. Systemic fungal infection is associated with the development of retinopathy of prematurity in very low birth weight infants: a meta-review. **J Perinatol**, vol. 28, n. 1, p. 61-6, 2007.
 16. MANZONI, P.; MAESTRI, A.; LEONESSA, M.; MOSTERT, M.; FARINA, D.; GOMIRATO, G. Fungal and bacterial sepsis and threshold ROP in preterm very low birth weight neonates. **J Perinatol**, n. 26, p. 23-30, 2006.
 17. KARLOWICZ, G.M.; GIANNONE, P.J.; PESTIAN, J.; MORROW, A.L.; SHULTS, J. Does candidemia predict threshold retinopathy of prematurity in extremely low birth weight (≤ 1000 g) neonates? **Pediatrics**, n. 105, p. 1036-40, 2000.
 18. ASHMAN, R.B.; PAPADIMITRIOU, J.M. Endothelial cell proliferation associated with lesions of murine systemic candidiasis. **Infect Immunol**, n. 62, p. 5151-3, 1994.

19. PIERCE, E.A.; AVERY, R.L.; FOLEY, E.D.; AIELLO, L.P.; SMITH, L.E.H.
Vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 92, p. 905-9, 1995.
20. STONE, J.; CHAN-LING, T.; PE'ER, J.; ITIN, A.; GNESSIN, H.; KESHET, E.
Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, vol. 37, n.2, p. 290-2, 1996.
21. FILLER, S. G.; PFUNDER, A.S.; SPELLBERG, B.J.; SPELLBERG, J.P.; EDWARDS Jr, J.E.
Candida albicans stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. **Infect Immunol**, n. 64, p. 2609-17, 1996.
22. FILLER, S.G.; SWERDLOFF, J.N.; HOBBS, C.; LUCKETT, P.M.
Penetration and damage of endothelial cells by Candida albicans. **Infect Immunol**, n. 63, p. 976-83, 1995.
23. FILLER, S.G.; IBE, B.O.; LUCKETT, P.M.; RAJ, J.U.; EDWARDS Jr, J.E.
Candida albicans stimulates endothelial cell eicosanoid production. **J Infect Dis**, n. 164, p. 928-35, 1991.
24. ERICSON, J.E.; BENJAMIN, D.K.
Fluconazole prophylaxis for prevention of invasive candidiasis in infants. **Curr Opin Pediatr**, vol. 26, n. 2, p. 151-6, 2014.

Table 1 – Variables significantly associated with ROP in the univariate analysis

	Newborns without ROP 223 patients (69%)	Newborns with ROP 100 patients (31%)	P value
Apgar 5' <7	23 (10.5%)	29 (29%)	<0.001
RDS	99 (44.4%)	86 (86%)	<0.001
Late onset sepsis	57 (25.6%)	57 (57%)	<0.001
Fungal sepsis	6 (2.7%)	12 (12%)	0.002
Use of dopamine	49 (22%)	44 (44%)	<0.001
Hyperglycemia	19 (8.5%)	17 (17%)	0.034
NEC	19 (8.5%)	19 (19%)	0.009
BPD	37 (16.6%)	57 (57%)	<0.001
IVH III/IV	5 (2.2%)	17 (17%)	<0.001
PDA	31 (13.9%)	47 (47%)	<0.001
Birthweight	1272 ± 237	1041 ± 253	<0.001
Gestational age	30.8 ± 2	28.6 ± 2.2	<0.001
SNAPPE II	13 (5-23)	25 (13-47.5)	<0.001
No. of PRBCs	1 (0-2)	5 (2-9)	<0.001
Duration of MV	0 (0-3)	9.5 (1-38.5)	<0.001
Duration of nasal CPAP	3 (1-8)	8.5 (3-15)	<0.001
Duration of O ₂ therapy	5 (1-16)	35 (11-65.5)	<0.001
Duration of PN	3 (2-6)	6 (3.5-10)	<0.001
Start of enteral diet	4.7 (2-6)	6 (3.5-10)	<0.001
Full enteral diet	16 (2-24)	28.5 (17-40)	<0.001
Hospitalization time	48 ± 20	80 ± 39	<0.001
Average BM 42 days	10.2 (1.5-25.5)	4.9 (0.3-15.4)	0.005

Data expressed as mean ± standard deviation, median and interquartile range or as a rate (%) where applicable. ROP, retinopathy of prematurity; RDS, respiratory distress syndrome; NEC, necrotizing enterocolitis; BPD, Bronchopulmonary dysplasia; IVH III / IV, Grade III or IV intraventricular hemorrhage; PDA, Patent ductus arteriosus; SNAPPE II, Score for neonatal acute physiology perinatal extension II; PRBC, packed red blood cell transfusions; MV, mechanical ventilation; CPAP, continuous positive airway pressure; O₂, oxygen; BM, breast milk.

Table 2 – Variables significantly associated with ROP in the multivariate analysis

	Relative risk	95% CI	P value
Fungal sepsis	1.47	1.06-2.03	0.021
PDA	1.58	1.18-2.12	0.002
Gestational age	0.87	0.80-0.95	0.002

Also participated in the multivariate analysis but did not remain statistically significant: late-onset sepsis, NEC, BPD, IVH III or IV, SNAPPE II, MV time and amount of BM received within the first 42 days of life. ROP, retinopathy of prematurity; CI, confidence interval; PDA, Patent ductus arteriosus; NEC, necrotizing enterocolitis; BPD, Bronchopulmonary dysplasia; IVH III / IV, Grade III or IV intraventricular hemorrhage; SNAPPE II, Score for neonatal acute physiology perinatal extension II; MV, mechanical ventilation; BM, breast milk.

Table 3 – Risk factors significantly associated with severe ROP in the univariate analysis

	Newborns without severe ROP 294 patients (91%)	Newborns with severe ROP 29 patients (9%)	P value
Prenatal CTC	202 (68.7%)	14 (48.2%)	0.029
Preeclampsia	19 (37%)	5 (17.2%)	0.044
Apgar 5' <7	41 (13.8%)	12 (42.9%)	<0.001
RDS	157 (53.4%)	28 (96.6%)	0.003
Late onset sepsis	97 (33%)	17 (58.6%)	0.008
Fungal sepsis	11 (3.7%)	7 (24.1%)	<0.001
Use of dopamine	76 (25.9%)	17 (58.6%)	<0.001
Hyperglycemia	29 (9.9%)	7 (24.1%)	0.019
NEC	28 (9.5%)	10 (34.5%)	<0.001
BPD	69 (23.5%)	25 (86.2%)	<0.001
IVH III/IV	14 (4.8%)	8 (27.6%)	<0.001
PDA	62 (21.1%)	16 (55.2%)	<0.001
Birthweight	1230 ± 250	901 ± 211	<0.001
Gestational age	30.4 ± 2.2	27,5.6 ± 2.1	<0.001
SNAPPE II	15 (8-15)	39 (16.5-52.5)	<0.001
No. of PRBCS	1 (0-3.3)	10 (5.5-16.5)	<0.001
Duration of MV	0 (0-7)	49 (15.5-62.5)	<0.001
Duration of nasal CPAP	3 (1-10)	9 (5-15)	0.028
Duration of O ₂ therapy	7 (2-26.3)	68 (44-91)	<0.001
Duration of PN	16 (10.8-23.6)	35 (20-60)	<0.001
Start of enteral diet	4 (2-7)	6 (4-12)	0.006
Full enteral diet	17 (13-28)	34 (22-53.5)	0.020
Hospitalization time	53 ± 23.6	106.8 ± 53.2	<0.001
Average BM 42 days	8.4 (1.3-23.1)	2.4 (0.12-12.6)	0.034

Data expressed as mean ± standard deviation, median and interquartile range or as a rate (%) where applicable. ROP, retinopathy of prematurity; CTC, corticosteroid; RDS, respiratory distress syndrome; NEC, necrotizing enterocolitis; BPD, Bronchopulmonary dysplasia; IVH III / IV, Grade III or IV intraventricular hemorrhage; PDA, Patent ductus arteriosus; SNAPPE II, Score for neonatal acute physiology perinatal extension II; PRBC, packed red blood cell transfusions; MV, mechanical ventilation; CPAP, continuous positive airway pressure; O₂, oxygen; PN, parenteral nutrition; BM, breast milk.

Table 4 – Risk factors significantly associated with severe ROP in the multivariate analysis

	Relative risk	95% CI	P value
Fungal sepsis	3.64	1.57-8.41	0.003
BPD	4.2	1.28-13.82	0.018
Duration of MV	1.01	1.01-1.02	<0.001

Also participated in the multivariate analysis but did not remain statistically significant: late-onset sepsis, NEC, PDA, IVH III or IV, SNAPPE II, GA and amount of BM received within the first 42 days of life. ROP, retinopathy of prematurity; CI, confidence interval; BPD, Bronchopulmonary dysplasia; MV, mechanical ventilation; NEC, necrotizing enterocolitis; PDA, Patent ductus arteriosus; IVH III / IV, Grade III or IV intraventricular hemorrhage; SNAPPE II, Score for neonatal acute physiology perinatal extension II; GM, gestational age; BM, breast milk.

12- ARTIGO 3**Associação entre Ingesta de Leite Materno e Desenvolvimento de Displasia Broncopulmonar**

Luciana T Fonseca, MD (1) (2)

Denise C Senna, MD (1)

Rita C Silveira, MD, PhD (2) (3)

Renato S Procianoy, MD, PhD (2) (3)

(1) Hospital da Criança Conceição (HCC)

(2) Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

(3) Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Departamento de Pediatria, Serviço de Neonatologia, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Hospital da Criança Conceição, Porto Alegre, RS, Brasil.

Palavras chave: Displasia Broncopulmonar (DBP); Leite Materno; Recém-nascido de muito baixo peso; Prematuridade.

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

RESUMO

Introdução: A displasia broncopulmonar (DBP) é uma das principais complicações em longo prazo dos recém-nascidos (RNs) de muito baixo peso (RNMBP, PN <1500 gramas). Sua etiologia é multifatorial e complexa. As altas concentrações de oxigênio, frequentemente necessárias para manter a oxigenação dos prematuros (PMTs), resulta em estresse oxidativo, que prenuncia o desenvolvimento da doença em alguns casos. O leite materno (LM) tem propriedades antioxidantes que podem proteger os RNs do estresse oxidativo e pode ter um efeito protetor contra o desenvolvimento da DBP.

Objetivos: Avaliar o possível efeito protetor do LM contra a DBP, através da comparação da quantidade de LM recebida entre os pacientes que desenvolveram DBP e aqueles livres da doença.

Pacientes e métodos: Estudo de coorte observacional incluindo RNs com peso de nascimento (PN) inferior a 1500 gramas e / ou com idade gestacional (IG) inferior a 32 semanas, nascidos no período de janeiro de 2011 a outubro de 2014 e internados nas primeiras 24 horas de vida na UTI Neonatal do Hospital da Criança Conceição (HCC) em Porto Alegre. A DBP foi definida pela necessidade de oxigênio suplementar por período superior ou igual a 28 dias.

Resultados: A incidência da DBP foi de 29,1% (94 casos em 323 pacientes). A mediana da quantidade de LM recebida nas primeiras seis semanas de vida pelos pacientes foi de 10,8mL/kg/dia entre os pacientes sem DBP (amplitude interquartil 2,6-26,8) e de 2,3 mL/kg/dia entre os pacientes com DBP (0,08-9,9). A quantidade de LM recebida foi inversamente associada à incidência de DBP, mesmo após análise multivariada para controle de fatores de confusão. Determinado através de uma curva

ROC, o ponto de corte para que o efeito protetor se manifeste foi a quantidade média de 7mL/kg/dia de LM durante os primeiros 42 dias de vida.

Conclusão: A alimentação de PMTs com LM está associada a um menor risco para o desenvolvimento de DBP.

Palavras-chave: Displasia broncopulmonar e leite materno.

INTRODUÇÃO

A DBP é uma doença pulmonar crônica que acomete, em geral, PMTs submetidos à oxigenioterapia e à ventilação mecânica (VM) nos primeiros dias de vida. Ela se desenvolve em 16-20% dos RNMBP e continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade pulmonar durante a infância¹, apesar do aumento do uso de corticoide (CTC) antenatal, de surfactante exógeno e de estratégias de suporte respiratório menos invasivas^{2,3}. É uma preocupação em saúde pública, pois resulta em internações frequentes, com altas taxas de mortalidade, além de outras complicações como déficit no ganho pômdero-estatural e distúrbios no neurodesenvolvimento⁴.

A etiologia da DBP é multifatorial e complexa. O tecido pulmonar de prematuros sofre a falta de surfactante e uma alveolarização incompleta para uma superfície ventilatória adequada. A imaturidade pulmonar leva a microatelectasias difusas e redução da complacência. Esses fatores tornam os pulmões imaturos mais suscetíveis a lesões oxidativas causadas pelo uso de oxigênio suplementar e volutrauma. Fatores genéticos, hemodinâmicos, metabólicos, nutricionais, mecânicos e infecciosos atuam de forma cumulativa e sinérgica na fisiopatologia da lesão pulmonar, sendo a geração de radicais livres (RL) reconhecida como a principal causa de danos aos pulmões⁵.

Os RLs, normalmente produzidos em organismos vivos, são moléculas altamente reativas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados. Quando produzidos em excesso, se tornam mediadores importantes de lesão de células e tecidos⁶.

Normalmente existe um equilíbrio crítico entre a produção de RL e as defesas antioxidantes. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de RL tóxicos excede a

capacidade dos mecanismos de defesa em neutralizá-los. As reações com RL levam à oxidação de lipídios, proteínas e polissacarídeos; levam também à fragmentação do DNA, modificações nas bases e ruptura dos filamentos, resultando numa enorme variedade de efeitos biológicos destrutivos⁷. Saugstad propôs a existência da “Doença dos radicais livres de oxigênio em neonatologia”, devido à grande propensão dos neonatos à injúria causada pelas espécies reativas tóxicas de oxigênio⁸, que atuam como mecanismo patogênico comum em diversas patologias no período neonatal, entre as quais a DBP, ROP, ECN e leucomalácia periventricular. A expressão clínica da doença difere de acordo com o órgão acometido. A contribuição específica do estresse oxidativo na patogênese e progressão destas doenças é apenas parcialmente compreendida^{7,8}.

É sabido que a alimentação de PMTs com LM reduz o risco de diversos desfechos negativos da prematuridade, como sepse tardia, ROP e ECN, assim como reduz a duração e os custos da hospitalização na UTI Neonatal⁹⁻¹². Mais recentemente, o impacto do leite humano nestas morbidades emergiu como uma relação de dose-resposta, o que significa que “doses” mais elevadas de leite humano proporcionam uma maior redução de risco¹³.

O efeito da alimentação com LM no desenvolvimento da DBP havia sido muito pouco estudado, com resultados inconsistentes^{9,14}. Em publicação recente, Spiegler e cols. demonstraram que a alimentação de RNMBP com LM exclusivo foi associada a uma redução do risco de DBP quando comparados aos alimentados com FL exclusiva¹⁵.

Nosso estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor do LM contra a DBP através da comparação da quantidade de LM recebida entre os pacientes que desenvolveram DBP e aqueles livres da doença.

PACIENTES E MÉTODOS

População e logística:

A população da pesquisa foi constituída por todos os RNs com PN inferior a 1500g e / ou com IG inferior a 32 semanas, internados na UTI Neonatal do HCC no período de janeiro de 2011 a outubro de 2014. Foram excluídos os pacientes transferidos de outros hospitais que chegaram ao HCC com mais de 24 horas de vida, pacientes com malformações congênitas maiores e pacientes que evoluíram ao óbito antes de completar 42 dias de vida.

Esta é uma análise secundária de um estudo de coorte observacional, com dados retrospectivos e prospectivos, originalmente delineado para avaliar o efeito protetor do LM contra ROP. Os dados retrospectivos foram pesquisados nos prontuários no Serviço de Arquivo Médico e Estatística. A parte prospectiva da pesquisa foi realizada através do acompanhamento dos pacientes durante sua internação na UTI Neonatal e na Unidade de Cuidados Intermediários.

Variáveis avaliadas:

- 1- Dados maternos e do parto: Pré-natal, uso de corticoide (CTC) antenatal, infecção ovular, tempo de bolsa rota (BR) superior a 18 horas e pré-eclâmpsia.
- 2- Dados do RN: Sexo, PN, IG (definida por ecografia quando havia US obstétrica realizada até 12 semanas de IG ou por Ballard na ausência de ecografia precoce), classificação do peso para a IG (pequeno, adequado ou grande para a IG), Apgar no 5º minuto e SNAPPE 2 (escore de gravidade).
- 3- Dados da evolução do RN na UTI:

- Síndrome do desconforto respiratório (SDR) diagnosticada na presença de sinais de desconforto respiratório com necessidade de 40% ou mais de oxigênio e de reposição de surfactante exógeno;
 - Sepses precoce, sepsis tardia e sepsis fúngica diagnosticadas pela presença de sinais clínicos de sepsis e confirmadas por hemocultura (hmc);
 - Enterocolite necrotizante (ECN) definida pela presença de sinais clínicos da doença, acompanhados de pneumatoses intestinais ou pneumoperitônio ao RX;
 - Hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV (HPIV III/IV) determinada através de exames de ultrassom cerebral seriados, conforme rotina assistencial do serviço, utilizando a classificação de Papile¹⁶;
 - Tempo de VM;
 - Persistência do canal arterial (PCA) confirmado por ecocardiograma;
 - Tempo de uso de nutrição parenteral (NPT);
 - Tempo de internação.
- 4- Dados da alimentação: A quantidade de LM recebida foi verificada diariamente, em mL/kg/dia, desde o nascimento dos RNs até que completassem 6 semanas de vida ou recebessem alta hospitalar. Também foi verificada a quantidade total de leite recebida por dia (quantidade total de leite = LM + fórmula láctea, já que os pacientes não receberam leite humano de banco de leite durante o período do estudo).
- 5- DBP: definida pela necessidade de oxigênio suplementar por período maior ou igual a 28 dias, conforme consenso de 2005¹⁷.

Considerações éticas:

O projeto de pesquisa foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e da UFRGS e foi aplicado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos pais dos pacientes da parte prospectiva da pesquisa.

Análise estatística:

O tamanho da amostra calculado foi de 254 pacientes. O cálculo foi baseado em uma incidência de DBP de 30% (dados locais), objetivando detectar uma redução de DBP em 60%, com poder de 80% e nível de significância estatística de 0,05; conforme o estudo de Spiegler e cols. que demonstrou menor incidência de DBP entre RNMBP alimentados com LM quando comparados aos alimentados exclusivamente com FL¹⁵.

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão (distribuição simétrica) ou mediana e amplitude interquartil (distribuição assimétrica). As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas.

Os pacientes foram divididos em dois grupos: com DBP e sem DBP. Para comparar as variáveis quantitativas foi aplicado o teste t de Student (distribuição simétrica) ou o teste U de Mann-Whitney (distribuição assimétrica). Para avaliar a associação entre as variáveis qualitativas, foram empregados os testes qui-quadrado e exato de Fisher.

Foi realizada uma curva ROC na busca de um ponto de corte, um valor mínimo de LM necessário para que o efeito protetor se manifeste.

Posteriormente foi realizada uma análise multivariada através de regressão de Poisson com ajuste para variâncias robustas para a determinação das razões de prevalências ajustadas para os principais fatores envolvidos. Alguns fatores

significativos na análise univariada foram excluídos da análise multivariada devido a multicolinearidade.

O nível de significância estatística adotado foi $p < 0,05$ e as análises foram realizadas no programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versão 18.0.

RESULTADOS

No período do estudo, 437 RNs com PN<1500g e / ou IG<32 semanas foram internados na UTI Neonatal do HCC nas primeiras 24h de vida. Destes, 12 pacientes foram excluídos por malformações congênitas maiores e 102 por óbito antes de completar 42 dias de vida. Um total de 323 pacientes participaram da análise final.

A prevalência da DBP foi de 29,1% (94 casos em 323 pacientes). A quantidade média de LM recebida por dia nos primeiros 42 dias de vida foi de 13,7mL/kg/dia, correspondendo a 19,1% da quantidade total de leite recebida no período.

A mediana da quantidade de LM recebida nas primeiras seis semanas de vida pelos pacientes sem DBP foi de 10,8mL/kg/dia (amplitude interquartil 2,6-26,8) e pelos pacientes com DBP de 2,3 mL/kg/dia (0,08-9,9). Diversos fatores analisados foram associados ao desenvolvimento de DBP na análise univariada (tabela 1). A quantidade de LM recebida foi inversamente associada à incidência de DBP, mesmo após análise multivariada para controle de fatores de confusão (tabela 2).

Através da curva ROC (figura 1), determinamos que a quantidade média mínima de LM nos primeiros 42 dias de vida necessária para prevenção da DBP é de 7mL/kg/dia, (área sob a curva = 0,703). O ponto de corte escolhido foi aquele com concomitante maior sensibilidade e especificidade na curva ROC (sensibilidade de 73,4% e especificidade de 62,9%). Na análise univariada, comparando o risco de DBP

entre os RNs que receberam em média até 7mL/kg/dia e aqueles que receberam uma quantidade média superior, encontramos um RR de 3,03 (IC 2,03-4,5). Após análise multivariada para ajuste para fatores de confusão, o RR passou a ser de 1,7 (IC 1,2-2,4).

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, a quantidade de LM recebida foi inversamente associada à incidência de DBP, mesmo após análise multivariada para controle de fatores de confusão. A prevalência da DBP foi de 29,1%. A grande maioria dos prematuros em risco para DBP na nossa população recebe uma alimentação mista, com pouca quantidade de LM e predomínio de fórmula láctea. A quantidade média de LM recebida por dia nos primeiros 42 dias de vida na nossa população foi muito baixa, de apenas 13,7mL/kg/dia, correspondendo a 19,1% da quantidade total de leite recebida no período. A mediana da quantidade de LM recebida nas primeiras seis semanas de vida pelos pacientes foi de 10,8mL/kg/dia entre os pacientes sem DBP e de 2,3mL/kg/dia entre os pacientes com DBP. O ponto de corte para que o efeito protetor apareça, encontrado através da curva ROC, foi de 7mL/kg/dia.

Incrivelmente essa quantidade baixa de LM foi suficiente para exercer um efeito protetor contra a DBP. Este efeito muito provavelmente se deve às propriedades antioxidantes do LM. Em contraste com o desenvolvimento pulmonar fetal em um ambiente intrauterino relativamente hipóxico, o desenvolvimento pulmonar pós-natal em PMTs é dificultado pelo aumento do estresse oxidativo¹⁸. Os PMTs são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo, pois apresentam produção acelerada de RL e proteção antioxidante limitada (tanto pela interrupção da transferência placentário-fetal de moléculas antioxidantes como pela sua insuficiente produção

endógena), o que aumenta a suscetibilidade dos tecidos em crescimento rápido ao dano^{19,20}. O leite humano reduz o estresse oxidativo^{21,22} e proporciona uma melhor proteção antioxidante em comparação com as fórmulas para lactentes devido à presença de componentes enzimáticos específicos, tais como a superóxido dismutase humana^{23,24}. É importante citar que todo LM recebido pelos PMTs no período do estudo foi previamente congelado e pasteurizado e que o efeito protetor do LM fresco pode ser ainda maior. Sabe-se que o congelamento não altera as propriedades antioxidantes do LM²⁵, mas o processo de pasteurização as reduz²⁶.

Schanler e cols. realizaram um ensaio clínico randomizado quanto à alimentação de PMTs menores de 30 semanas de idade gestacional e três grupos foram comparados: LM exclusivo, leite humano pasteurizado e fórmula láctea para PMT exclusiva. Tanto o grupo do LM exclusivo como o grupo do leite humano pasteurizado apresentaram menores incidências de DBP quando comparados ao grupo da fórmula exclusiva, entretanto não houve ajuste para fatores de confusão, já que a DBP não estava entre os principais desfechos analisados⁹. O'Connor e cols. compararam RNs de baixo peso quanto ao tipo de alimentação e não encontraram diferença estatisticamente significativa quanto à incidência de DBP entre os grupos¹⁴. Spiegler e cols. demonstraram que a alimentação de RNMBP com LM exclusivo foi associada a uma redução do risco de DBP quando comparados aos alimentados com FL exclusiva¹⁵. Semelhante a esse último estudo, demonstramos menor incidência de DBP em RNMBP alimentados com LM. Uma importante diferença é que em nosso estudo contabilizamos a quantidade diária exata de LM recebida pelos RNs nos primeiros 42 dias de vida e realizamos uma comparação entre médias e/ou medianas da quantidade de LM recebida entre os grupos com e sem DBP. Spiegler e cols. compararam RNMBP alimentados com LM exclusivo com RNMBP alimentados com FL exclusiva. Todos RNs com alimentação mista, o que

corresponde à imensa maioria dos RNMBP no nosso meio, foram excluídos da análise. Nossa incidência geral de DBP foi bastante superior à encontrada por eles (29,1% e 18,4%, respectivamente). Esta diferença pode ser explicada pela definição de DBP, definida por eles como a necessidade de oxigênio suplementar ou qualquer suporte respiratório com 36 semanas de idade pós-menstrual e por nós como necessidade de oxigênio suplementar por período maior ou igual a 28 dias.

Como pontos positivos do nosso estudo, podemos citar a contabilidade detalhada da quantidade de LM e da quantidade total de leite recebida por dia pelos PMTs durante as primeiras seis semanas de vida. Salientamos também que este foi o primeiro estudo a demonstrar que mesmo pequenas quantidades de LM são capazes de reduzir a incidência de DBP. Diferentemente do estudo prévio, não excluimos os RNs em alimentação mista, até porque estes correspondem à imensa maioria da nossa população.

Uma limitação do nosso estudo foi não ter sido inicialmente delineado para avaliar o efeito do LM na proteção da DBP. Entretanto isto não invalida nossos resultados, já que todos os pacientes incluídos foram avaliados quanto ao desenvolvimento de DBP durante a coleta de dados. Além disso, realizamos um cálculo de tamanho de amostra específico para este estudo, em que o número de pacientes necessários foi inferior ao número de pacientes incluídos no presente estudo. Outra limitação foi não termos conseguido avaliar o efeito protetor do LM contra a DBP quando definida pela necessidade de O₂ ou suporte ventilatório com 36 semanas de IG corrigida. Devido à diminuição significativa no número de casos quando utilizando este critério diagnóstico (apenas 61 casos em 323 pacientes ou 18,8%), não foi possível realizar uma análise estatística adequada, inviabilizando qualquer tipo de associação. Outra possível limitação poderia ter sido a pequena quantidade de LM que os RNs em risco para DBP receberam na população estudada, mas isto acabou servindo para

mostrarmos o poder de proteção do LM contra DBP, que se manifesta mesmo em pequenas “doses”.

O LM para alimentação dos PMT traz, além dos benefícios já bem estabelecidos, também proteção contra o desenvolvimento da DBP. É possível que outras doenças da prematuridade influenciadas pelo estresse oxidativo também possam ter suas incidências reduzidas com um maior aporte de LM. Este é mais um motivo para intensificarmos o incentivo à ordenha de leite pelas mães dos PMTs para alimentação dos seus bebês e incentivo também para novos estudos nessa área.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Vania Naomi Hirakata pelo auxílio na análise estatística.

REFERÊNCIAS

1. FANAROFF, A.A.; STOLL, B.J.; WRIGHT, L.L.; CARLO, W.A.; EHRENKRANZ, R.A.; STARK, A.R. et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. **Am J Obstet Gynecol**, n. 196, p. 147-8, 2007.
2. SCHMALISCH, Gerd; WILITZKI, Silke; ROEHR, Charles C.; PROQUITTÉ, Hans; BÜHRER, Christoph. Development of lung function in very low birth weight infants with or without bronchopulmonary dysplasia: longitudinal assessment during the first 15 months of corrected age. **BMC Pediatr**, n. 23, p. 12 - 37, 2012.
3. BANCALARI, E.; CLAURE, N.; SOSENKO, I.R. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. **Semin. Neonatol**, n. 8, p. 63-71, 2003.
4. NIEDERMAIER, S.; HILGENDORFF, A. Bronchopulmonary dysplasia - an overview about pathophysiologic concepts. **Mol Cell Pediatr**, vol. 2, n. 1, p. 2, 2015.
5. PERRONE, S.; TATARANNO, M.; BUONOCORE, G. Oxidative Stress and Bronchopulmonary Dysplasia. **J Clin Neonatol**, vol. 1, n. 3, p. 109-14, 2012.
6. GRANOT, E.; KOHEN, R. Oxidative stress in childhood: in health and disease states. **Clin Nutr**, vol. 23, n. 1, p. 3-11, 2004.
7. MARSEGLIA, Lúcia; D'ANGELO, Gabriela; MANTI, Sara; ARRIGO, Teresa; BARBERI, Ignazio; REITER, Russel; GITTO, Eloisa. Oxidative Stress-Mediated Aging during the Fetal and Perinatal Periods. **Oxid Med Cell Longev**, 2014.
8. SAUGSTAD, O.D. Update on oxygen radical disease in neonatology. **Curr Opin Obstet Gynecol**, vol. 13, n. 2, p. 147-53, 2001.

9. SCHANLER, R.J.; LAU, C.; HURST, N.M.; SMITH, E.O. Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. **Pediatrics**, vol. 116, n. 2, p. 400-6, 2005.
10. MAAYAN-METZGER, A.; AVIVI, S.; SCHUSHAN-EISEN, I.; KUINT, J. Human milk versus formula feeding among preterm infants: short term outcomes. **Am J Perinatol**, vol. 29, n. 2, p. 121-6, 2012.
11. ZHOU, J.; SHUKLA, V.V.; JOHN, D.; CHEN, C. Human Milk Feeding as a Protective Factor for Retinopathy of Prematurity: A Meta-analysis. **Pediatrics**, vol. 136, n. 6, p. 1576-86, 2015.
12. JOHNSON, Tricia J.; PATEL, Aloka L.; BIGGER, Harold R.; ENGSTROM, Janet L.; MEIER, Paula P. Economic benefits and costs of human milk feedings: a strategy to reduce the risk of prematurity-related morbidities in very-low-birth-weight infants. **Adv Nutr**, vol. 1, n. 2, p. 207-12, 2014.
13. MEIER, P.P.; ENGSTROM, J.L.; PATEL, A.L.; JEGIER, B.J.; BRUNS, N. Improving the use of human milk during and after the NICU stay. **Clin Perinatol**, vol. 37, n. 1, p. 217-45, 2010.
14. O'CONNOR, D.L.; JACOBS, J.; HALL, R.; ADAMKIN, D.; AUESTAD, N.; CASTILLO, M. et al. Growth and development of premature infants fed predominantly human milk, predominantly premature infant formula, or a combination of human milk and premature formula. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, n. 37, p. 437-46, 2003.
15. SPIEGLER, J.; PREUß, M.; GEBAUER, C.; BENDIKS, M.; HERTING, E.; GÖPEL, W. German Neonatal Network (GNN). Does Breastmilk Influence the Development of Bronchopulmonary Dysplasia? **J Pediatr**, n. 169, p. 76-80, 2016.
16. PAPILE, L.A.; BURSTEIN, J.; BURSTEIN, R.; KOFFLER, H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. **J Pediatr**, n. 92, p. 529-34, 1978.

17. EHRENKRANZ, R.A.; WALSH, M.C.; VOHR, B.R.; JOBE, A.H.; WRIGHT, L.L.; FANAROFF, A.A. et al. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. **Pediatrics**, vol. 116, n. 6, p. 1353-60, 2005.
18. SAMPATH, V.; GARLAND, J.S.; HELBLING, D.; DIMMOCK, D.; MULROONEY, N.P.; SIMPSON, P.M. et al. Antioxidant response genes sequence variants and BPD susceptibility in VLBW infants. **Pediatr Res**, vol. 77, n. 3, p. 477-83, 2015.
19. LEE, J.L.; DAVIS, J.M. Future applications of antioxidants in premature infants. **Curr Opin Pediatr**, vol. 23, n. 2, p. 161-6, 2011.
20. PERRONE, S.; NEGRO, S.; TATARANNO, M.L.; BUONOCORE, G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. **J Matern Fetal Neonatal Med**, vol. 23, n. 3, p. 63-5, 2010.
21. SHOJI, H.; KOLETZKO, B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, vol. 10, n. 3, p. 324-8, 2007.
22. YAO, L.; FRIEL, J.K.; SUH, M.; DIEHL-JONES, W.L. Antioxidant properties of breast milk in a novel in vitro digestion/enterocyte model. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, vol. 50, n. 6, p. 670-6, 2010.
23. LUGONJA, N.; SPASIĆ, S.D.; LAUGIER, O.; NIKOLIĆ-KOKIĆ, A.; SPASOJEVIĆ, I.; OREŠČANIN-DUŠIĆ, Z. et al. Differences in direct pharmacologic effects and antioxidative properties of mature breast milk and infant formulas. **Nutrition**, vol. 29, n. 2, p. 431-5, 2013.
24. FRIEL, J.K.; MARTIN, S.M.; LANGDON, M.; HERZBERG, G.R.; BUETTNER, G.R. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. **Pediatr Res**, vol. 51, n. 5, p. 612-8, 2002.

25. AKDAG, A.; SARI, F.N.; DIZDAR, E.A.; URAS, N.; ISIKOGLU, S.; EREL, O. et al. Storage at -80°C preserves the antioxidant capacity of preterm human milk. **J Clin Lab Anal**, vol. 28, n. 5, p. 415-8, 2014.
26. SILVESTRE, D.; MIRANDA, M.; MURIACH, M.; ALMANSA, I.; JAREÑO, E.; ROMERO, F.J. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. **Acta Paediatr**, vol. 97, n. 8, p. 1070-4, 2008.

Tabela 1 – Associação entre fatores estudados e DBP na análise univariada

	RNs sem DBP 229 pacientes (70%)	RNs com DBP 94 pacientes (30%)	Valor de p
Pré-natal	209 (91,3%)	86 (91,5%)	0,948
CTC antenatal	156 (68,1%)	60 (63,8%)	0,515
Infecção ovular	29 (12,7%)	13 (13,8%)	0,856
BR > 18 horas	49 (21,4%)	17 (18,1%)	0,547
Pré-eclâmpsia	87 (38%)	27 (28,7%)	0,125
Sexo masculino	111 (48,5%)	51 (54,3%)	0,392
Pequeno para IG	109 (47,6%)	28 (29,8%)	0,004
Apgar 5' <7	21 (9,3%)	32 (33,7%)	<0,001
SDR	102 (44,5%)	83 (88,3%)	<0,001
Sepse precoce (hmc+)	5 (2,2%)	0 (0%)	0,327
Sepse tardia (hmc+)	59 (25,8%)	54 (58,5%)	<0,001
Sepse fúngica (hmc+)	9 (3,9%)	9 (9,6%)	0,060
HPIV III / IV	5 (2,2%)	17 (18,1%)	<0,001
PCA	94 (41%)	55 (59%)	<0,001
ECN	21 (9,2%)	17 (18,1%)	0,035
Peso de nascimento	1287 (750-950)	989 (495-1795)	<0,001
Idade gestacional	31 (25,4-36,5)	28,2 (23-33)	<0,001
<i>SNAPPE II</i>	13,8 (0-66)	33,3 (0-94)	<0,001
Tempo de VM	1,8 (0-19)	29,7 (0-158)	<0,001
Tempo de NPT	17,1 (0-72)	36,9 (8-150)	<0,001
Média LM 42 dias	10,8 (0-128)	2,3 (0-103)	<0,001

Dados expressos em média \pm desvio padrão, mediana e amplitude interquartil, ou em proporção (%) quando aplicável. DBP, displasia broncopulmonar; RN, recém-nascido; CTC, corticoide; BR, bolsa rota; IG, idade gestacional; SDR, síndrome do desconforto respiratório; hmc, hemocultura; HPIV III/IV, hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV; PCA, persistência do canal arterial; ECN, enterocolite necrosante; *SNAPPE II*, *Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*; VM, ventilação mecânica; NPT, nutrição parenteral total; LM, leite materno.

Tabela 2 – Fatores significativamente associados à DBP na análise multivariada

	Risco relativo	IC 95%	Valor de p
Peso de nascimento	0,999	0,99-1,00	0,033
Idade gestacional	0,927	0,86-0,99	0,044
SDR	2,279	1,25-4,15	0,007
Média LM 42 dias	0,981	0,96-0,99	0,030

Também participaram da análise multivariada mas não mantiveram significância estatística: sepse tardia, sepse fúngica, ECN, PCA, HPIV III ou IV, *SNAPPE II* e tempo de NPT. DBP, displasia broncopulmonar; IC, intervalo de confiança; SDR, síndrome do desconforto respiratório; LM, leite materno; ECN, enterocolite necrosante; PCA, persistência do canal arterial; HPIV III/IV, hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV; *SNAPPE II*, *Score for neonatal acute physiology perinatal extension II*; NPT, nutrição parenteral total.

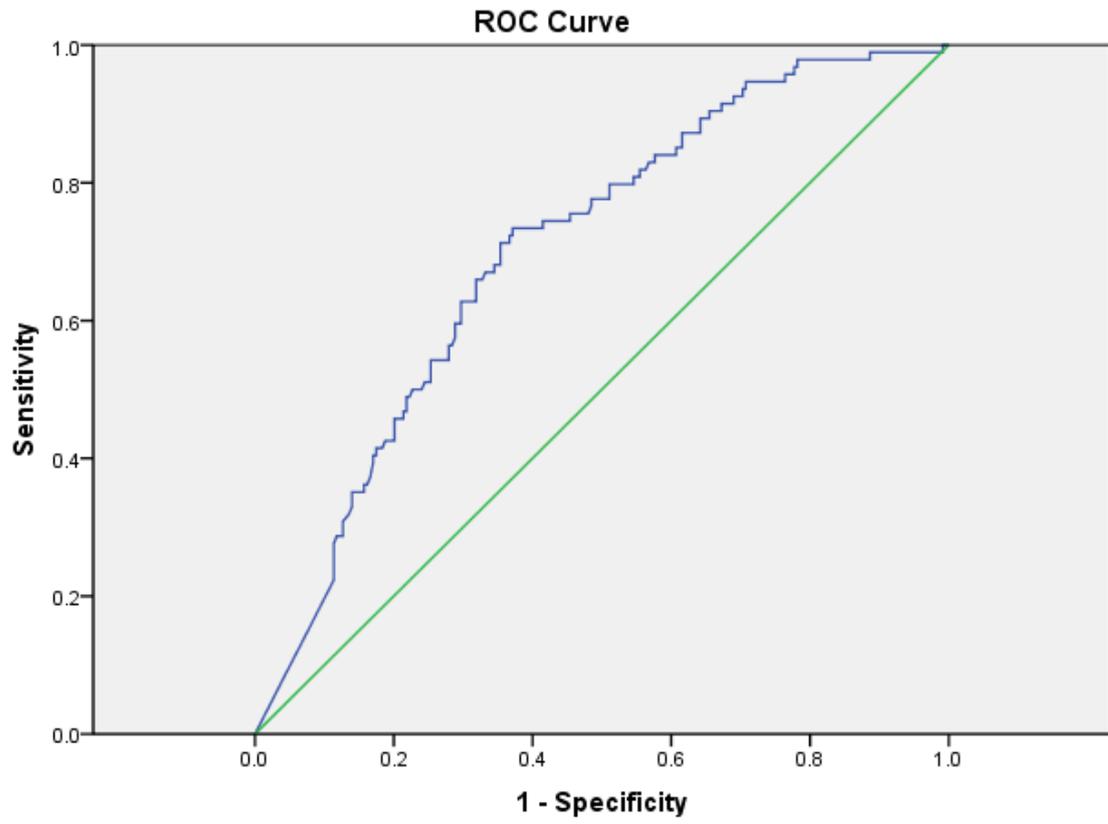


Figura 1- Curva ROC

13- ARTIGO 3 EM INGLÊS**Association between Breast Milk and Bronchopulmonary Dysplasia****Short Title: Breast Milk and BPD**

Luciana T Fonseca, MD (1) (2)

Denise C Senna, MD (1)

Rita C Silveira, MD, PhD (2) (3)

Renato S Procianoy, MD, PhD (2) (3)

(1) Hospital da Criança Conceição (HCC)

(2) Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

(3) Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Department of Pediatrics, Neonatology Section, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, and Hospital da Criança Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil.

Address for correspondence:

Renato S Procianoy: Rua Silva Jardim 1155 # 701, Porto Alegre, RS 90450-71 Brazil

e-mail:rprocianoy@gmail.com

PH; +55 51 33315726

The authors have no conflict of interest to declare.

ABSTRACT

Introduction: Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is the main long-term complication in very low birth weight newborns. Its etiology is multifactorial, and the high oxygen levels often needed to maintain the oxygenation of newborns with VLBW result in oxidative stress, which, in some cases, indicate development of the disease.

Objectives: Assess the possible protective effect of BM against BPD, since it has antioxidant properties.

Methods: Cohort study including infants with a birth weight (BW) below 1500 grams and / or gestational age (GA) of less than 32 weeks, born between January 2011 and October 2014. BPD was defined by the need for supplementary oxygen for 28 days or more.

Results: The incidence of BPD was 29.1%. The median amount of BM received by the patients in the first six weeks of life was significantly higher in patients without BPD (10.8mL/kg/day) than in those with BPD (2.3 mL/kg/day). The amount of BM received was inversely associated with the incidence of BPD, even after multivariate analysis. The cutoff point at which the protective effect emerged was an average amount of 7 mL/kg/day of BM during the first 42 days of life.

Conclusion: Feeding VLBW infants with breast milk is associated with a lower risk of developing BPD.

Keywords: Bronchopulmonary dysplasia, breast milk, very low birth weight infants, prematurity

INTRODUCTION

BPD is a chronic lung disease that generally affects newborn infants submitted to oxygen therapy and mechanical ventilation (MV) in the first days of life. It develops in 16-20% of VLBW infants and is the main cause of morbidity and mortality during infancy¹, despite increased use of antenatal steroids, surfactant therapy and less invasive respiratory support strategies^{2,3}. The disorder is a public health concern since it results in frequent hospitalization with high mortality rates and other complications, including delayed growth and weight gain, and neurodevelopmental problems⁴.

Its etiology is multifactorial and complex. Lung tissue in premature babies is compromised by lack of surfactant and incomplete alveolarization, resulting in respiratory distress. Lung immaturity leads to diffuse microatelectasis and decreased lung compliance. These factors make the lungs more susceptible to oxidative stress caused by the use of supplementary oxygen and barotrauma. Genetic, hemodynamic, metabolic, nutritional, mechanic and infectious factors act cumulatively and synergistically in the physiopathology of lung injury, with the generation of free radicals (FR) recognized as the main cause of lung damage⁵.

Typically produced in living organisms, FR are highly reactive molecules containing one or more unpaired electrons. When produced in excess, they become important mediators of cell and tissue injury⁶.

There is generally a critical balance between the production of FR and antioxidant defense systems. Oxidative stress occurs when the production of toxic FR exceeds defense mechanisms' ability to neutralize them. Reactions with FR lead to the oxidation of lipids, proteins and polysaccharides, as well as DNA fragmentation, base changes and filament rupture, producing a wide range of destructive biological effects⁷.

Saugstad proposed the existence of an “oxygen radical disease in neonatology” given the overwhelming propensity of newborns to injury caused by toxic reactive oxygen species⁸, which act as a common pathogenic mechanism in different pathologies during the neonatal period, including BPD, retinopathy of prematurity (ROP), necrotizing enterocolitis (NEC) and periventricular leukomalacia. Clinical expression of the disease differs depending on the organ affected. The specific contribution of oxidative stress to the pathogenesis and progression of these diseases is only partially understood^{7,8}.

Feeding newborns with human milk is known to reduce the risk of several negative outcomes of prematurity, such as late-onset sepsis, ROP and NEC, as well as shortening stays in the NICU and lowering the costs involved⁹⁻¹². Recently, the impact of breast milk on these morbidities has emerged as a dose-response relationship, whereby higher doses of breastmilk provide greater risk reduction¹³.

The effect of breast milk on the development of BPD has been little studied, with inconsistent results^{9,14}. In a recent study, Spiegler et al. found that exclusive breastfeeding of VLBW infants was associated with reduced risk of BPD when compared to those fed only infant formula¹⁵.

This study aimed to assess the possible protective effect of BM against BPD by comparing the amount of BM received among patients who developed BPD and those who didn't develop the disease.

PATIENTS AND METHODS

Population and logistics:

The study population consisted of infants with BW below 1500g and / or GA of less than 32 weeks, hospitalized in the NICU of HCC from January 2011 to October

2014. Patients transferred from other hospitals who were more than 24 hours old when they arrived at HCC, infants with major congenital malformations, and those who died before completing 42 days of life were excluded from the study.

This is a secondary analysis of an observational cohort study, with retrospective and prospective data, originally designed to evaluate the protective effect of BM against ROP. Retrospective data were taken from patient charts at the Medical Archives and Statistics Service. The prospective portion of the study was conducted by monitoring the infants during their hospitalization in the NICU and Intermediate Care Unit.

Variables assessed:

- 1- Maternal and birth data: Prenatal, use of antenatal steroids, ovular infection, rupture of membranes (ROM) for more than 18 hours and preeclampsia.
- 2- Newborn data: Sex, BW, GA (defined by ultrasound when an obstetric ultrasound was performed up to 12 weeks GA or by Ballard in the absence of an early ultrasound), weight classification for GA (small, satisfactory or large for GA), 5-minute Apgar score and SNAPPE 2 (severity score).
- 3- Data on newborn progress in the ICU:
 - Respiratory distress syndrome (RDS) diagnosed in the presence of signs of respiratory discomfort with the need for 40% oxygen or more and surfactant replacement therapy;
 - Early and late-onset sepsis and fungal sepsis diagnosed by the presence of clinical signs of sepsis and confirmed by blood culture;
 - NEC defined by the presence of clinical signs of the disease accompanied by pneumatosis intestinalis or pneumoperitoneum on X-ray;
 - Grade III or IV intraventricular hemorrhage (IVH III / IV) determined by cerebral

ultrasound realized in accordance with the service's care routine, using the Papile-Burstein classification¹⁶;

- Time on MV;
- Patent ductus arteriosus (PDA) confirmed by echocardiogram;
- Time on parenteral nutrition (PN);
- Length of hospital stay.

- 4- Feeding data: The amount of BM received was checked daily, in mL/kg/day, from birth until the newborns completed 6 weeks of life or were discharged. The total amount of milk received per day was also calculated (total amount of milk = BM + infant formula, since infants did not receive human milk from milk banks during the study period).
- 5- BPD: defined by the need for supplementary oxygen for 28 days or more, in accordance with the 2005 consensus¹⁷.

Ethical considerations:

This study was approved by the Research Ethics Committee of Grupo Hospitalar Conceição (GHC) and UFRGS and the parents of the patients in the prospective part of the research gave written informed consent.

Statistical analysis:

The sample size calculated was 254 patients. The calculation was based on a BPD rate of 30% (local data) and aimed at detecting a 60% decline in BPD, with power of 80% and a statistical significance level of 0.05; in accordance with the study by Spiegler et al., who observed lower BPD rates among breastfed VLBW infants when compared to babies fed only infant formula¹⁵.

Quantitative variables were expressed as mean and standard deviation (symmetric distribution) or median and interquartile range (asymmetric distribution). Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies.

The patients were divided into two groups: with BPD and without BPD. The Student's t-test (symmetric distribution) or Mann-Whitney U test (asymmetric distribution) were used to compare the quantitative variables. The chi-square test and Fisher's exact test were applied to assess the association between qualitative variables.

A ROC curve was produced to identify a cutoff point, that is, the minimum amount of BM needed to provide a protective effect.

Poisson multivariate regression with robust error variance was carried out to determine the adjusted prevalence ratios for the main factors involved. Some significant factors in the univariate analysis were excluded from the multivariate analysis due to multicollinearity.

A statistical significance level of $p < 0.05$ was adopted and analyses were performed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software, version 18.0.

RESULTS

During the study period, 437 newborns with $BW < 1500g$ and / or $GA < 32$ weeks were hospitalized in the NICU of HCC in the first 24 hours of life. Of these, 12 infants were excluded due to major congenital malformations and 102 died before completing 42 days of life. A total of 323 patients participated in the final analysis.

BPD prevalence was 29.1% (94 cases in 323 patients). The average amount of BM received per day in the first 42 days of life was 13.7mL/kg/day, corresponding to

19.1% of the total amount of milk received during the period.

The median amount of BM received by infants without BPD in the first six weeks of life was 10.8mL/kg/day (interquartile range from 2.6 to 26.8) and 2.3 mL/kg/day (0.08 to 9.9) for babies with BPD. Several factors analyzed were associated with BPD development in the univariate analysis (table 1). The amount of BM received was inversely associated with the incidence of BPD, even after multivariate analysis to control confounding factors (table 2).

Based on the ROC curve, we determined that the minimum amount of BM needed in the first 42 days of life to prevent BPD is 7mL/kg/day (area underneath the curve = 0.703). The cutoff point selected simultaneously showed the highest sensitivity and specificity on the ROC curve (sensitivity of 73.4% and specificity of 62.9%). In multivariate analysis, we found a relative risk (RR) of 3.03 (confidence interval, CI 2.03-4.5) when patients that received up to 7mL/kg/day of BM on average were compared to those fed a higher average amount. After multivariate analysis to adjust for confounding variables, the RR recorded was 1.7 (CI 1.2 – 2.4).

DISCUSSION

In our study, the amount of BM received was inversely associated with the incidence of BPD, even after multivariate analysis to control confounding factors. BPD prevalence was 29.1%. Most of the premature babies at risk for BPD in our population received a mixed diet consisting primarily of infant formula and little BM. The average amount of BM received per day in the first 42 days of life in our population was very low, just 13.7mL/kg/day, corresponding to 19.1% of the total amount of milk received in the period. The median amount of BM received in the first six weeks of life was

10.8mL/kg/day in patients without BPD and 2.3 mL/kg/day among those who developed BPD. The cutoff point identified for the emergence of the protective effect, based on the ROC curve, was 7mL/kg/day.

Incredibly, this low amount of BM was sufficient to exercise a protective effect against BPD, likely due to the antioxidant properties of BM. In contrast with fetal lung development in a relatively hypoxic intrauterine environment, postnatal lung development in newborns is hampered by increased oxidative stress¹⁸. Newborns are particularly vulnerable to oxidative stress because they exhibit accelerated FR production and limited antioxidant protection (due to interrupted placental transfer of antioxidant molecules and insufficient endogenous production), which increases the susceptibility of fast-growing tissue to damage^{19,20}. BM reduces oxidative stress^{21,22} and provides better antioxidant protection when compared to infant formula due to the presence of specific enzyme components, such as superoxide dismutase^{23,24}. It is important to note that all the BM received during the study period was previously frozen and pasteurized and the protective effect of fresh BM could be even greater. It is known that freezing does not change the antioxidant properties of BM²⁵, whereas the pasteurization process reduces them²⁶.

Schanler et al. conducted a randomized clinical trial on the diet of infants with a GA of less than 30 weeks, comparing three groups: exclusive BM, pasteurized BM, and exclusive infant formula. Both the exclusive BM group and pasteurized BM group showed lower BPD rates when compared to the exclusive formula group; however, there was no adjustment for confounding factors, since BPD was not among the main outcomes analyzed⁹. O'Connor et al. compared type of diet in low weight newborns and found no statistically significant intergroup difference for the incidence of BPD¹⁴. Spiegler et al. found that exclusive breastfeeding of VLBW infants was associated with

reduced risk of BPD when compared to those fed only infant formula¹⁵. Similarly, we observed a lower BDP rate in breastfed infants. An important difference is that in our study we calculated the exact daily amount of BM received in the first 42 days of life and compared average and median amounts of BM received between groups with and without BPD. Spiegler et al. compared exclusively breastfed VLBW infants with those fed only infant formula. They excluded all patients receiving a mixed diet, which corresponds to most of the VLBW infants in our setting. The overall incidence of BPD in our study is far higher than that observed by the aforementioned authors (29.1% and 18.4%, respectively). This difference can be explained by the definition of BPD, defined by them as the need for supplementary oxygen or any form of respiratory support at 36 weeks GA, while we defined it as the need for supplementary oxygen for a period greater than or equal to 28 days.

The strengths of our study include the detailed calculations on the amount of BM and total amount of milk received per day by the newborns in the first six weeks of life. It is also important to underscore that this is the first study to demonstrate that even small amounts of BM can reduce the incidence of BPD. Unlike the previous study, we did not exclude newborns fed a mixed diet. In fact, these infants represented most of our study population.

A limitation of our study was not having been initially designed to evaluate the effect of BM in protecting against BPD. However, this does not invalidate our results, since all patients included were assessed for BPD development during data collection. In addition, we performed a particular sample size calculation for this study, on which the required number of patients was lower than the number of patients included. Another limitation was our inability to evaluate the protective effect of BM against BPD when defined as the need for oxygen or respiratory support at a corrected age of 36

weeks. Given the significant reduction in the number of cases when using this diagnostic criteria (only 61 cases in 323 patients, or 18.8%), an adequate statistical analysis could not be done, making impossible any kind of association. Another possible limitation could have been the small amount of BM that newborns at risk for BPD received in our population; however, this enabled us to show the protective power of BM against BPD, which was evident even at small 'doses'.

In addition to the well-known benefits, breastfeeding also protects against the development of BPD. It is possible that the incidence of other oxidative stress-related diseases affecting preterm infants may be reduced by providing more BM. This is yet another reason to encourage mothers of premature infants to breastfeed their babies, in addition to being an incentive for further research in the area.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Vania Naomi Hirakata for her assistance in statistical analysis.

REFERENCES

1. FANAROFF, A.A.; STOLL, B.J.; WRIGHT, L.L.; CARLO, W.A.; EHRENKRANZ, R.A.; STARK, A.R. et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. **Am J Obstet Gynecol**, n. 196, p. 147-8, 2007.
2. SCHMALISCH, Gerd; WILITZKI, Silke; ROEHR, Charles C.; PROQUITTÉ, Hans; BÜHRER, Christoph. Development of lung function in very low birth weight infants with or without bronchopulmonary dysplasia: longitudinal assessment during the first 15 months of corrected age. **BMC Pediatr**, n. 23, p. 12 - 37, 2012.
3. BANCALARI, E.; CLAURE, N.; SOSENKO, I.R. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. **Semin. Neonatol**, n. 8, p. 63-71, 2003.
4. NIEDERMAIER, S.; HILGENDORFF, A. Bronchopulmonary dysplasia - an overview about pathophysiologic concepts. **Mol Cell Pediatr**, vol. 2, n. 1, p. 2, 2015.
5. PERRONE, S.; TATARANNO, M.; BUONOCORE, G. Oxidative Stress and Bronchopulmonary Dysplasia. **J Clin Neonatol**, vol. 1, n. 3, p. 109-14, 2012.
6. GRANOT, E.; KOHEN, R. Oxidative stress in childhood: in health and disease states. **Clin Nutr**, vol. 23, n. 1, p. 3-11, 2004.
7. MARSEGLIA, Lúcia; D'ANGELO, Gabriela; MANTI, Sara; ARRIGO, Teresa; BARBERI, Ignazio; REITER, Russel; GITTO, Eloisa. Oxidative Stress-Mediated Aging during the Fetal and Perinatal Periods. **Oxid Med Cell Longev**, 2014.
8. SAUGSTAD, O.D. Update on oxygen radical disease in neonatology. **Curr Opin Obstet Gynecol**, vol. 13, n. 2, p. 147-53, 2001.

9. SCHANLER, R.J.; LAU, C.; HURST, N.M.; SMITH, E.O. Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. **Pediatrics**, vol. 116, n. 2, p. 400-6, 2005.
10. MAAYAN-METZGER, A.; AVIVI, S.; SCHUSHAN-EISEN, I.; KUINT, J. Human milk versus formula feeding among preterm infants: short term outcomes. **Am J Perinatol**, vol. 29, n. 2, p. 121-6, 2012.
11. ZHOU, J.; SHUKLA, V.V.; JOHN, D.; CHEN, C. Human Milk Feeding as a Protective Factor for Retinopathy of Prematurity: A Meta-analysis. **Pediatrics**, vol. 136, n. 6, p. 1576-86, 2015.
12. JOHNSON, Tricia J.; PATEL, Aloka L.; BIGGER, Harold R.; ENGSTROM, Janet L.; MEIER, Paula P. Economic benefits and costs of human milk feedings: a strategy to reduce the risk of prematurity-related morbidities in very-low-birth-weight infants. **Adv Nutr**, vol. 1, n. 2, p. 207-12, 2014.
13. MEIER, P.P.; ENGSTROM, J.L.; PATEL, A.L.; JEGIER, B.J.; BRUNS, N. Improving the use of human milk during and after the NICU stay. **Clin Perinatol**, vol. 37, n. 1, p. 217-45, 2010.
14. O'CONNOR, D.L.; JACOBS, J.; HALL, R.; ADAMKIN, D.; AUESTAD, N.; CASTILLO, M. et al. Growth and development of premature infants fed predominantly human milk, predominantly premature infant formula, or a combination of human milk and premature formula. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, n. 37, p. 437-46, 2003.
15. SPIEGLER, J.; PREUß, M.; GEBAUER, C.; BENDIKS, M.; HERTING, E.; GÖPEL, W. German Neonatal Network (GNN). Does Breastmilk Influence the Development of Bronchopulmonary Dysplasia? **J Pediatr**, n. 169, p. 76-80, 2016.
16. PAPILE, L.A.; BURSTEIN, J.; BURSTEIN, R.; KOFFLER, H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. **J Pediatr**, n. 92, p. 529-34, 1978.

17. EHRENKRANZ, R.A.; WALSH, M.C.; VOHR, B.R.; JOBE, A.H.; WRIGHT, L.L.; FANAROFF, A.A. et al. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. **Pediatrics**, vol. 116, n. 6, p. 1353-60, 2005.
18. SAMPATH, V.; GARLAND, J.S.; HELBLING, D.; DIMMOCK, D.; MULROONEY, N.P.; SIMPSON, P.M. et al. Antioxidant response genes sequence variants and BPD susceptibility in VLBW infants. **Pediatr Res**, vol. 77, n. 3, p. 477-83, 2015.
19. LEE, J.L.; DAVIS, J.M. Future applications of antioxidants in premature infants. **Curr Opin Pediatr**, vol. 23, n. 2, p. 161-6, 2011.
20. PERRONE, S.; NEGRO, S.; TATARANNO, M.L.; BUONOCORE, G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. **J Matern Fetal Neonatal Med**, vol. 23, n. 3, p. 63-5, 2010.
21. SHOJI, H.; KOLETZKO, B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, vol. 10, n. 3, p. 324-8, 2007.
22. YAO, L.; FRIEL, J.K.; SUH, M.; DIEHL-JONES, W.L. Antioxidant properties of breast milk in a novel in vitro digestion/enterocyte model. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, vol. 50, n. 6, p. 670-6, 2010.
23. LUGONJA, N.; SPASIĆ, S.D.; LAUGIER, O.; NIKOLIĆ-KOKIĆ, A.; SPASOJEVIĆ, I.; OREŠČANIN-DUŠIĆ, Z. et al. Differences in direct pharmacologic effects and antioxidative properties of mature breast milk and infant formulas. **Nutrition**, vol. 29, n. 2, p. 431-5, 2013.
24. FRIEL, J.K.; MARTIN, S.M.; LANGDON, M.; HERZBERG, G.R.; BUETTNER, G.R. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. **Pediatr Res**, vol. 51, n. 5, p. 612-8, 2002.

25. AKDAG, A.; SARI, F.N.; DIZDAR, E.A.; URAS, N.; ISIKOGLU, S.; EREL, O. et al. Storage at -80°C preserves the antioxidant capacity of preterm human milk. **J Clin Lab Anal**, vol. 28, n. 5, p. 415-8, 2014.

26. SILVESTRE, D.; MIRANDA, M.; MURIACH, M.; ALMANSA, I.; JAREÑO, E.; ROMERO, F.J. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. **Acta Paediatr**, vol. 97, n. 8, p. 1070-4, 2008.

Table 1 – Association between the factors studied and BPD in univariate analysis

	Without BPD 229 patients (70%)	With BPD 94 patients (30%)	P value
Prenatal care	209 (91.3%)	86 (91.5%)	0.948
Antenatal steroids	(68.1%)	60 (63.8%)	0.515
Ovular infection	(12.7%)	13 (13.8%)	0.856
ROM > 18 hours	(21.4%)	17 (18.1%)	0.547
Preeclampsia	(38%)	27 (28.7%)	0.125
Male	(48.5%)	51 (54.3%)	0.392
Small for GA	(47.6%)	28 (29.8%)	0.004
5' Apgar score <7	(9.3%)	32 (33.7%)	<0.001
RDS	(44.5%)	83 (88.3%)	<0.001
Early-onset sepsis	(2.2%)	0 (0%)	0.327
Late-onset sepsis	(25.8%)	55 (58.5%)	<0.001
Fungal sepsis	(3.9%)	9 (9.6%)	0.060
IVH III / IV	(2.2%)	17 (18.1%)	<0.001
PDA	(41%)	55 (59%)	<0.001
NEC	(9.2%)	17 (18.1%)	0.035
Birth weight	1287 (750-950)	989 (495-1795)	<0.001
Gestational age	31 (25,4-36,5)	28.2 (23-33)	<0.001
SNAPPE II	13.8 (0-66)	33.3 (0-94)	<0.001
Time on MV	1.8 (0-19)	29.7 (0-158)	<0.001
Time on PN	17.1 (0-72)	36.9 (8-150)	<0.001
Average BM 42 days	10.8 (0-128)	2.3 (0-103)	<0.001

Date expressed as mean \pm standard deviation, median and interquartile range, or in proportion (%) when applicable. BPD, Bronchopulmonary dysplasia; ROM, rupture of membranes; GA, gestational age; RDS, respiratory distress syndrome; IVH III / IV, Grade III or IV intraventricular hemorrhage; PDA, Patent ductus arteriosus; NEC, necrotizing enterocolitis; MV, mechanical ventilation; PN, parenteral nutrition; BM, breast milk.

Table 2 – Factors significantly associated with BPD in multivariate analysis

	Relative risk	CI 95%	P value
Birth weight	0.999	0.99-1.00	0.033
Gestational age	0.927	0.86-0.99	0.044
RDS	2.279	1.25-4.15	0.007
Average BM 42 days	0.981	0.96-0.99	0.030

Also formed part of the analysis but showed no statistical significance: late-onset sepsis, fungal sepsis, NEC, PDA, IVH III or IV, SNAPPE II and PN time. BPD, Bronchopulmonary dysplasia; CI, confidence interval; RDS, respiratory distress syndrome; BM, breast milk; NEC, necrotizing enterocolitis; PDA, Patent ductus arteriosus; IVH III / IV, Grade III or IV intraventricular hemorrhage; PN, parenteral nutrition.

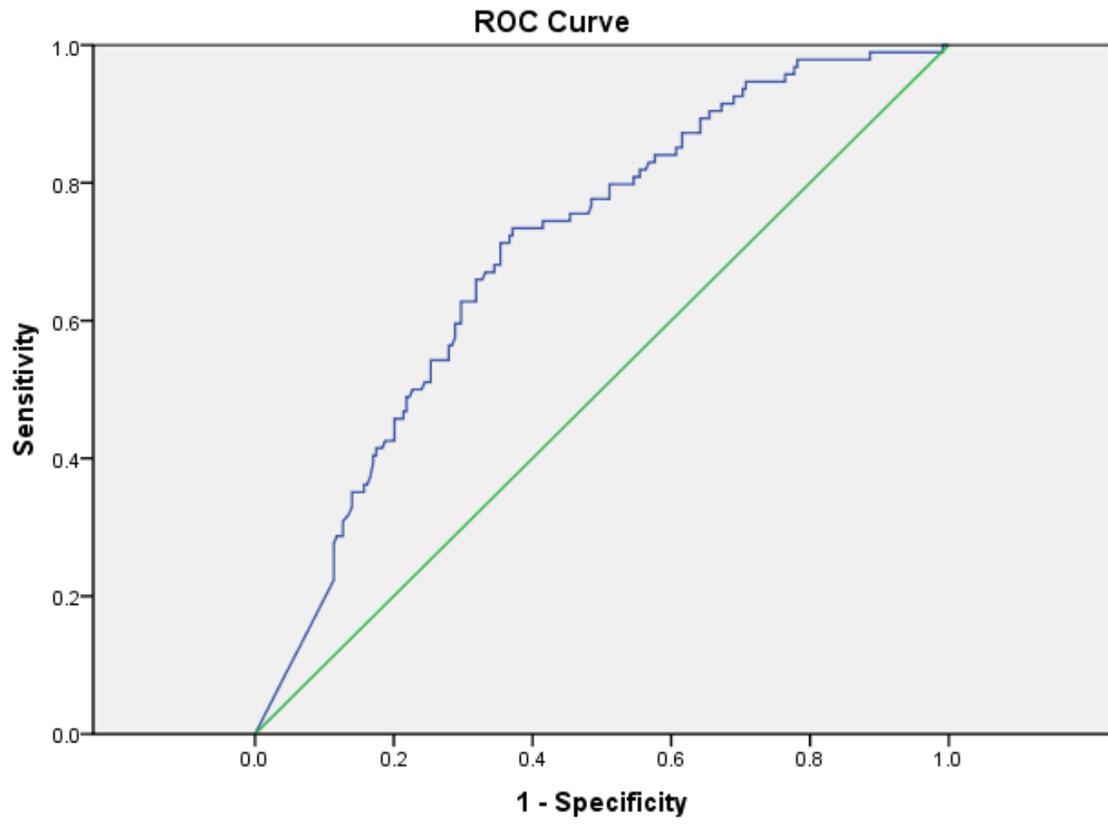


Figure 1- ROC curve

14- CONCLUSÕES

A grande maioria dos prematuros em risco para ROP na nossa população recebe uma alimentação mista, com pouca quantidade de LM e predomínio de FL. A quantidade média de LM recebida por dia nos primeiros 42 dias de vida na nossa população foi muito baixa, de apenas 13,7mL/kg/dia, correspondendo a 19,1% da quantidade total de leite (LM+FL) recebida no período.

Provavelmente essa quantidade baixa de LM não seja suficiente para prevenir ROP. Apesar do LM ter se mostrado protetor contra ROP na análise univariada em todos os períodos avaliados, apenas a quantidade de LM recebida na 6ª semana de vida manteve significância estatística após ajuste para variáveis confundidoras. Também é possível que o LM seja importante na prevenção da ROP em um momento mais tardio, como a partir da sexta semana de vida, momento em que conseguimos demonstrar efeito protetor do LM contra ROP apesar das pequenas quantidades de LM recebidas.

Em uma análise secundária, demonstramos que a ocorrência de sepse fúngica confirmada por hemocultura está associada a um aumento do risco de desenvolvimento de ROP em qualquer grau e de ROP grave em RNs com PN inferior a 1500g e / ou com IG inferior a 32 semanas e esta associação permaneceu significativa após ajuste para fatores de confusão.

Estudamos também o efeito protetor do LM contra DBP. A prevalência da DBP em nossa amostra foi de 29,1%. A mediana da quantidade de LM recebida nas primeiras seis semanas de vida pelos pacientes foi de 10,8mL/kg/dia entre os pacientes sem DBP e de 2,3mL/kg/dia entre os pacientes com DBP. A quantidade de LM recebida foi inversamente associada à incidência de DBP, mesmo após análise multivariada para controle de

fatores de confusão. O ponto de corte para que o efeito protetor apareça, encontrado através da curva ROC, foi de 7mL/kg/dia. Este efeito muito provavelmente se deve às propriedades antioxidantes do LM.

O LM para alimentação dos PMT traz, além dos benefícios já bem estabelecidos, também proteção contra o desenvolvimento da DBP. É possível que outras doenças da prematuridade influenciadas pelo estresse oxidativo também possam ter suas incidências reduzidas com um maior aporte de LM. Este é mais um motivo para intensificarmos o incentivo à ordenha de leite pelas mães dos PMTs para alimentação dos seus bebês e incentivo também para novos estudos nessa área.

15- APÊNDICES

APÊNDICE 1- Protocolo da Pesquisa

Efeito do Leite Materno na Prevenção da ROP

Identificação:

Iniciais do nome: _____ Número (próprio da pesquisa): _____
 Data de Nascimento: __/__/__ Sexo: (1) Masc (2) Fem

Dados Maternos e do Parto:

Pré-natal: (1) sim (2) não CTC antenatal: (1) sim (2) não (3) incompleto
 Infecção ovular: (1) sim (2) não BR > 18h: (1) sim (2) não
 Pré-eclâmpsia: (1) sim (2) não Parto: (1) vaginal (2) cesáreo

Dados do RN:

Peso de Nascimento: _____ IG: _____
 Classificação: (1) PIG (2) AIG (3) GIG Apgar: ____ / ____
 Gemelar: (1) sim (2) não SNAPPE 2: _____
 Transferido de outro hospital: (1) sim (2) não

Evolução:

SDR / surfa: (1) sim (2) não
 Sepses Precoce Hmc +: (1) sim (2) não
 Sepses Tardia Hmc +: (1) sim (2) não
 Sepses fúngica Hmc +: (1) sim (_____) (2) não
 Uso de dopamina: (1) sim (2) não
 Hiperglicemia: (1) sim (2) não
 ECN: (1) sim (2) não
 DBP: (1) sim (2) não
 HPIV grau III ou IV: (1) sim (2) não
 Número de transfusões CHAD: _____
 PCA: (1) sim (2) não
 Tempo de VM: _____ dias
 Tempo de CPAPn / VNI: _____ dias
 Tempo total do uso de O₂: _____ dias
 Tempo de NPT: _____ dias
 Idade início alimentação enteral: _____ dias de vida
 Idade dieta enteral plena: _____ dias de vida
 Idade saída: _____ dias

Recebeu LM até 42dv: (1) sim (2) nunca (Quantidade LM: verso)

ROP: (0) s/ ROP

- (1) ROP 1
- (2) ROP 2
- (3) ROP 3
- (4) ROP grave c/ indicação de laser
- (5) Descolamento de retina

Tratamento cirúrgico ROP: (1) sim (2) não

Dias de vida	Quantidade de LM (mL/Kg/dia)	Quantidade de FL (mL/Kg/dia)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		
41		
42		

APÊNDICE 2- Termo De Consentimento Livre e Esclarecido**Título do Estudo: Efeito do Leite Materno na Prevenção da Retinopatia da Prematuridade.**

O recém-nascido prematuro é uma criança frágil que merece cuidados especiais durante todo o seu período na UTI neonatal. Devido a sua imaturidade, apresenta maior risco de complicações em diversos órgãos. Uma dessas complicações é a retinopatia da prematuridade (ROP). Trata-se de uma doença na retina dos prematuros que acontece porque os vasos sanguíneos da retina ainda não estão completamente formados quando o bebê nasce antes do tempo. É uma das principais causas de cegueira na infância. Para detectar esta doença nos estágios iniciais e tentar evitar que progrida até a cegueira, todos os recém-nascidos com peso de nascimento menor que 1500 gramas e / ou com idade gestacional inferior a 32 semanas são avaliadas pelo oftalmologista quando completam seis semanas de vida.

O leite materno protege os bebês de diversas doenças e pode ter um efeito protetor contra a ROP.

Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que busca descobrir se o aleitamento materno pode ajudar na prevenção da ROP.

Para isso, é necessário que os dados do seu filho sejam pesquisados no seu prontuário hospitalar. Nenhuma intervenção ocorrerá com a finalidade de pesquisa, por isso não causa riscos para o bebê. Será mantido o total anonimato dos pacientes participantes e total sigilo dos seus dados pessoais, que serão utilizados apenas para esta pesquisa. Não haverá nenhuma forma de reembolso de dinheiro, já que com a participação na pesquisa você não terá nenhum gasto.

Se comprovado mais este benefício do leite materno, o estímulo à alimentação com leite materno, que já é bastante intenso em bebês a termo, ganharia força maior também entre os prematuros (mesmo que inicialmente através de sonda), que receberiam a nutrição ideal. Por isso, solicito seu consentimento para a participação de seu filho na pesquisa.

Caso não concorde em participar do estudo, não haverá prejuízo na assistência do seu bebê. Este termo de consentimento é apresentado em duas vias, ficando uma com o pesquisador e uma com o responsável pelo paciente.

Eu, _____, responsável pelo recém-nascido _____, fui informado(a) dos objetivos do estudo e sua justificativa, de forma detalhada e precisa. Recebi informações específicas sobre o procedimento no qual meu filho está envolvido, e os desconfortos ou possíveis riscos, tanto quanto os benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento e terei plena liberdade de retirar meu filho da pesquisa se acreditar necessário.

Declaro, portanto, que autorizo a inclusão de meu filho na pesquisa realizada pelo Dr. Renato Procianoy (fone 33598794) e pela Dra. Luciana Teixeira Fonseca (pessoa responsável pela apresentação deste termo de consentimento, fone 33572230). Caso desejar, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (Coordenador: José Artur Bogo Chies, fone 33083738, endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro, Porto Alegre-RS) e o Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (Coordenador: Odontólogo Daniel Demétrio Faustino da Silva, fone 33572407, localizado no Hospital Conceição) também poderão dar mais informações a cerca de sua participação neste projeto de pesquisa, que foi previamente aprovado por estes dois comitês.

Assinatura do Responsável _____ .

Data: ____ / ____ / ____ .