

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

# **Leite materno e programação metabólica: benefícios para a saúde a curto e a longo prazo**

Carolina Fidalgo da Cruz Roldão

**M**

2019



**Artigo de Revisão Bibliográfica**

**Leite materno e programação metabólica: benefícios para a saúde  
a curto e a longo prazo**

Dissertação para conclusão do Mestrado Integrado em Medicina submetida ao Instituto  
de Ciências Biomédicas Abel Salazar, da Universidade do Porto

**Autora: Carolina Fidalgo da Cruz Roldão**

Aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciência Biomédicas Abel  
Salazar, Universidade do Porto

Endereço Eletrónico: carolinafroldao@outlook.pt

**Orientador: Dra. Helena Maria Castro Moura Ferreira Mansilha**

Assistente Convidada no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto  
Assistente Graduada Hospitalar em Pediatria no Serviço de Pediatria do Centro Materno Infantil  
do Norte

**Coorientador: Professora Doutora Esmeralda Emília Gomes Martins**

Professora Auxiliar Convidada no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade  
do Porto

Assistente Graduado Hospitalar em Pediatria no Serviço de Pediatria do Centro Materno Infantil  
do Norte

**Artigo de Revisão Bibliográfica**

## **Leite materno e programação metabólica: benefícios para a saúde a curto e a longo prazo**

Dissertação para conclusão do Mestrado Integrado em Medicina submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, da Universidade do Porto

ASSINATURA DO ESTUDANTE:

Gracina Fidalgo da Cruz Roldão

ASSINATURA DO ORIENTADOR:

António Jansil

ASSINATURA DO CO-ORIENTADOR:

António Jansil

Porto, junho de 2019

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, por todo o apoio, palavras de encorajamento e motivação, graças a eles, cedo percebi que é com base no trabalho e superação que podemos alcançar os objetivos a que nos propomos.

À minha orientadora, Dra. Helena Maria Castro Moura Ferreira Mansilha, pela disponibilidade permanente, compromisso, simpatia, dedicação, compreensão e confiança demonstrados desde o primeiro dia na orientação desta dissertação.

À minha co-orientadora Professora Doutora Esmeralda Emília Gomes Martins por ter aceitado fazer parte deste trabalho.

A todos os amigos que criei e conquistei ao longo do curso, sem dúvida Biomédicas é uma família que vou levar para a vida.

## Resumo

**Introdução** - A assunção da importância da nutrição, não só no período pré-natal, mas também na vida pós-natal imediata, como fator determinante no desenvolvimento da saúde e da doença mais tarde, é uma vertente que extravasa o mero cumprimento das necessidades nutricionais para o crescimento e desenvolvimento nos primeiros meses de vida, sendo de extrema pertinência definir padrões ótimos de alimentação infantil. Recentemente, a par da relevância do estudo da genómica humana, a importância da possível influência de fatores nutricionais precoces na modulação da expressão génica, tem sido alvo de intensa investigação como importantes mediadores na origem do desenvolvimento da saúde e da doença (DOHaD). Têm sido propostos mecanismos epigenéticos, ou seja, processos mitoticamente herdados que regulam a expressão fenotípica do ADN, sem modificar a sua sequência, sendo atualmente a metilação do ADN o processo mais estudado. Assim, o leite materno como alimento ideal em exclusividade nos primeiros meses de vida, composto por nutrientes bem como por numerosas substâncias bioativas, será certamente um agente modulador epigenético por excelência, resultando na melhor programação metabólica a curto e a longo prazo.

**Objetivos** - Pretende-se demonstrar através desta revisão bibliográfica, os benefícios do leite materno na modulação da expressão génica, resultando numa melhor programação metabólica a curto e longo prazo.

**Material e Métodos** - Com recurso à base de dados eletrónica Pubmed-Medline, foram selecionados artigos científicos de investigação, revisão e meta-análise, realizados em humanos e animais. Foram selecionados artigos desde 2008 até 2018 na língua inglesa e portuguesa, após a aplicação dos filtros foram selecionados os mais relevantes, de acordo com o título e resumo.

**Resultados** - As consequências de não amamentar revelaram maiores taxas de infeções gastrointestinais e respiratórias, enquanto que a maior exclusividade e duração da amamentação se associa a menor pressão sanguínea e colesterol sérico na vida adulta, assim como melhor desenvolvimento cognitivo e menor risco de obesidade e de diabetes tipo 2. Acredita-se que esses efeitos estejam então relacionados com as diferenças de composição entre o leite materno e as fórmulas infantis, nomeadamente quanto ao baixo conteúdo de proteínas e à presença de substâncias bioativos no leite materno.

**Conclusão** - Possivelmente, os mecanismos epigenéticos estarão na base do reivindicado efeito protetor do leite materno relativamente ao desenvolvimento de tantas doenças, nomeadamente as doenças infecciosas no lactente e outras como obesidade, hipertensão, dislipidemia, insulinoresistência mais tarde, na vida adulta. Estes efeitos levaram à descrição do leite materno como um "veículo de comunicação" entre o binómio mãe-filho.

**Palavras-chave:** *“leite materno”; “metilação do ADN”; “epigenética”; “DOHaD (origem do desenvolvimento da saúde e da doença)”; “benefícios da programação para a saúde”; “determinantes de saúde”; “amamentação”; “benefícios da amamentação”.*

## Abstract

It is widely recognized that nutrition plays a major role in prenatal and early life exposures as it contributes to the development of health and disease later in life. This matter goes beyond normal fulfillment of nutritional requirements for growth, development and health of infants and it is extremely important to define optimal breastfeeding. In addition to the study of the importance of human genomics, it has been recently investigated the different ways of which early nutrition components can affect the modulation of gene expression. This is seen as a vital tool for the development of health and disease (DOHaD). Epigenetic mechanisms have been proposed. In other words, mitotic inheritance processes that regulate the phenotypic expression of the DNA without modifying DNA sequencing. DNA methylation is currently the most studied process. Thus, having breast milk as the natural first food for infants would be an epigenetic modulating agent par excellence as it contains a large group of bioactive compounds such as proteins. The outcome would be short-and long-term benefits in metabolic programming.

**Objectives** – Objectives – The aim of this review is to demonstrate the role of human breast milk. This will be showed through the regulation of gene expression, which will lead to Short-and long-term benefits in metabolic programming.

**Materials and Methods** - This study is based on research articles, systematic reviews and meta analysis about humans and animals found in the Pubmed-Medline electronic database. Articles from 2008 to 2018 were chosen, both in english and portuguese. The selection process had in consideration the title and abstract.

**Results** - Not being breastfed was associated with higher risks of one or more episodes of gastrointestinal and respiratory infections. At the same time, exclusive breastfeeding revealed lower blood pressure and serum cholesterol in adult life. It has also showed significant benefits for cognitive development and protection against overweight and obesity and type 2 diabetes. It is believed that these effects are associated with the nutritional comparison between human milk and infant formula, namely lower milk protein content and bioactive components in breast milk.

**Conclusion** - Epigenetic mechanisms could possibly be the cause for the so claimed protective effect of breast milk in relation to the development of many diseases. As an example, the infectious diseases in infants and other ones such as obesity, hypertension, dyslipidemia and insulin resistance later in life. These effects lead to describe the breast milk as a way of verbal mother- child communication.

**Keywords:** *“breast milk”; “methylation DNA”; “epigenetic”; “DOHaD (development origins of health and disease)”; “programming health benefits”; “determinants in healthy”; “breastfeeding”; “benefits of Breast Feeding”.*

## Lista de abreviaturas

**AAP** – Academia Americana de Pediatria

**Ac** – grupo acetilo

**ACeS** – Agrupamento de Centros de Saúde

**ADN** - Ácido desoxirribonucleico

**AHRQ** - Agency for healthcare research and quality

**AM** – Aleitamento materno

**ARN** – Ácido ribonucleico

**BFHI** - Baby Friendly Hospital Initiative

**CHOP** – child-hood obesity project

**CpG** – dinucleotídeos citosina-guanina

**CT** – colesterol total

**DNT** - Doenças não transmissíveis

**DOHaD** - The Developmental Origins of Health and Disease

**EPACI** - Estudo do Padrão Alimentar e Crescimento na Infância

**ESPGHAN** – European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition

**HC** – Hidratos de carbono

**HDL** – High Density Lipoprotein

**HTA** – Hipertensão Arterial

**IHAB** – Iniciativa Hospital Amigo dos Bebés

**IMC** – Índice de massa corporal

**INS** – Inquérito Nacional de Saúde

**LCPUFA** - Ácidos gordos poli insaturados de cadeia longa

**LDL** – Low Density Lipoprotein

**LM** – Leite materno

**mARN** – Ácido ribonucleico mensageiro

**NPY** – Neuropeptídeo Y

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PAD** - Pressão arterial diastólica

**PAS** – Pressão arterial sistólica

**Pol** – polimerase

**PROBIT** – The promotion of breastfeeding intervention trial

**Qi** – Quociente de inteligência

**TFs** – Fatores de transcrição



# Índice

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| Agradecimentos .....                                                          | i  |
| Resumo.....                                                                   | ii |
| Abstract .....                                                                | iv |
| Lista de abreviaturas .....                                                   | vi |
| Introdução .....                                                              | 1  |
| Objetivos .....                                                               | 2  |
| Material e Métodos.....                                                       | 2  |
| I. Programação metabólica – mecanismos epigenéticos .....                     | 3  |
| II. Programação metabólica durante o desenvolvimento fetal.....               | 4  |
| III. Programação metabólica durante a infância – Papel do leite materno ..... | 5  |
| IV. Leite materno - Benefícios para a saúde a curto e longo prazo.....        | 6  |
| 1- Infecções .....                                                            | 6  |
| 2- Doença alérgica .....                                                      | 7  |
| 3- Neurodesenvolvimento.....                                                  | 8  |
| 4- Doenças cardiovasculares e metabólicas.....                                | 9  |
| 4.1- Pressão arterial .....                                                   | 9  |
| 4.2 - Perfil lipídico .....                                                   | 10 |
| 4.3 - Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2 .....                                   | 10 |
| 4.4 – Obesidade .....                                                         | 11 |
| V. Conclusão .....                                                            | 13 |
| VI. Anexos .....                                                              | 14 |
| VII. Referências Bibliográficas.....                                          | 20 |

## Lista de figuras

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> Visão esquemática das exposições que potenciam modificações epigenéticas e o risco de doença metabólica em adultos. ....                  | 14 |
| <b>Figura 2</b> Enquadramento da prevenção e tratamento de doenças não transmissíveis ao longo do ciclo de vida. ....                                     | 15 |
| <b>Figura 3</b> Regulação da expressão génica por silenciamento de genes pela metilação do ADN .....                                                      | 16 |
| <b>Figura 4</b> Regulação da expressão génica por modificação pós-traducional de histonas. ....                                                           | 17 |
| <b>Figura 5</b> Early Protein Hypothesis .....                                                                                                            | 18 |
| <b>Figura 6</b> Possíveis "vias de programação" metabólica induzidas por proteínas que influenciam a estrutura e a função do sistema cardiovascular ..... | 19 |

## Introdução

O aleitamento materno (AM) é considerado um dos pilares da promoção e proteção da saúde dos lactentes em todo o mundo. *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition* descreveu a amamentação como o método mais natural e aconselhado para o crescimento e desenvolvimento do lactente<sup>7</sup>. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o leite materno (LM) em exclusivo nos primeiros 6 meses de vida, podendo prolongar-se até aos 2 anos, integrada na restante dieta.<sup>8-12</sup> A prevalência do AM tem sido muito variável ao longo dos tempos, atingindo valores muito reduzidos nas décadas que se seguiram à II Guerra Mundial pelas alterações sociais e comportamentais que modificaram o estilo de vida das mulheres<sup>13</sup>, pela crescente participação no mercado de trabalho e, sobretudo, devido à comercialização e promoção agressiva dos leites industriais.<sup>14</sup> Após os anos 70, verificou-se um retorno gradual à prática do AM, sobretudo nas mulheres mais informadas.<sup>13</sup>

Em 1992, a OMS e a UNICEF lançaram um programa mundial de promoção do AM intitulado *Baby Friendly Hospital Initiative (BFHI)*, tendo Portugal aderido em 1994, com o programa nacional *Iniciativa Hospital Amigo dos Bebés (IHAB)*.<sup>15</sup> Este programa tem a missão de proteger, promover e apoiar o AM em maternidades, serviços de obstetrícia, neonatologia e pediatria, influenciando a prática dos profissionais de saúde e cuidadores.<sup>16</sup> A classificação de um organismo como Unidade de Saúde Amiga dos Bebés é atribuída a Hospitais com base na adopção de dez medidas e é atribuída a ACeS com base em sete medidas, definidas pela OMS e pela UNICEF. Estas medidas garantem que as mães e os bebés possam receber apoio adequado e informações atualizadas no período pré-natal e pós-natal em relação à alimentação infantil e às vantagens e procedimentos para o sucesso do AM.<sup>16</sup> Atualmente está em vigor em 15 unidades de saúde acreditadas, todas hospitais, à excepção da primeira unidade de cuidados de saúde primários (ACES Lisboa Ocidental e Oeiras) que foi certificada em 2016 pela Comissão Nacional Iniciativa Amiga dos Bebés.<sup>15</sup>

Em Portugal, os estudos são geralmente parcelares e de difícil comparação, mas parecem confirmar que as taxas de amamentação têm tido uma melhoria progressiva nas últimas duas décadas.<sup>13</sup> Com base em quatro Inquéritos Nacionais de Saúde (INS) realizados nos anos 1995/96, 1998/99, 2005/06 e 2014, avaliou-se a prevalência do AM exclusivo aos 3, 4 e 6 meses em Portugal continental e em Portugal continental e ilhas. Assistiu-se a uma evolução muito positiva, com duplicação da prevalência de mulheres a amamentar em exclusivo aos 3 e 4 meses. Esta melhoria parece estar relacionada com as ações desenvolvidas no âmbito do programa IHAB, bem como com as alterações legislativas sobre o período de licença de maternidade implementadas em Portugal.

Em 2012 a EPACI (Estudo do Padrão Alimentar e Crescimento na Infância) Portugal revelou com base numa população de 2500 lactentes e respetivas mães, que cerca de 91% das mães portuguesas iniciam AM, mas apenas 66% se encontravam a fazer LM aos 4 meses de idade. Foi possível verificar que somente 20,6% dos lactentes cumpriram as recomendações preconizadas pela OMS, registando-se um declínio da prevalência de AM ao longo do tempo (53% dos lactentes mantiveram o AM aos 6 meses e apenas 23% aos 12 meses de idade). Estes dados nacionais demonstram claramente a importância do apoio continuado às mães que amamentam, bem como a necessidade da criação de condições ótimas de suporte às mães, de forma a permitir o cumprimento das atuais recomendações.<sup>17</sup>

Os benefícios a curto e longo prazo da amamentação na saúde do lactente estão bem estabelecidos, resultando de complexas interações ambientais, socioeconómicas, psicológicas e genéticas: como a redução das taxas de infeção e de doenças crónicas como a doença atópica, asma, obesidade, *diabetes mellitus* tipo 2, hipertensão arterial (HTA), dislipidemia e doença cardiovascular e ainda benefício no neurodesenvolvimento.<sup>18, 19</sup>

A teoria “The Developmental Origins of Health and Disease” (DOHaD), defende e compila evidência científica que apoia que o LM pode estar na base de alterações epigenéticas, veiculadas por processos como a metilação do ADN, que induzidas nas fases iniciais do ciclo de vida, tendem a “programar” o risco metabólico e outros distúrbios não transmissíveis, explicando a relação existente entre fatores nutricionais e ambientais precoces que atuam nos períodos pré-concepcional, pré natal e primeira infância e o desenvolvimento de saúde e doença mais tarde.<sup>2, 20,</sup>

21

## Objetivos

Pretende-se demonstrar através desta revisão bibliográfica, os benefícios do LM na modulação da expressão génica, resultando numa melhor programação metabólica a curto e longo prazo.

## Material e Métodos

A metodologia usada consistiu na revisão de literatura existente sobre os benefícios do LM na modulação da expressão génica. Nesse sentido, efetuou-se pesquisa no motor de busca “Pubmed-Medline”, com as seguintes palavras-chave: “*breast milk*”; “*methylation DNA*”; “*epigenetic*”; “*DOHaD (development origins of health and disease)*”; “*programming health benefits*”; “*determinants in healthy*”; “*breastfeeding*”; “*benefits of Breast Feeding*”, para trabalhos

publicados de 2008 a 2018 na língua inglesa e portuguesa, realizados em humanos e animais, incluindo artigos científicos de investigação, revisão e meta-análise. Após a aplicação dos filtros foram selecionados os mais relevantes para a redação desta revisão bibliográfica de acordo com o título e resumo.

## **I. Programação metabólica – mecanismos epigenéticos**

De acordo com Charles Darwin, o fenómeno de seleção natural tem um papel central na evolução das espécies, garantindo a preservação dos melhores alelos de ADN ao longo das gerações. No entanto, a expressão desses alelos pode depender de estímulos ambientais que podem moldar amplamente essa expressão génica através de mecanismos epigenéticos, que ocorrem sem efetuar mudanças na sequência de ADN.<sup>5</sup>

O conceito de programação metabólica foi introduzido há 40 anos, por Dörner<sup>19</sup>, descrevendo que eventos metabólicos existentes nos períodos pré-natal e pós-natal desempenhavam um efeito modulador na saúde do adulto<sup>22</sup>, ao deixar uma “marca” no organismo.<sup>2, 20, 21</sup> Noutras palavras, quando o feto ou o lactente é sujeito a um desafio externo, as adaptações fisiológicas que ocorrem, para garantir a sobrevivência, podem deixar memória dessa exposição, tendo em conta a plasticidade das células e dos tecidos. Na maioria das células, a plasticidade é uma característica de curta duração, possível nos estadios embrionário e fetal, porém noutros tipos celulares, a capacidade adaptativa permanece presente ao longo da vida, como acontece no sistema imunitário humano<sup>23</sup>. Mais tarde, essa “marca” seria o efeito de mecanismos epigenéticos que teriam um papel crucial na programação do risco metabólico e de outros distúrbios não transmissíveis, no contexto do DOHaD, estabelecendo-se uma relação entre as condições nutricionais e ambientais da gravidez e da primeira infância e o desenvolvimento de saúde e doença mais tarde (figura 1).<sup>2, 5, 20, 21</sup> Esse risco de doenças não transmissíveis (DNTs) aumenta ao longo da vida, resultado da incapacidade progressiva de plasticidade das células e tecidos. Assim, apesar das DNTs serem expressas essencialmente na vida adulta, a sua predisposição é influenciada pela dieta e composição corporal da mãe antes e durante a gravidez, pela nutrição fetal e do lactente. Por isso, intervenções oportunas nas primeiras fases da vida podem ter um efeito benéfico no risco de doença mais tarde, com impacto nas gerações seguintes, enquanto que intervenções em fases mais tardias apenas pode ser esperada uma relevância marginal.<sup>2</sup> (figura 2)

Callinan e Feinberg definiram epigenética como o estudo das modificações herdadas de expressão génica, que englobam dois tipos mais estudados, a metilação do ADN e a modificação pós-traducional de histonas<sup>3</sup>:

- A metilação do ADN, resulta da adição de um grupo metilo (–CH<sub>3</sub>) na posição 5' de uma base de citosina, no dinucleotídeos citosina-guanina (CpG). <sup>20</sup> A metilação de dinucleotídeos CpG, impede a transcrição do gene pela ARN polimerase ao tornar a cromatina numa estrutura fechada e silenciada para transcrição (gene inativo) (figura 3). <sup>4</sup>
- A modificação pós-traducional das histonas, permite controlar o acesso dos fatores de transcrição (TFs) à sequência de ADN, regulando assim a taxa de transcrição para ARN mensageiro (*mARN*). A cromatina ativa é estruturalmente aberta devido à presença de grupos acetilo (Ac). Desta forma facilmente os fatores de transcrição (*TFs*) iniciam a transcrição e criam *mARN* e consequente proteína. Pelo contrário, na cromatina inativa há desacetilação da histona, que diminui a ligação dos fatores de transcrição inibindo o processo. <sup>3</sup> Também se acredita que a presença de microARNs estejam envolvidos na regulação da expressão génica ao nível pós-transcricional, ao inibir a tradução do *mARN* (figura 4)<sup>20</sup>.

Estes mecanismos poderão ser os processos através dos quais a exposição nutricional pré-natal poderá alterar a capacidade metabólica de um tecido.<sup>4</sup>

## II. Programação metabólica durante o desenvolvimento fetal

Durante a gestação, ocorrem importantes alterações metabólicas, no sentido de responder às necessidades energéticas feto-maternas<sup>24</sup>, em que a resposta fetal aos estímulos maternos induz vários fenótipos a partir de um genótipo.<sup>4</sup> Entre esses fatores maternos, destaca-se o IMC elevado, o diagnóstico de diabetes gestacional e pré-eclâmpsia, a composição da dieta e tabagismo durante a gravidez. <sup>24</sup>

Entre os estudos de base populacional sobre DOHaD, os mais amplamente documentados e bem estudados abordam a fome holandesa no inverno de 1944-1945. Ao contrário de outras fomes esta ocorreu durante um período muito curto e bem definido.<sup>5</sup> Nesse inverno, no oeste da Holanda a *Axis alliance* bloqueou todos os comboios de alimentos; grande parte da população ingeria 500 a 1000 kcal/dia, resultando na morte de mais de 18.000 mulheres e crianças. Apesar da pobreza significativa e das enormes dificuldades, os registos médicos foram preservados, existindo informações sobre a periconcepção, peso materno no início e final da gestação, nutrição e peso fetal ao nascer. Estudos de acompanhamento de crianças nascidas durante este período

forneceram evidências claras de que a desnutrição materna durante a fase crítica do desenvolvimento se associou ao desenvolvimento de níveis elevados de colesterol e triglicerídeos, intolerância à glicose, maior índice de massa corporal e maior risco de doença coronária na 3ª – 4ª década de vida.<sup>5, 23</sup>

### **III. Programação metabólica durante a infância – Papel do leite materno**

A amamentação tem benefícios bem estabelecidos a curto prazo na saúde, e há evidência crescente de que também tem efeitos na saúde a longo prazo.<sup>20</sup>

Como dito anteriormente, o ambiente nutricional durante os estádios iniciais de desenvolvimento pode afetar a suscetibilidade a certas doenças na idade adulta na dependência de mecanismos epigenéticos. Tem sido proposta uma ligação plausível e direta entre alguns componentes do LM e a modulação epigenética.<sup>25, 26</sup>

Assim, estudos em animais mostraram que mudanças na nutrição perinatal podem induzir modificações epigenéticas, afetando o peso corporal e o balanço energético. Para exemplificar, estudos realizados em ratos por *Plagemann et al.* revelaram que a exposição precoce a excesso calórico originava hiperglicemia precoce, acumulação rápido de gordura e obesidade. A leptina e a insulina desempenham um papel fundamental na regulação do apetite e de peso corporal, através da estimulação do gene POMC e pela inibição do neuropeptídeo Y (NPY) – indutor do apetite. A alimentação precoce excessiva leva à desregulação permanente desses circuitos, através de fenómenos de metilação, originando resistência à leptina e insulina, com consequente aumento do consumo alimentar e excesso de peso.<sup>27</sup> Sendo que o LM contém leptina, estudos realizados não só em animais mas também em humanos, associaram o papel relevante da ingestão de leptina, durante o período pós-natal, e a programação da saúde metabólica a longo prazo. Animais sujeitos a ingestão de leptina oral, 5 vezes superior à quantidade média recebida diariamente no LM, demonstraram maior resistência ao excesso de peso, obesidade e alterações metabólicas.<sup>28, 29</sup> A mesma relação foi verificada em diversos estudos em humanos, demonstrando uma relação inversa entre a concentração de leptina no LM e o ganho de peso corporal<sup>30</sup>.

Assim, sugere-se que a ingestão de LM poderá contribuir para programar um fenótipo saudável mais tarde na vida, ao diminuir a existência de fenómenos de metilação no promotor de genes relacionados com o balanço de energia (ex: POMC).<sup>26</sup>

Também o facto, do LM conter ARNs longos não codificadores e pequenos ARNs não-codificadores chamados microARNs, envolvidos na regulação génica pós-transcricional, sugerem que os efeitos epigenéticos do LM não estão restringidos à metilação do ADN.<sup>20</sup>

#### **IV. Leite materno - Benefícios para a saúde a curto e longo prazo**

Evidência científica que apoie os benefícios da AM não é fácil de obter por não ser ético fazer randomização. No entanto, o estudo prospetivo PROBIT - The Promotion of Breastfeeding Intervention Trial, foi desenhado nesse sentido. O estudo envolveu 31 maternidades Bielorrussas, 16 das quais foram selecionados aleatoriamente para campanhas de promoção do AM com base na *BFHI* da OMS / UNICEF<sup>19, 31-33</sup>, enquanto as restantes 15 continuaram com as mesmas práticas de amamentação existentes. No total, foram recrutadas 17.046 mães e respetivos lactentes. Destes, 97% foram seguidos a intervalos regulares até aos 12 meses de idade, registando informação sobre alimentação infantil, infeções gastrointestinais, respiratórias e erupções cutâneas. As crianças PROBIT (n=13879 (81%)) foram examinadas quanto ao comprimento, peso, gordura corporal, pressão arterial, comportamento, saúde oral, quociente de inteligência (QI), asma e alergia aos 6,5 anos e aos 11,5 anos.<sup>31</sup> Os resultados revelaram que a intervenção da BFHI aumentou a duração e grau (exclusividade) da amamentação e diminuiu o risco de infeção do trato gastrointestinal e eczema atópico no primeiro ano de vida, fornecendo uma base científica com robustez estatística.<sup>32</sup>

Nesta revisão bibliográfica serão abordados os principais efeitos do AM na saúde, com base essencialmente em meta análises como as da *Agency for Healthcare Research and Quality* (AHRQ) a qual se focou exclusivamente no contexto dos países desenvolvidos e a realizada pela OMS que se focou numa visão mais holística<sup>14</sup>; também foram consideradas as posições tomadas pela *ESPGHAN Committee on Nutrition* e da Academia Americana de Pediatria (AAP).<sup>18</sup>

#### **1- Infeções**

Um importante benefício do AM é a redução das taxas de infeção<sup>18</sup> nos lactentes dos países desenvolvidos<sup>14</sup>, mas é sobretudo nos países em desenvolvimento que os resultados são mais evidentes.<sup>33</sup> Descrito como o “veículo de comunicação” entre o sistema imunitário materno e do lactente<sup>34</sup>, o LM permite a partilha de fatores bioativos, como imunoglobulinas, linfócitos,

neutrófilos, citocinas e outros compostos anti-inflamatórios.<sup>34, 35</sup> Estes fatores influenciam o estado imunológico ao fornecer proteção e ao promover o seu melhor desenvolvimento e maturação.<sup>33</sup>

Para a AAP, o AM, de duração não definida, reduz o risco de gastroenterite em 64% e de otite média em 23%.<sup>36</sup> Para uma amamentação exclusiva por mais de três ou seis meses, registra-se a diminuição de risco superior a 50% - para otite média, enquanto que o aleitamento exclusivo por mais de 6 meses diminui o risco de infecção do trato respiratório superior em 63%.<sup>18, 36</sup>

O estudo PROBIT confirmou a importância da amamentação na proteção contra a infecção gastrointestinal, contudo as taxas de infecção respiratória não diferiram entre crianças amamentadas exclusivamente por três ou seis meses.<sup>33, 37</sup>

A meta-análise da AHRQ demonstra efeitos protetores significativos para infecções gastrointestinais, otites médias agudas e infecções respiratórias graves. Em relação ao risco de infecções gastrointestinais, AHRQ reportou uma diminuição de 64% do risco no primeiro ano de vida, baseando-se nos resultados de 16 estudos. Evidência forte e consensual foi também encontrada para a otite média, com redução de 23% do risco na população de lactentes que alguma vez foi amamentada (dois estudos de coorte), e redução de 50% quando esta dura pelo menos três meses (três estudos coorte). Os resultados apontam, assim, para uma proteção proporcional ao tempo de amamentação. Já no que respeita às infecções respiratórias, foi encontrado efeito protetor em relação à sua gravidade. A AHRQ inclui uma meta análise de boa qualidade de sete estudos que mostraram uma redução de 72% (95% IC 46-86%) do risco de hospitalização por doenças do aparelho respiratório inferior no primeiro ano de vida, para uma duração de amamentação exclusiva de pelo menos quatro meses.<sup>14, 19</sup>

## **2- Doença alérgica**

O período neonatal é um período de maturação imunológica e o LM desempenha um papel importante nesse desenvolvimento através dos seus fatores imunoativos nomeadamente os oligossacarídeos e ácidos gordos poliinsaturados de cadeia longa. Um estudo inglês avaliou o efeito da alimentação sobre as manifestações alérgicas no período pós-natal aos 18 meses e não encontrou diferença na incidência de reações alérgicas entre os grupos alimentados com LM ou fórmulas industriais; no entanto, entre os prematuros, a fórmula industrial aumentou o risco de desenvolver uma ou mais manifestações alérgicas, nomeadamente o eczema.<sup>7</sup>

Segundo a AHRQ, existe efeito protetor transitório do LM em relação ao risco de dermatite atópica, com redução de 42% da incidência em lactentes de alto risco (familiar de primeiro grau com doença atópica confirmada), sem diferenças estatisticamente significativas para indivíduos

sem história familiar. O efeito protetor é mais acentuado nos primeiros dois anos de idade, perdendo significado estatístico daí em diante.<sup>14</sup>

Em relação à asma, foi encontrada uma redução de 27% da incidência nos indivíduos sem história familiar, alimentados com LM durante pelo menos três meses. Para os indivíduos com história familiar, os autores salientam a existência de um estudo contraditório, metodologicamente com uma grande heterogeneidade intrínseca, que enfraquece o significado estatístico de uma tendência notória de efeito protetor de 40%.<sup>14, 38</sup> A AAP revelou resultados semelhantes com redução de 27% da incidência de asma clínica, dermatite atópica e eczema na população de baixo risco e até 42% em lactentes com história familiar positiva. No entanto, a meta-análise da OMS não encontrou nenhum efeito.<sup>18</sup>

No estudo PROBIT, a dermatite atópica ocorreu em 3,3% das crianças do grupo sujeito a amamentação exclusiva contra 6,3% do grupo controle no primeiro ano de vida. No entanto, um acompanhamento dessas crianças até aos 6,5 anos de idade não encontrou qualquer diferença no risco de alergia ou testes cutâneos positivos entre o grupo experimental e o grupo controle<sup>18</sup>.

A patogênese das doenças imunomediadas, como a doença alérgica, têm na sua gênese defeitos na indução de tolerância. Alguns mecanismos têm sido associados à amamentação no sentido de indução de tolerância pela presença de antígenos e fatores tolerogênicos<sup>33</sup>. Recentemente, o fator de crescimento  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) do leite humano tem sido indicado como uma citocina imunorreguladora, particularmente relevante na prevenção de alergia<sup>7, 39, 40</sup>.

### **3- Neurodesenvolvimento**

O crescimento cerebral é exponencial no primeiro ano de vida no seguimento do seu crescimento ainda maior na vida pré-natal. Um comprometimento desse crescimento prediz um desempenho cognitivo deficitário.<sup>41</sup> Tem surgido um interesse crescente na tentativa de compreender a influência da alimentação infantil, em particular da amamentação, no desenvolvimento cognitivo.<sup>42</sup> Acredita-se que é determinante a influência do fornecimento de ácidos gordos poli insaturados de cadeia longa, encontrados em altas concentrações no cérebro e no LM, bem como outros dos seus constituintes bioativos, como os nucleotídeos.<sup>33, 42</sup>

Nos países desenvolvidos, recém-nascidos amamentados nos primeiros meses de vida tiveram melhor desempenho em testes de função cognitiva.<sup>33</sup> Em 2008, dados do estudo PROBIT, mostraram que o grupo de intervenção apresentava uma diferença de 5,9 pontos de QI, aos 6,5 anos de idade. Demonstrou-se um impacto social positivo entre os adultos amamentados com LM bem como redução da prevalência de adultos com baixo QI<sup>33</sup>. Na coorte ALSPAC (Reino Unido) e

noutro coorte do Brasil, comparou-se a amamentação e o desempenho cognitivo, sendo que em ambos as coortes, houve uma associação positiva entre a duração da amamentação e o QI<sup>33, 43</sup>.

Numa meta análise desenvolvida por *Anderson et al.* que compara recém-nascidos amamentados com LM *versus* fórmulas infantis, verificou-se um melhor neurodesenvolvimento nos primeiros, demonstrando maior função cognitiva em crianças amamentadas com LM em comparação com crianças alimentadas com fórmula infantil<sup>18</sup>.

Diferenças na estrutura da substância branca e cinzenta do Sistema Nervoso Central (SNC) na adolescência, foram demonstrados entre os que foram amamentados com LM comparativamente aos que foram alimentados com fórmula infantil, nomeadamente maior espessura cortical dos lóbulos parietais superior e inferior.<sup>44</sup> Também a microestrutura da substância branca em crianças saudáveis, de 10 meses a 4 anos de idade amamentadas, tinham em várias regiões do cérebro, um aumento do desenvolvimento da substância branca e correlações positivas entre a microestrutura da substância branca e duração da amamentação<sup>18, 45</sup>.

## **4- Doenças cardiovasculares e metabólicas**

Nos últimos anos têm surgido dados que apontam para um efeito protetor do LM relativamente ao risco de desenvolvimento de doenças de causa vascular em fase mais avançada da vida<sup>14, 33</sup>. A *ESPGHAN Committee on Nutrition* conclui que embora pareça haver benefícios do AM nos níveis pressão arterial e lípidos no sangue mais tarde na vida adulta, até agora não existem estudos sobre a morbidade e mortalidade cardiovascular<sup>19</sup>.

### **4.1- Pressão arterial**

A AHRQ encontrou uma redução média da pressão arterial, de cerca de 1,5 mmHg na pressão arterial sistólica (PAS), e de não mais que 0,5 mmHg na pressão arterial diastólica (PAD), para os adultos que alguma vez foram amamentados, em relação aos que nunca o foram<sup>14</sup>.

Os mecanismos que associam a amamentação aos valores de pressão arterial na vida adulta são desconhecidos, porém acredita-se que componentes bioativos e outros constituintes do LM possam induzir efeito de programação metabólica.<sup>33</sup> Entre estes, os ácidos gordos poli insaturados de cadeia longa (LCPUFA) presentes no LM têm sido relevantes, uma vez que ao serem incorporados nas membranas celulares do endotélio vascular poderão contribuir para a redução da pressão arterial. O mesmo se verificou, que a suplementação dietética com LCPUFA, desde o nascimento até aos 6 meses, se associou a uma redução significativa na pressão arterial média e

diastólica aos 6 anos de vida e com a suplementação de óleo de peixe (rico de LCPUFA), entre os 9 aos 12 meses de idade, a PAD aos 12 meses foi 6,3 mmHg menor entre os seus consumidores<sup>19</sup>.

No estudo PROBIT apesar de uma maior duração da amamentação exclusiva, não houve diferenças na PAS ou PAD entre as crianças dos grupos intervenção e controlo, em seguimento até aos 6,5 anos<sup>19, 33</sup>. Embora não haja consenso sobre se a ingestão de sódio durante a infância influencia a pressão arterial mais tarde, é possível que o baixo teor de sódio do LM possa ter um papel na redução da pressão arterial<sup>19</sup>.

No coorte ALSPAC embora exista uma associação inversa entre o tempo de amamentação e a PAS nas crianças do Reino Unido, o mesmo não foi evidente em crianças brasileiras<sup>33</sup>.

## **4.2 - Perfil lipídico**

Uma meta-análise de 37 estudos demonstraram que o colesterol total (CT) sérico varia com a idade, sendo que as suas concentrações foram mais elevadas em lactentes amamentados do que nos alimentados com fórmula infantil, com menos de um ano de idade, possivelmente devido ao conteúdo marcadamente mais alto de colesterol no LM do que na maioria das fórmulas comercialmente disponíveis.<sup>19</sup> Os adolescentes, com idades entre os 13 a 16 anos, que receberam LM exclusivo, revelaram um perfil lipídico mais favorável, com diminuição do *ratio* entre a lipoproteína de baixa densidade e alta densidade (LDL/HDL) comparativamente aos alimentados com fórmula.<sup>7, 33</sup> Tem sido proposto que a exposição precoce ao elevado teor de colesterol do LM desempenhe efeitos de programação sobre a síntese de colesterol endógeno, por regulação da atividade hepática HMG-CoA redutase ou da atividade do recetor de LDL, levando a diferenças evidentes na síntese de colesterol mais tarde.<sup>19, 33</sup>

A meta-análise da OMS também foi concordante com estes resultados, ao encontrar uma pequena redução dos níveis de colesterol de 6,9 mmol/dl na idade adulta entre os amamentados.<sup>14, 19</sup> A AHRQ encontrou resultados semelhantes, com dados que apontam para colesterol mais elevado na infância e mais baixo na idade adulta nos indivíduos amamentados, mas considerou não existir ainda evidência suficiente.<sup>14</sup>

## **4.3 - Diabetes *Mellitus* tipo 2**

Estudos observacionais de Owen em 2006 mostraram uma associação inversa entre amamentação e o risco de *diabetes mellitus* tipo 2 mais tarde.<sup>46</sup> Principalmente nos países desenvolvidos a amamentação foi associada a uma redução substancial do risco, com concentrações de insulina em jejum ligeiramente mais baixas na vida adulta. Essa diminuição do

risco pode ser explicada, mais uma vez, pelos componentes bioativos do LM<sup>47</sup> ou pelo conteúdo de LCPUFA. A amamentação com LM associou-se a níveis mais elevados de LCPUFA nas membranas do músculo esquelético, que por sua vez demonstraram estar associadas a menor teor de glicose plasmática em jejum.<sup>33, 48</sup> Neste mesmo estudo nos países em desenvolvimento não houve associação entre amamentação ou duração da amamentação na concentração de glicose plasmática ou risco de diabetes tipo 2. Porém em contraste, novos dados de um estudo de seguimento, em países em desenvolvimento, de crianças de nove anos de idade mostram que a maior duração da amamentação na infância se associa a menores concentrações de glicose plasmática às 2 h no teste de tolerância à glicose, indicando efeitos protetores da amamentação.

33, 49

#### **4.4 – Obesidade**

A associação entre obesidade e LM também tem sido amplamente estudada. 14 Estudos epidemiológicos demonstraram que em crianças e adultos amamentados, o risco de obesidade é menor. Assim, a infância, como período crítico, possivelmente na programação da adipogênese, tornou-se foco de interesse da saúde pública para a prevenção da obesidade.<sup>33</sup>

Acredita-se que o desenvolvimento da obesidade é influenciado pelo tipo de alimentação no início da vida. Os lactentes alimentados com fórmulas infantis, tem um perfil de crescimento diferente dos amamentados, com ganho ponderal mais acelerado após os quatro meses. Pelo contrário, a amamentação caracteriza-se por um ganho ponderal acelerado até aos quatro meses que posteriormente se torna mais lento no final do primeiro ano de vida.<sup>50</sup>

Vários fatores associados ao LM poderão contribuir para o efeito protetor do desenvolvimento da obesidade, entre eles, o controlo da quantidade de leite ingerida, garantindo a auto-regulação da ingestão energética, o menor teor proteico do LM comparativamente às fórmulas infantis<sup>1, 33</sup>, a existência de componentes bioativos no LM, com efeitos de programação metabólica como a exposição precoce à leptina e adiponectina, as quais parecem estar envolvidas na definição de respostas endócrinas à alimentação e regulação do apetite.<sup>1, 33</sup> A leptina, produzida no tecido adiposo, em conjunto com a insulina, têm a função de reduzir a ingestão alimentar e aumentar o gasto energético, através da estimulação do gene POMC e inibição do neuropéptido Y (NPY), importante indutor do apetite. A ingestão calórica excessiva e sustentada parece gerar uma desregulação permanente destes circuitos por fenómenos de metilação, culminado na resistência à leptina e insulina e consequente aumento do consumo alimentar e do excesso de peso.<sup>27</sup>

O surgimento da "The Early Protein Hypothesis" (figura 5) defende que a ingestão proteica elevada na infância aumenta as concentrações plasmáticas e tecidulares de aminoácidos, os quais estimulam a secreção de fatores de crescimento como a insulina-like growth factor-1 (IGF-1) e insulina. Assim, o ganho de peso nos primeiros meses de vida, parece aumentar a atividade adipogénica e portanto, o risco a longo prazo do desenvolvimento da obesidade e de doenças não transmissíveis associadas, como a *diabetes mellitus* tipo 2. Esta hipótese foi testada pelo Childhood Obesity Project (CHOP) realizado pela União Europeia, onde se concluiu que a maior ingestão proteica induziu aumento significativo do peso, comprimento e índice de massa corporal (IMC) na primeira infância. Aos 6 anos de idade, as crianças amamentadas tinham uma redução do IMC estatisticamente significativo relativamente às alimentadas com fórmula infantil com elevado teor proteico. Contrariamente, os lactentes que receberam fórmula de teor proteico reduzido, mas conteúdo energético semelhante, no primeiro ano de vida, alcançaram um IMC significativamente menor aos do grupo que usou fórmula com elevado teor proteico e semelhante aos do grupo amamentado. Assim, o menor aporte de proteína na infância parece reduzir o risco de obesidade na idade escolar precoce.<sup>1, 51</sup>

Também o consumo excessivo de proteínas aumenta a concentração plasmática de aminoácidos de cadeia ramificada como a leucina, isoleucina e valina, aminoácidos relacionados com maior ganho ponderal por aumento da secreção de insulina e fator de crescimento IGF-1, os quais ativam a via do mTOR, responsável pela modelação da resposta metabólica.<sup>1</sup> Assim, as fórmulas infantis poderão ser melhoradas no sentido de redução do seu teor proteico, aspirando a um melhor controlo metabólico.<sup>1</sup>

Tanto a AHRQ como a OMS são concordantes nos resultados. Existe evidente diminuição do risco de obesidade nos adolescentes e adultos que alguma vez foram amamentados, na ordem dos 7 a 24%. Adicionalmente, foi demonstrada uma relação proporcional entre esta diminuição e a duração do AM até aos nove meses, sendo que a cada mês adicionado se associa a uma diminuição de 4% no risco<sup>14</sup>. No mesmo sentido a Academia Americana de Pediatria refere a redução de 15–30% nas taxas de obesidade, entre adolescentes e adultos, se qualquer período de amamentação ocorreu na infância, comparativamente à ausência de amamentação.<sup>18</sup>

George Moschonis *et al.* analisaram dados, estatisticamente significativos, de quatro coortes de países europeus (ALSPAC-UK, EDEN-France, EuroPrevall-Greece e Generation XXI-Portugal), para os quais não encontraram associação consistente entre a duração da amamentação e a percentagem de massa gordura em pré-escolares. Os autores salientam que estes resultados poderão ter sofrido enviesamento por numerosos fatores confundidores heterogêneos que não foram possíveis de anular, não permitindo obter uma conclusão consistente. No entanto, em

futuros estudos prospetivos estes vieses poderão ser ultrapassados, para assim se provar este efeito protetor do LM. <sup>50</sup>

Ainda o sistema cardiovascular pode ser afetado pela obesidade ao gerar um aumento do trabalho cardíaco e consumo de oxigénio, conduzindo a hipertrofia cardíaca a longo prazo. <sup>6</sup> Assim, o excesso de ingestão proteica durante o primeiro ano de vida, que se associa a um maior IMC e ao aumento dos parâmetros cardíacos (fração de ejeção e fração de encurtamento) aos 2 anos de idade, ainda não é evidente nas alterações na massa cardíaca, neste estadio inicial do desenvolvimento da criança. No entanto, o eixo do IGF-1 pode, em parte, mediar esses efeitos por uma via indireta que induz alterações na massa corporal, a qual gera uma resposta adrenérgica pelo sistema simpático aumentando o débito cardíaco numa fase precoce e levando a hipertrofia cardíaca mais tarde (figura 6). <sup>6</sup>

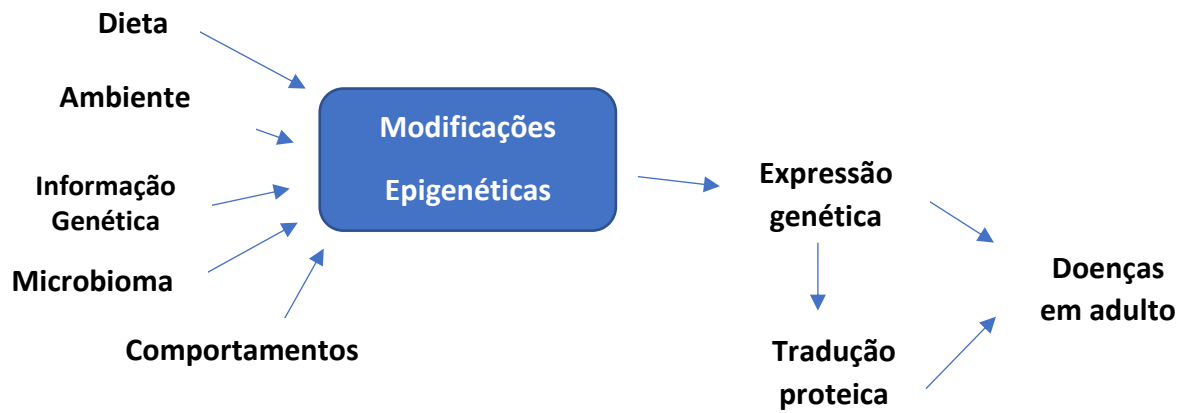
## **v. Conclusão**

Nesta revisão, através da análise de estudos experimentais e estudos epidemiológicos em humanos, são apresentadas evidências que suportam a influência da prática da amamentação na saúde humana. Para além de vantagens a curto prazo, como o menor risco infeccioso há ainda, cada vez mais evidência de que o LM confere proteção para o desenvolvimento de doenças crónicas mais tarde na vida, como a obesidade, HTA e dislipidemia, e assim a doença cardiovascular. Estes efeitos parecem derivar de programação metabólica precoce, que se encontra na base da teoria das origens do desenvolvimento da saúde e da doença (DOHaD), a qual defende que fenómenos epigenéticos existentes nos períodos pré-natal e pós-natal imediatos desempenham um efeito modulador na expressão génica do indivíduo, estabelecendo-se assim uma relação entre as condições nutricionais e ambientais da gravidez da mãe e primeira infância e o desenvolvimento da saúde e doença mais tarde nos filhos, tendo o LM um papel crucial.

Sendo assim, o reconhecimento de que o estilo de vida e a saúde materna têm implicações na descendência, desde a pré-conceção, reforça a necessidade da educação das mães para a gestão eficaz da promoção da amamentação pelos profissionais de saúde no antes, durante e pós-parto. A iniciativa Hospitais Amigo dos Bebés tem-se revelado uma estratégia de sucesso, aumentando a taxa de amamentação e consequentemente os seus benefícios.

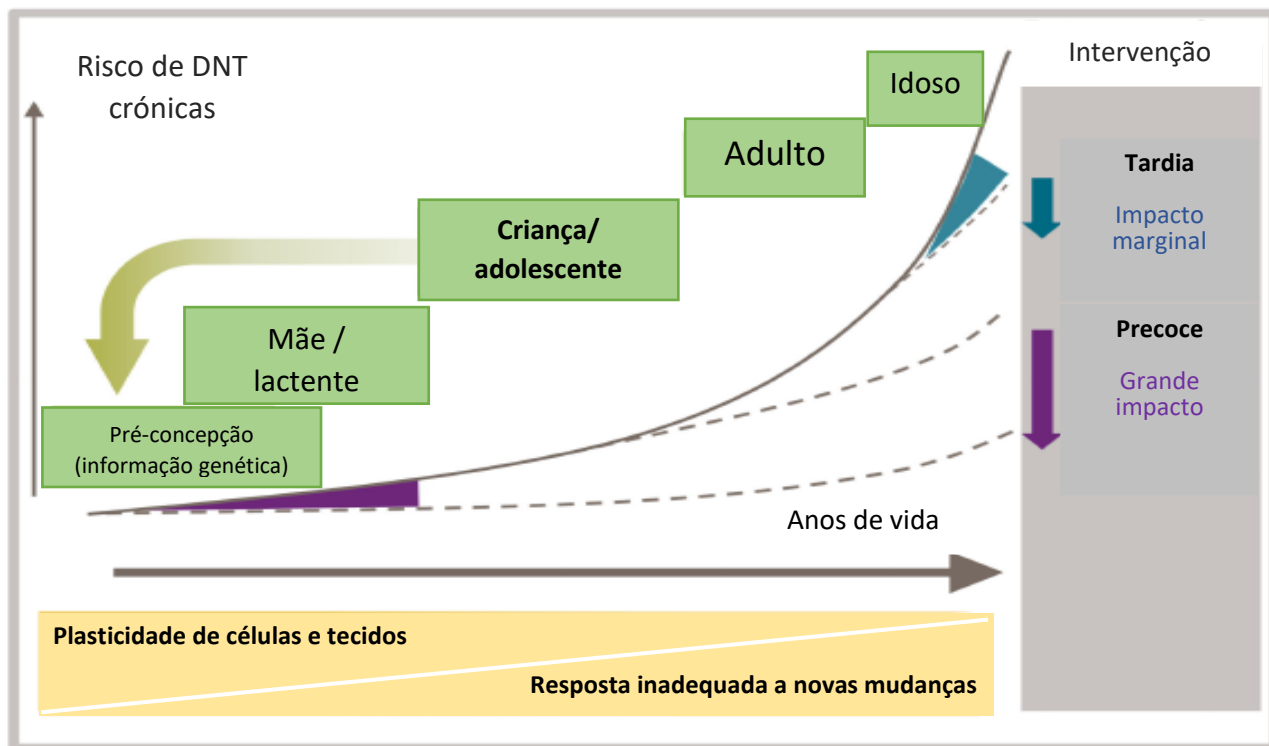
O potencial impacto na saúde pública é enorme, uma vez que auxiliará na luta contra a pandemia da obesidade e DNTs, garantindo a melhoria da qualidade e expectativa de vida das gerações futuras, em Portugal e no mundo.

## vi. Anexos



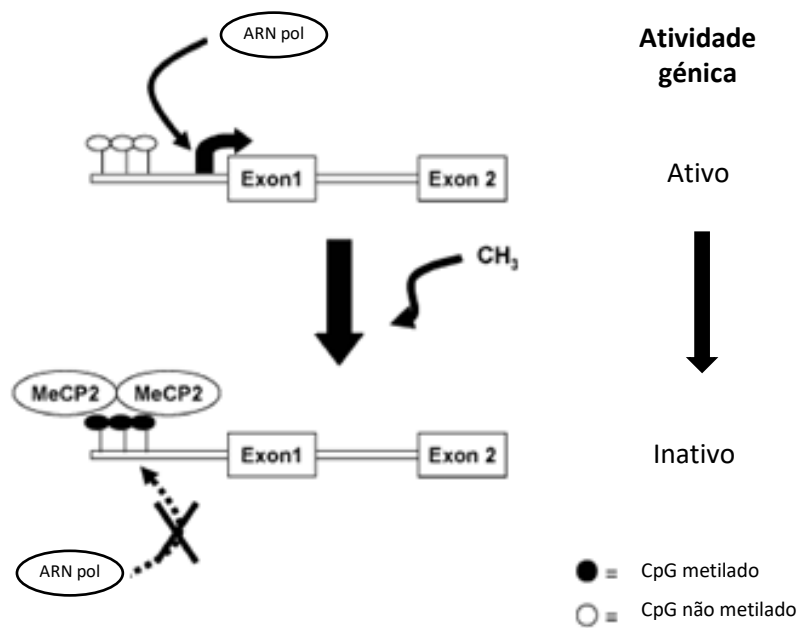
**Figura 1** Visão esquemática das exposições que potenciam modificações epigenéticas e o risco de doença metabólica em adultos.

Adaptado de *Early origins of adult disease: approaches for investigating the programmable epigenome in humans, nonhuman primates and rodents* <sup>5</sup>



**Figura 2** Enquadramento da prevenção e tratamento de doenças não transmissíveis ao longo do ciclo de vida.

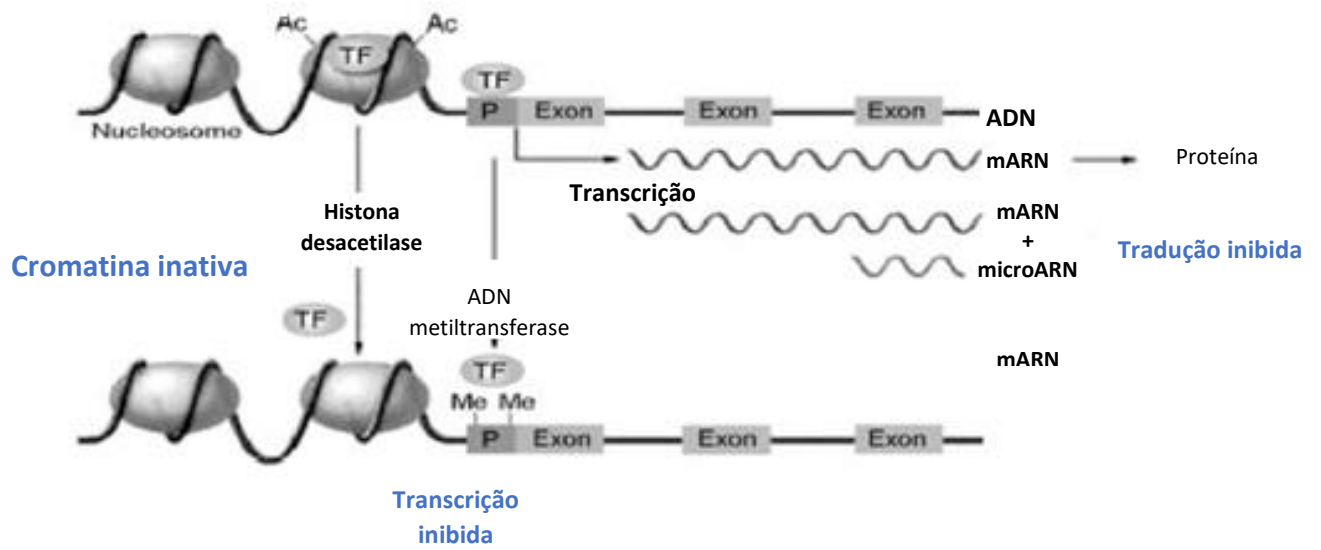
Adaptado de *Development, Epigenetics and Metabolic Programming* <sup>2</sup>



**Figura 3** Regulação da expressão génica por silenciamento de genes pela metilação do ADN

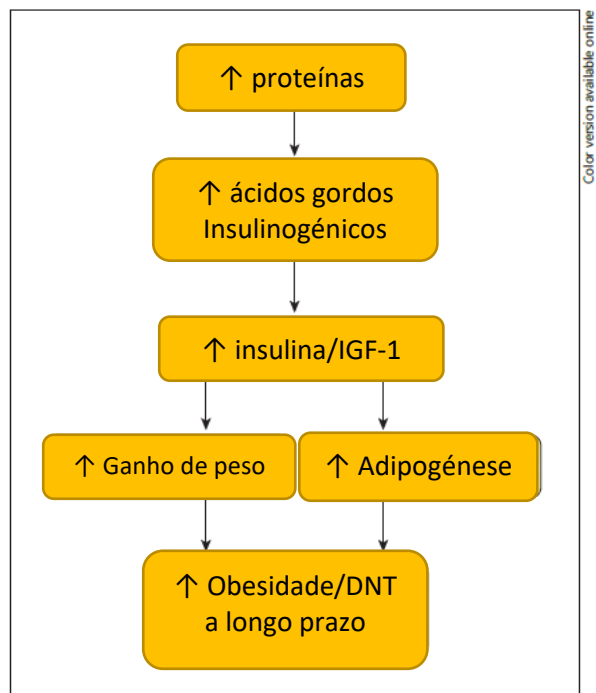
Adaptado de *Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life?* <sup>4</sup>

## Cromatina ativa



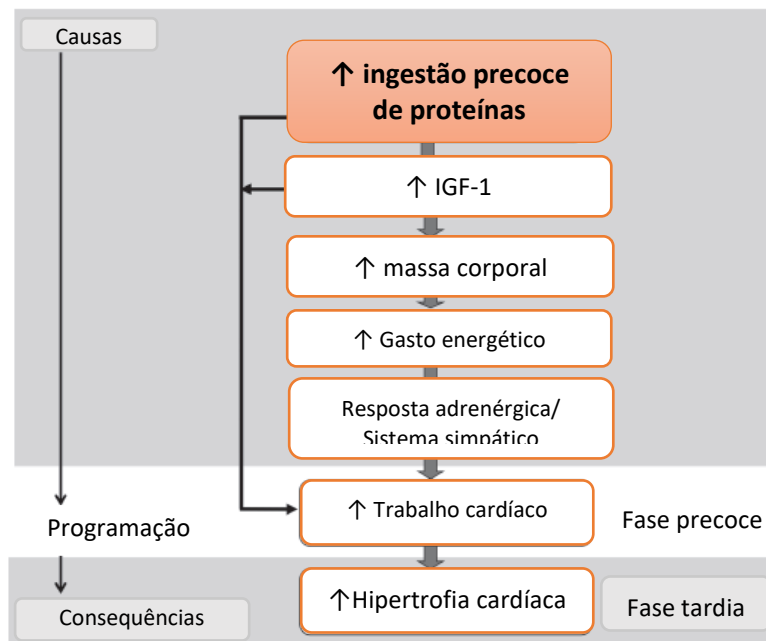
**Figura 4** Regulação da expressão génica por modificação pós-traducional de histonas

Adaptado de *Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms* <sup>3</sup>



**Figura 5** Early Protein Hypothesis

Adaptado de Regulation of early human growth: impact on long-term health. Annals of nutrition & metabolism <sup>1</sup>



**Figura 6** Possíveis "vias de programação" metabólica induzidas por proteínas que influenciam a estrutura e a função do sistema cardiovascular

Adaptado de *Higher protein intake increases cardiac function parameters in healthy children: metabolic programming by infant nutrition-secondary analysis from a clinical trial* <sup>6</sup>

## **vii. Referências Bibliográficas**

1. Koletzko B, Chourdakis M, Grote V, et al. Regulation of early human growth: impact on long-term health. *Annals of nutrition & metabolism*. 2014;65(2-3):101-109.
2. Godfrey KM, Costello PM, Lillycrop KA. Development, Epigenetics and Metabolic Programming. Nestle Nutrition Institute workshop series. 2016;85:71-80.
3. Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, et al. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Seminars in reproductive medicine*. 2009;27(5):358-368.
4. Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, et al. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *The British journal of nutrition*. 2007;97(6):1036-1046.
5. Ganu RS, Harris RA, Collins K, et al. Early origins of adult disease: approaches for investigating the programmable epigenome in humans, nonhuman primates, and rodents. *ILAR journal*. 2012;53(3-4):306-321.
6. Collell R, Closa-Monasterolo R, Ferre N, et al. Higher protein intake increases cardiac function parameters in healthy children: metabolic programming by infant nutrition-secondary analysis from a clinical trial. *Pediatric research*. 2016;79(6):880-888.
7. Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, et al. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;57(4):535-542.
8. Mosca F, Gianni ML. Human milk: composition and health benefits. *La Pediatria medica e chirurgica : Medical and surgical pediatrics*. 2017;39(2):155.
9. Prentice P, Ong KK, Schoemaker MH, et al. Breast milk nutrient content and infancy growth. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2016;105(6):641-647.
10. Haschke F, Haiden N, Thakkar SK. Nutritive and Bioactive Proteins in Breastmilk. *Annals of nutrition & metabolism*. 2016;69 Suppl 2:17-26.
11. Eriksen KG, Christensen SH, Lind MV, et al. Human milk composition and infant growth. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2018;21(3):200-206.
12. Thakkar SK, Giuffrida F, Bertschy E, et al. Protein Evolution of Human Milk. Nestle Nutrition Institute workshop series. 2016;86:77-85.
13. Sarafana S ea. Aleitamento Materno: evolução na última década. *Acta Pediatr Port* 2006;1(37):9-14. 2006.
14. Aguiar H SA, et al. Aleitamento Materno: A Importância de Intervir. *Acta Med Port* 2011; 24: 889-896. 2011.

15. Kislaya I BP, Dias C, Loureiro I. A evolução do aleitamento materno em Portugal nas últimas duas décadas: dados dos Inquéritos Nacionais de Saúde (1995/96–1998/99–2005/06–2014). 2014.
16. Unicef Portugal. Lisboa: A Iniciativa Amiga dos Bebés tem como missão proteger, promover e apoiar o aleitamento materno. Disponível em: <https://www.unicef.pt/o-que-fazemos/o-nosso-trabalho-em-portugal/iniciativa-amiga-dos-bebes/a-iniciativa-amiga-dos-bebes/>. Consultado pela última vez a 29 de abril de 2019.
17. EPACI Portugal 2012. Lisboa. Alimentação e Crescimento nos primeiros anos de vida: a propósito do EPACI Portugal 2012. Disponível em [https://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/activeapp/wp-content/files\\_mf/1445005594EPACI2013.pdf](https://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/activeapp/wp-content/files_mf/1445005594EPACI2013.pdf) Consultado pela última vez a 19 de maio de 2019
18. Shamir R. The Benefits of Breast Feeding. Nestle Nutrition Institute workshop series. 2016;86:67-76.
19. Agostoni C, Braegger C, Decsi T, et al. Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009;49(1):112-125.
20. Hartwig FP, Loret de Mola C, Davies NM, et al. Breastfeeding effects on DNA methylation in the offspring: A systematic literature review. PloS one. 2017;12(3):e0173070.
21. Bianco-Miotto T, Craig JM, Gasser YP, et al. Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. Journal of developmental origins of health and disease. 2017;8(5):513-519.
22. Koletzko B, Brands B, Demmelmair H. The Early Nutrition Programming Project (EARNEST): 5 y of successful multidisciplinary collaborative research. The American journal of clinical nutrition. 2011;94(6 Suppl):1749s-1753s.
23. Langley-Evans SC. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association. 2015;28 Suppl 1:1-14.
24. Rauschert S, Kirchberg FF, Marchioro L, et al. Early Programming of Obesity Throughout the Life Course: A Metabolomics Perspective. Annals of nutrition & metabolism. 2017;70(3):201-209.
25. Verduci E, Banderali G, Barberi S, et al. Epigenetic effects of human breast milk. Nutrients. 2014;6(4):1711-1724.
26. Palou M, Pico C, Palou A. Leptin as a breast milk component for the prevention of obesity. Nutrition reviews. 2018;76(12):875-892.

27. Plagemann A, Harder T, Brunn M, et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *The Journal of physiology*. 2009;587(Pt 20):4963-4976.
28. Pico C, Oliver P, Sanchez J, et al. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *International journal of obesity* (2005). 2007;31(8):1199-1209.
29. Tobaruela A, Sánchez J, Palou M, et al. Oral Supplementation with Physiological Doses of Leptin During Lactation in Rats Improves Insulin Sensitivity and Affects Food Preferences Later in Life. *Endocrinology*. 2008;149(2):733-740.
30. Miralles O, Sanchez J, Palou A, et al. A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. *Obesity* (Silver Spring, Md). 2006;14(8):1371-1377.
31. University of Bristol. Bristol: Medical School: Population Health Sciences. Promotion of Breastfeeding Intervention Trial; Disponível em: <http://www.bristol.ac.uk/population-health-sciences/projects/probit/about/> Consultado pela última vez a 6 de maio de 2019.
32. Kramer MS, Chalmers B, Hodnett ED, et al. Promotion of Breastfeeding Intervention Trial (PROBIT): a randomized trial in the Republic of Belarus. *Jama*. 2001;285(4):413-420.
33. Robinson S, Fall C. Infant Nutrition and Later Health: A Review of Current Evidence. *Nutrients*. 2012;4(8):859.
34. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *The Journal of nutrition*. 2005;135(1):1-4.
35. Hamosh M. Bioactive factors in human milk. *Pediatric clinics of North America*. 2001;48(1):69-86.
36. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2012;129(3):e827-841.
37. Kramer MS, Guo T, Platt RW, et al. Infant growth and health outcomes associated with 3 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding. *The American journal of clinical nutrition*. 2003;78(2):291-295.
38. Ip S, Chung M, Raman G, et al. A summary of the Agency for Healthcare Research and Quality's evidence report on breastfeeding in developed countries. *Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*. 2009;4 Suppl 1:S17-30.
39. Penttilä IA. Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response. *The Journal of pediatrics*. 2010;156(2 Suppl):S21-25.
40. Verhasselt V, Milcent V, Cazareth J, et al. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nature medicine*. 2008;14(2):170-175.

41. Gale CR, O'Callaghan FJ, Bredow M, et al. The influence of head growth in fetal life, infancy, and childhood on intelligence at the ages of 4 and 8 years. *Pediatrics*. 2006;118(4):1486-1492.
42. Anderson JW, Johnstone BM, Remley DT. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;70(4):525-535.
43. Brion MJ, Lawlor DA, Matijasevich A, et al. What are the causal effects of breastfeeding on IQ, obesity and blood pressure? Evidence from comparing high-income with middle-income cohorts. *International journal of epidemiology*. 2011;40(3):670-680.
44. Kafouri S, Kramer M, Leonard G, et al. Breastfeeding and brain structure in adolescence. *International journal of epidemiology*. 2013;42(1):150-159.
45. Deoni SC, Dean DC, 3rd, Piryatinsky I, et al. Breastfeeding and early white matter development: A cross-sectional study. *NeuroImage*. 2013;82:77-86.
46. Owen CG, Martin RM, Whincup PH, et al. Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(5):1043-1054.
47. Das UN. Breastfeeding prevents type 2 diabetes mellitus: but, how and why? *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(5):1436-1437.
48. Baur LA, O'Connor J, Pan DA, et al. The fatty acid composition of skeletal muscle membrane phospholipid: Its relationship with the type of feeding and plasma glucose levels in young children. *Metabolism - Clinical and Experimental*. 1998;47(1):106-112.
49. Veena SR, Krishnaveni GV, Wills AK, et al. Glucose tolerance and insulin resistance in Indian children: relationship to infant feeding pattern. *Diabetologia*. 2011;54(10):2533-2537.
50. Moschonis G, de Lauzon-Guillain B, Jones L, et al. The effect of early feeding practices on growth indices and obesity at preschool children from four European countries and UK schoolchildren and adolescents. *European journal of pediatrics*. 2017;176(9):1181-1192.
51. Brands B, Demmelmair H, Koletzko B. How growth due to infant nutrition influences obesity and later disease risk. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2014;103(6):578-585.