

## NÍVEIS SÉRICOS DO FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO E CITOCINAS E A DURAÇÃO DA AMAMENTAÇÃO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES

### *SERUM LEVELS OF BRAIN-DERIVED NEUOTROPHIC FACTOR AND CYTOKINES AND DURATION OF BREASTFEEDING IN CHILDREN AND ADOLESCENTS*

Juliana Silveira Andrade<sup>1</sup>, Maria Inês de A. Wilasco<sup>2</sup>,  
Cristina Toscani Leal Dornelles<sup>2</sup>, Gabriel Rodrigo Fries<sup>3</sup>,  
Clarissa S. Gama<sup>1</sup>, Adriane R. Rosa<sup>1</sup>

Clin Biomed Res. 2014;34(1):53-59

1 Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Psiquiatria, Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul.  
Laboratório de Psiquiatria Molecular,  
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia  
Translacional em Medicina, Hospital de  
Clínicas – Porto Alegre (RS), Brasil.

2 Programa de Pós-Graduação em Saúde  
da Criança e do Adolescente, UFRGS.

3 Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Bioquímica,  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul – Porto Alegre (RS), Brasil.

#### Autor correspondente:

Juliana Silveira Andrade  
juliana@hypercode.com.br  
Porto Alegre, RS, Brasil

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) é uma importante neurotrofina que está presente no tecido cerebral e periférico. O leite materno é considerado o alimento “padrão ouro” para o desenvolvimento cerebral, tornando o desmame precoce um fator de risco no desenvolvimento infantil.

**OBJETIVO:** Avaliar a concentração de BDNF, IL6, IL10, TNF- $\alpha$  em crianças e correlacionar com a duração da amamentação.

**MÉTODOS:** Trinta e sete crianças foram recrutadas e classificadas de acordo com a duração do aleitamento materno: < 6 meses (desmame precoce) e  $\geq$  6 meses. Foram realizadas duas consultas: a consulta basal em 2007 (T0) e a consulta de seguimento em 2011 (T1). Os níveis séricos de BDNF foram avaliados por ELISA sanduíche e os de citocinas por citometria de fluxo.

**RESULTADOS:** Níveis séricos de BDNF em T0 foram significativamente menores no grupo amamentado por  $\geq$  6 meses ( $p=0,025$ ), sendo que este não teve diferença entre os grupos em T1 ( $p=0,863$ ). Níveis de IL6 apresentaram-se aumentados significativamente em T0 no grupo de desmame precoce ( $p=0,016$ ). O IMC em T1 foi maior no grupo de desmame precoce ( $p=0,007$ ). E em relação aos níveis de IL10 e TNF- $\alpha$  não houve diferenças significativas entre os grupos.

**CONCLUSÃO:** Os resultados deste estudo mostraram semelhanças entre os níveis séricos de BDNF medidos a longo prazo, entre crianças amamentadas por < 6 meses e  $\geq$  6 meses, sugerindo que futuros estudos são necessários, com dosagens durante o período de amamentação para investigar o papel de marcadores neuroquímicos na duração do aleitamento materno e suas implicações no estado nutricional e cognição das crianças amamentadas.

**Palavras-chave:** Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF); aleitamento materno; desmame precoce; citocinas

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** The Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is an important neurotrophin found in the brain and peripheral tissues. Breast milk is considered to be the “gold standard” food for brain development, making early weaning a risk factor in child development.

**AIM:** To evaluate the concentration of BDNF, IL6, IL10, TNF- $\alpha$  in children and its correlation with the duration of breastfeeding.

**METHODS:** Thirty-seven children were recruited and classified according to the duration of breastfeeding: <6 months (early weaning) and  $\geq$  6 months. There were two visits: the baseline interview in 2007 (T0) and the follow-up visit in 2011 (T1). BDNF levels were assayed using a sandwich ELISA, and cytokines were assayed with flow cytometry.

**RESULTS:** Serum BDNF levels at T0 were significantly lower in the group breastfed for  $\geq$  6 months ( $p = 0.025$ ), and they did not differ between groups at T1 ( $p = 0.863$ ). IL-6 levels were significantly increased in the early weaning group at T0 ( $p = 0.016$ ). Body mass index at T1 was higher in the early weaning group ( $p = 0.007$ ). There was no significant difference in IL10 and TNF- $\alpha$  levels between groups.

**CONCLUSION:** The results of this study showed similarities in serum BDNF levels over time between children who had been breastfed <6 months and  $\geq$  6 months. This suggests that further studies, with measurements taken during the breastfeeding period, are needed to investigate the role of neurochemical markers in the duration of breastfeeding and its implications on nutritional status and cognition of breastfed children.

*Keywords:* Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), breastfeeding, early weaning; cytokines.

O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) é uma importante proteína, membro da família das neurotrofinas, e está presente de forma abundante no tecido cerebral e periférico (1). O gene que codifica o BDNF está localizado no braço curto do cromossomo 11, no limite das regiões p13 e p14 e apresenta uma estrutura genômica extremamente complexa (2). As neurotrofinas têm sido descritas como moduladoras da plasticidade sináptica, com papel na neuroproteção e reorganização, atuando como um mecanismo de compensação endógeno para promover regeneração e reparação no sistema nervoso central e periférico (3). Já foi demonstrado que as concentrações dos níveis séricos e cerebrais de BDNF são semelhantes. Mostrando que a dosagem da concentração sérica de BDNF é uma maneira indireta de demonstrar o nível de BDNF no cérebro (4).

A amamentação possui reconhecidos benefícios nutricionais, imunológicos, cognitivos e socioeconômicos (5). A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Associação Dietética Americana preconizam o aleitamento materno exclusivo até os seis meses de idade para um

crescimento saudável e dentro dos padrões de normalidade (6-7). É notório o progresso ocorrido em relação ao aumento do índice de aleitamento materno exclusivo nos primeiros seis meses de vida do lactente, mas estes valores estão ainda bem inferiores aos recomendados pela OMS (8).

Durante a última década, muitos estudos demonstraram associação positiva entre aleitamento materno e um melhor desenvolvimento na infância, adolescência e vida adulta (9,10). As pesquisas fornecem evidências de que o leite materno é o alimento considerado “padrão áureo” para o desenvolvimento do cérebro (11). O pico de crescimento do cérebro humano inicia durante o terceiro trimestre de gestação e continua durante os dois primeiros anos de vida, o que condiz com o período de lactação (12).

O leite materno contém citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ )(13,14). A ingestão de citocinas através do leite humano parece ajudar o desenvolvimento e a maturação de células

imunes em crianças. É provável que as citocinas do leite materno (IL-6 e IL-10) possam contribuir para o desenvolvimento e diferenciação de células produtoras de imunoglobulina A (13).

Além desses benefícios, especula-se que o leite humano também teria um efeito protetor sobre o estado nutricional infantil, atuando na prevenção da obesidade a longo prazo (15). Alguns estudos mostraram uma maior duração do aleitamento materno relacionado com menores taxas de obesidade (16,17).

Com base no exposto, a hipótese deste estudo é de que o BDNF seja um dos possíveis mecanismos de neuroproteção envolvido nos benefícios do aleitamento materno. O objetivo principal é avaliar as concentrações séricas de BDNF em crianças e adolescentes com o passar do tempo e correlacionar com o padrão de aleitamento no período de amamentação. Os objetivos secundários são: analisar a relação entre a duração do aleitamento materno e os níveis de IL6, IL10, TNF- $\alpha$ , e parâmetros antropométricos.

## MÉTODOS

Estudo de coorte, realizado com 114 crianças e adolescentes de 3-15 anos de idade que tinham coleta de sangue programada para realização de pequenos procedimentos cirúrgicos ou revisões de saúde, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (nº 06-458). O cálculo do tamanho da amostra foi feito para um nível de 5% com poder de 90% e coeficiente de correlação mínimo de 0,3 entre desmame precoce e concentração de BDNF, obteve-se um total mínimo de 113 pacientes.

Foram consideradas elegíveis para este estudo crianças eutróficas, hígdas, com coleta de sangue programada e jejum de 3 a 14 horas. Os critérios de exclusão utilizados foram prematuridade, realização de dieta para perda de peso nos últimos 30 dias, processo infeccioso nos últimos sete dias e não assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após quatro anos foi realizada uma nova chamada a estes pacientes, contatados por telefone ou carta. Quarenta e quatro crianças e adolescentes responderam a chamada, porém cinco delas se negaram a realizar a coleta de sangue e duas estavam utilizando medicação. Assim, 37 crianças foram incluídas na nova pesquisa sendo reavaliadas após assinatura de um novo TCLE aprovado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, projeto nº 10-390. Após a segunda consulta, estas crianças foram classificadas de acordo com a duração do aleitamento materno em dois grupos: < 6 meses e  $\geq$  6 meses de aleitamento materno. O tipo de aleitamento materno predominante nos dois grupos foi o misto. A duração do aleitamento materno menor de seis meses é definida pela OMS como desmame precoce (18).

A primeira coleta em 2007 foi denominada coleta basal (T0) e a segunda em 2011, coleta de seguimento (T1).

Avaliação antropométrica foi realizada segundo os padrões da OMS (19). As crianças foram pesadas e medidas sem roupa. Os valores estão apresentados como escores Z de estatura para a relação idade (E/I) e Índice de massa corporal para a idade (IMC/I). Para a avaliação nutricional foi utilizado o *software* Anthro, que contempla crianças até 5 anos de idade, e o programa AnthroPlus para as maiores de 5 anos (20).

Foram coletados 5 mL de sangue venoso de cada participante nas duas consultas. O sangue foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, após o soro foi alíquotado e armazenado a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

A dosagem de BDNF foi realizada por ELISA sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante (Millipore, EUA). As citocinas séricas (IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) foram dosadas por citometria de fluxo seguindo o protocolo do fabricante (BD Biosciences, EUA). Todas as amostras foram dosadas no Laboratório de Psiquiatria Molecular do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em junho de 2012.

O programa utilizado para análise estatística foi o SPSS, versão 18.0 (Chicago, IL). As variáveis contínuas foram expressas como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (percentis 25 e 75), conforme a distribuição apresentada. A normalidade das variáveis foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilks. Para as variáveis categóricas foram utilizadas as frequências absolutas (n) e relativas (%). Para a comparação das variáveis assimétricas foram empregados os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. As variáveis com distribuição normal foram comparadas pelo teste *t* de Student e pela Análise de Variâncias. As associações foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de *p* foi inferior a 0,05.

## RESULTADOS

As características gerais da amostra estão resumidas na Tabela 1. O grupo amamentado por < 6 meses apresentou IMC superior àqueles amamentados por  $\geq 6$  meses na T1 ( $p=0,007$ ). Considerando-se a média dos valores de Z-escore

para IMC/I, observou-se uma tendência de serem maiores no grupo amamentado por < 6 meses na T0 ( $p=0,053$ ); na T1, houve um aumento significativo no grupo amamentado por < 6 meses quando comparado com  $\geq 6$  meses ( $p=0,037$ ). Analisando os grupos separadamente, não houve diferenças

Tabela 1: Característica da Amostra. Porto Alegre (RS), 2012.

	< 6 Meses (n =12 )	$\geq 6$ Meses (n = 25)	Valor p
Gênero			0,487
Masculino	5 (41,70)	15 (60,00)	
Feminino	7 (58,30)	10 (40,00)	
Idade (anos)			
Coleta Inicial	6,09 $\pm$ 3,17	5,92 $\pm$ 3,10	0,877
Coleta Seguimento	9,96 $\pm$ 3,45	9,64 $\pm$ 3,31	0,786
Tempo acompanhamento (anos)	3,87 $\pm$ 0,64	3,72 $\pm$ 0,64	0,508
Grupo racial			1,00
Caucasiano	9 (75,00)	20 (80,00)	
Não Caucasiano	3 (25,00)	5 (20,00)	
*IMC para a idade			
Coleta Seguimento	19,11 $\pm$ 2,39	16,96 $\pm$ 1,72	0,007
Z escore (IMC)			
Coleta inicial	0,35 $\pm$ 0,68	-0,17 $\pm$ 0,76	0,053
Coleta Seguimento	0,84 $\pm$ 1,04	0,15 $\pm$ 0,82	0,037
Repetência escolar	2 (16,70)	5 (20,00)	1,00

IMC: Índice de Massa Corporal; DP: desvio padrão.

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, mediana (P25 - P75) ou número absoluto (%) quando indicado.

Tabela 2: Concentrações de BDNF, IL6, IL10 e TNF- $\alpha$  das crianças e adolescentes amamentados por tempo < 6 meses e  $\geq 6$  meses. Porto Alegre (RS), 2012.

	< 6 Meses (n =12)	$\geq 6$ Meses (n=25)	P
Concentrações de BDNF (nd/mL)			
Coleta Basal*	37,31 $\pm$ 11,15	28,50 $\pm$ 09,05	0,025
Coleta Seguimento*	36,70 $\pm$ 11,09	35,90 $\pm$ 12,11	0,863
Concentrações de IL6 (fg/mL)			
Coleta Basal **	389,87 (3066,72)	180,32 (120,07)	0,016
Coleta Seguimento**	308,60 (230,07)	412,29 (502,51)	0,137
Concentrações de IL10 (fg/mL)			
Coleta Basal **	145,18 (251,66)	223,66 (188,89)	0,107
Coleta Seguimento**	358,77 (324,65)	377,67 (360,01)	0,244
Concentrações de TNF- $\alpha$ (fg/mL)			
Coleta Basal *	180,32 $\pm$ 60,94	2184,08 $\pm$ 02,89	0,431
Coleta Seguimento*	151,04 $\pm$ 31,01	139,08 $\pm$ 40,93	0,635

\* Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

\*\* Os dados foram expressos como mediana e Intervalo interquartil

nas medidas de Z-escore do IMC/I entre a T0 e T1 ( $p=0,170$  e  $p = 0,814$ , nos grupos  $\geq 6$  meses e  $<6$  meses, respectivamente), ou seja, não houve diferença no peso das crianças ao longo de quatro anos.

Os resultados deste estudo mostraram maiores níveis séricos de BDNF nas crianças amamentadas por  $< 6$  meses do que no grupo amamentado por  $\geq 6$  meses na T0. No entanto, esta diferença desapareceu ao longo dos quatro anos de seguimento (Tabela 2). Os níveis de IL-6 na T0 foram significativamente maiores no grupo amamentado por  $< 6$  meses quando comparado ao amamentado por  $\geq 6$  meses (Tabela 2); tal diferença desapareceu com o seguimento. Quanto aos níveis de IL-10 e TNF- $\alpha$  não foram observadas diferenças entre os grupos em ambas as visitas (Tabela 2). O IMC não apresentou correlação com os níveis de BDNF e de citocinas.

## DISCUSSÃO

Os resultados mostraram um aumento dos níveis séricos de BDNF no grupo amamentado por  $< 6$  meses comparado com o grupo amamentado por  $\geq 6$  meses somente na avaliação basal, sendo que com o passar do tempo (T1) os grupos se equipararam. Existem poucos estudos na literatura que avaliam a associação do BDNF com a duração do aleitamento materno. Nassar et al. (21) mostraram que as concentrações de BDNF aumentavam conforme a maior duração do aleitamento materno em uma amostra de crianças de 4-6 meses de idade. Existe heterogeneidade entre o presente estudo e o de Nassar, o que explicaria a divergência de valores, principalmente devido à diferença de idade das amostras, já que o presente estudo foi realizado em crianças com uma média de 6 e 10 anos de idade. Outra diferença entre os estudos é que o estudo de Nassar dosou em crianças que estavam recebendo leite materno no momento da coleta. Cabe salientar que os níveis séricos de BDNF são regulados de uma forma complexa, sendo que outros fatores, associados ao comportamento materno, podem inferir em seus níveis, por exemplo, idade da mãe, atividade física, perfil nutricional, cognição, estresse, entre outros (22,23). Estes fatores poderiam contribuir para a falta de associação entre o BDNF e a duração do aleitamento materno nas crianças e adolescentes estudados.

Os resultados deste estudo mostraram que os níveis séricos de IL-6 estão significativamente

aumentados na coleta basal das crianças amamentadas por  $< 6$  meses. Esse resultado poderia indicar um potencial aumentado para inflamação já que a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória. Alguns autores indicam que os valores de IL-6 aumentam conforme a quantidade de tecido adiposo (24,26), no entanto, não houve associação entre a concentração de IL-6 e IMC entre os grupos. Este resultado pode ser devido ao fato de que a população, na coleta basal, foi constituída, na sua quase totalidade, de crianças eutróficas. Ellingsgaard et al. (27) encontraram correlação direta com o aumento da superfície corporal, e inversa à sensibilidade à insulina. Eles demonstraram que níveis aumentados de IL-6 podem ser um dos mediadores do maior ganho de peso em modelo murino. Levando em consideração que na T1 somente uma criança foi classificada como obesa e 3 como sobrepeso, pode-se justificar a falta de associação entre a concentração de IL-6 e o IMC.

Já foi demonstrado que a IL-10 exerce atividade imunomoduladora e anti-inflamatória, estando presente no leite materno em elevadas concentrações durante as primeiras 80 horas de lactação (28,29). Os resultados deste estudo não encontraram diferença significativa entre os grupos. O aleitamento materno misto difere do aleitamento materno exclusivo, assim como fatores ambientais influenciam na imunidade da criança. Além disso, no momento da coleta as crianças não estavam sendo amamentadas. Todos esses fatores podem ter influenciado a concentração sérica de IL-10.

O TNF- $\alpha$  é reconhecido como um mediador importante em muitos eventos inflamatórios dependentes de citocinas (26,30). Níveis elevados de TNF- $\alpha$  têm sido associados à obesidade, pois o tecido adiposo é o principal local de produção desta citocina, além de ser, junto com a IL-6, um mediador de macrófago, provocando a inflamação do tecido adiposo na obesidade (31). O presente estudo mostrou que o tempo de lactação não alterou o TNF- $\alpha$  entre os grupos. A amostra dosada no período pós-lactação em crianças e adolescentes saudáveis, hígidos e sem uso de medicação explicaria o resultado encontrado, pois estes fatos diminuem o potencial inflamatório.

A duração do aleitamento materno neste estudo foi associada a um menor ganho de peso das crianças e adolescentes. Estes dados são consistentes com dados da literatura que têm demonstrado uma associação entre uma maior duração do aleitamento materno e

menores valores de IMC (16,32,33). Existem várias hipóteses para explicar os benefícios da amamentação na prevenção da obesidade na infância, como a diferença de densidade energética entre o leite materno e fórmulas, maior esforço com conseqüente aumento do gasto energético para mamar no seio e autorregulação interna dos mecanismos fome/saciedade do lactente (32,34). Em suma, o aleitamento materno pode proteger as crianças contra o sobrepeso e a obesidade.

O presente estudo apresenta algumas limitações como o tamanho reduzido da amostra, pois o número de retorno da chamada não foi o esperado; o tempo de amamentação foi descrito pela mãe e não foi “acompanhado” sistematicamente e a não avaliação da cognição ou do neurodesenvolvimento na infância, para melhor explicar e associar as concentrações de BDNF.

Os resultados deste estudo mostraram semelhanças entre os níveis séricos de BDNF

medidos a longo prazo, entre crianças amamentadas por  $\geq 6$  meses, não mostrando efeito em longo prazo nos níveis de BDNF e citocinas inflamatórias. Futuros estudos são necessários, redefinindo o desenho, com uma ampliação da amostra, dosagens de crianças durante o período de amamentação; além de controlar outras variáveis, alimentares e não alimentares que podem interferir na produção de BDNF, para melhor investigar o papel de marcadores neuroquímicos na duração do aleitamento materno e suas implicações no estado nutricional e cognição das crianças amamentadas.

## AGRADECIMENTO

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa Ciência sem Fronteiras do CNPq pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Duffau H. Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications. *J Clin Neurosci*. 2006;13(9):885-97.
- Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*. 2007;90(3):397-406.
- Zhao LY, Ye TH, Zhang YZ, Zhao H. Combination of morphine with low-dose naloxone for intravenous patient-controlled analgesia. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2005;27(2):228-31.
- Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM, Bertschy G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry*. 2005;57(9):1068-72.
- Chaves RG, Lamounier JA, César CC. Factors associated with duration of breastfeeding. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(3):241-6.
- James DC, Lessen R; Association AD. Position of the American Dietetic Association: promoting and supporting breastfeeding. *J Am Diet Assoc*. 2009;109(11):1926-42.
- Horta B, Bahl R, Martines J, Victora C. Evidence on the long-term effects of breastfeeding - Systematic reviews and meta-analyses. WHO: World Health Organization; 2007.
- Campagnolo PDB, Louzada MLdC, Silveira EL, Vítolo MR. Práticas alimentares no primeiro ano de vida e fatores associados em amostra representativa da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev Nutrição*. 2012;25(4):431-9.
- Clark KM, Castillo M, Calatroni A, Walter T, Cayazzo M, Pino P, et al. Breast-feeding and mental and motor development at 51/2 years. *Ambul Pediatr*. 2006;6(2):65-71.
- Morley R, Fewtrell MS, Abbott RA, Stephenson T, MacFadyen U, Lucas A. Neurodevelopment in children born small for gestational age: a randomized trial of nutrient-enriched versus standard formula and comparison with a reference breastfed group. *Pediatrics*. 2004;113(3-1):515-21.
- Dee DL, Li R, Lee LC, Grummer-Strawn LM. Associations between breastfeeding practices and young children's language and motor skill development. *Pediatrics*. 2007;119(Suppl 1):S92-8.
- Viberg H, Mundy W, Eriksson P. Neonatal exposure to decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) results in changes in BDNF, CaMKII and GAP-43, biochemical substrates of neuronal survival, growth, and synaptogenesis. *Neurotoxicology*. 2008;29(1):152-9.

13. Böttcher MF, Jenmalm MC, Björkstén B. Cytokine, chemokine and secretory IgA levels in human milk in relation to atopic disease and IgA production in infants. *Pediatr Allergy Immunol.* 2003;14(1):35-41.
14. Garofalo R. Cytokines in human milk. *J Pediatr.* 2010;156(2 Suppl):S36-40.
15. Nejar FF, Segall-Corrêa AM, Rea MF, Vianna RP, Panigassi G. Breastfeeding patterns and energy adequacy. *Cad Saude Publica.* 2004;20(1):64-71.
16. Balaban G, Silva GA. Protective effect of breastfeeding against childhood obesity. *J Pediatr (Rio J).* 2004;80(1):7-16.
17. Simon VG, Souza JM, Souza SB. Breastfeeding, complementary feeding, overweight and obesity in pre-school children. *Rev Saude Publica.* 2009;43(1):60-9.
18. Organization WH; WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Head Circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization; 2007.
19. Organization WH. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length and body mass index-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization; 2006. p. 76-85.
20. Organization WH. AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. Geneva 2009.
21. Nassar MF, Younis NT, El-Arab SE, Fawzi FA. Neuro-developmental outcome and brain-derived neurotrophic factor level in relation to feeding practice in early infancy. *Matern Child Nutr.* 2011;7(2):188-97.
22. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 2002;25(6):295-301.
23. Chan KL, Tong KY, Yip SP. Relationship of serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and health-related lifestyle in healthy human subjects. *Neurosci Lett.* 2008;447(2-3):124-8.
24. Nemet D, Oren S, Pantanowitz M, Eliakim A. Effects of a multidisciplinary childhood obesity treatment intervention on adipocytokines, inflammatory and growth mediators. *Horm Res Paediatr.* 2013;79(6):325-32.
25. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4196-200.
26. Guimarães DED, Sardinha FLdC, Mizurine DdM, Tavares do Carmo MdG. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. *Revista de nutrição [Internet].* 2007; 20(5):549-59.
27. Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, et al. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med.* 2011;17(11):1481-9.
28. Hawkes JS, Bryan DL, James MJ, Gibson RA. Cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1, and TGF-beta2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months postpartum. *Pediatr Res.* 1999;46(2):194-9.
29. Garofalo R, Chheda S, Mei F, Palkowetz KH, Rudloff HE, Schmalstieg FC, et al. Interleukin-10 in human milk. *Pediatr Res.* 1995;37(4 Pt 1):444-9.
30. Genov IR, Solé D. Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-a) e asma: metanálise é a saída? *Revista Brasileira alerg imunopatol.* 2007;30(1):2-8.
31. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 2008;118(9):2992-3002.
32. Birch LL, Fisher JO. Development of eating behaviors among children and adolescents. *Pediatrics.* 1998;101(3 Pt 2):539-49.
33. Kvaavik E, Tell GS, Klepp KI. Surveys of Norwegian youth indicated that breast feeding reduced subsequent risk of obesity. *J Clin Epidemiol.* 2005;58(8):849-55.
34. Toschke AM, Vignerova J, Lhotska L, Osancova K, Koletzko B, Von Kries R. Overweight and obesity in 6- to 14-year-old Czech children in 1991: protective effect of breast-feeding. *J Pediatr.* 2002;141(6):764-9.

Recebido: 08/12/2013

Aceito: 29/01/2014