

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

Gabriela Datsch Bennemann

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM
FIBROSE CÍSTICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Nutrição, da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Nutrição.
Orientadora: Profª Drª Emilia Addison Machado Moreira

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B469m Bennemann, Gabriela Datsch
Marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em
crianças e adolescentes com fibrose cística [dissertação]
/ Gabriela Datsch Bennemann ; orientadora, Emilia Addison
Machado Moreira. - Florianópolis, SC, 2011.
135 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Nutrição.

Inclui referências e apêndices

1. Nutrição. 2. Fibrose cística. 3. Marcadores biológicos.
4. Inflamação. 5. Estresse Oxidativo. 6. Antioxidantes. 7.
Crianças e adultos. I. Moreira, Emilia Addison Machado. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Nutrição. III. Título.

CDU 612.39

Gabriela Datsch Bennemann

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM
FIBROSE CÍSTICA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Nutrição”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 18 de Fevereiro de 2011

Prof^ª. Dr^ª. Rossana Pacheco da Costa Proença
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Emilia Addison Machado Moreira
Nutrição//UFSC/SC - Presidente

Prof^ª. Dr. Hélio Vannucchi
Clínica Médica/FMUSP/RP - Membro

Prof^ª. Dr. Danilo Wilhelm Filho
Ecologia/Zoologia/UFSC/SC - Membro

Prof^ª. Dr^ª. Sandra Soares Melo
Nutrição/UNIVALE/SC - Membro

Prof^ª. Dr^ª. Elisabeth Wazlawik
Nutrição/UFSC/SC – Membro

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, minha mãe, Guiumar, e meu padrasto Celso, que sempre me estimularam a dar este grande passo. Estas pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais, profissionais corretos e competentes, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

À minha família, amigos, colegas e professores que acreditam na arte de fazer ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

À Deus, pela força e inspiração.

À minha irmã Caroline, pelas vivências de fraternidade e amizade, e aos meus queridos avós Marno, Teresa, Vitória e Benildo, e ao meu pai, Maurício, pelo carinho e apoio, mesmo estando longe, vocês moram sempre no meu coração!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de uma bolsa de estudos, com a qual foi possível dedicação exclusiva ao mestrado.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Emília Addison Machado Moreira, meu muito obrigado pelas contribuições, pelo crescimento, pela atenção, dedicação e conhecimento transmitidos e dedicados a mim durante todo este período.

Aos amigos que estão sempre no meu coração, da minha infância em São João, do Ensino Médio no CEFET em Pato Branco, dos tempos de graduação em Guarapuava e Curitiba, e neste período em Florianópolis, em especial às amigas do mestrado, às amigas e companheiras Ana Cláudia, Suellen e Vanessa, e ao meu namorado, Adriano, pelo carinho e os momentos de alegria compartilhados neste período, pela compreensão nos momentos de ausência, e por serem tão especiais para mim.

Um agradecimento especial às alunas Ana Paula, Juliana, Isabela e Jowanka, e a amiga Diane, pela dedicação com a pesquisa e pela companhia durante toda esta etapa.

Às colegas Ana Maria, Patrícia e Thaís, do Laboratório de Ecofisiologia Respiratório do CCB-UFSC, por disponibilizarem tempo e paciência para as determinações bioquímicas.

Aos professores Dr. Danilo Wilhelm Filho, Dr^ª. Elisabeth Wazlawik, Dr. Hélio Vanucchi e Dr^ª. Sandra Soares Mello, pela disponibilidade e contribuições, participando como membros da banca

examinadora.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, pelos constantes ensinamentos que com certeza só me fizeram crescer, especialmente ao Professor Erasmo Trindade, pela atenção especial a mim dedicada neste período.

Aos professores Dr^a. Tânia Fröde e Dr. Danilo Wilhelm Filho, por permitirem a realização das análises bioquímicas em seus laboratórios.

À Equipe Multidisciplinar de Estudos em Fibrose Cística do HIJG, especialmente à nutricionista Eliana Barbosa, que tanto contribuiu com seus conhecimentos e apoio neste período, e à equipe do Laboratório Ciência, pelo auxílio diário durante a coleta de dados.

A todas as crianças e adolescentes avaliados, pois sem sua colaboração, esta pesquisa não se realizaria.

A todos, que direta ou indiretamente permitiram que este sonho se concretizasse.

Muito Obrigada!

BENNEMANN, Gabriela Datsch. **Marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em crianças e adolescentes com fibrose cística.** Florianópolis, 2011. 134f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Introdução: Pacientes com Fibrose Cística (FC) são susceptíveis à inflamação e estresse oxidativo (EO), apresentando freqüente obstrução das vias aéreas e infecções bacterianas, com comprometimento das defesas antioxidantes e exacerbação da produção de espécies reativas de oxigênio. **Objetivo:** Avaliar biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, e associá-los com o estado clínico de crianças e adolescentes com FC. **Método:** Estudo clínico controlado em 55 portadores de FC (GFC), idade mediana de 5,62 anos (interquartil - IQR 2,25-7,83), e 14 indivíduos sem FC (grupo controle - GC), mediana de 3,83 anos (IQR 2,25-7,83) submetidos às análises sanguíneas dos marcadores glutatona reduzida (GSH), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT), proteína carbonilada (PC), substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), metabólitos do óxido nítrico (NOx), proteína C reativa (PCR), e bacteriologia para bactérias patogênicas associadas à FC. O estado nutricional (EN) foi avaliado por meio dos índices de peso, estatura e massa corpórea para idade (P/I, E/I e IMC/I) em escore-Z, massa magra em quilos e percentual de gordura corporal. **Resultados:** O estado nutricional prevalente foi eutrofia sem diferença entre os grupos, escores-Z médios: P/I= $-0,21 \pm 0,25$ e de $-0,34 \pm 0,21$, E/I= $-0,69 \pm 0,44$ e $-0,51 \pm 0,23$, e IMC/I= $0,78 \pm 0,34$ e $-0,28 \pm 0,20$, respectivamente para GC e GFC. O Escore de Schwaschmann foi classificado como excelente, mediana igual a 90 % (IQR 85-100). A principal bactéria patogênica presente foi a *S. aureus* (34,54%), seguida pela *P. aeruginosa* (30,9%). No GFC em relação ao GC, observou-se níveis aumentados de TBARS ($p=0,031$), PC ($p=0,031$) e MPO ($p=0,001$), e níveis diminuídos da GSH ($p=0,001$). Em pacientes com cultura positiva para *P. aeruginosa* foram detectados maiores níveis de PC ($p=0,002$), NOx ($p=0,023$), e PCR ($p=0,017$). **Conclusão:** Considerando os aumentos referidos no TBARS, PC e MPO, e a diminuição nos níveis de GSH, é sugerido um quadro de estresse oxidativo (EO) sistêmico nos pacientes com FC, porém,

aparentemente a presença de infecção não implicou, bem como os períodos de infecção bacteriana não foram determinantes no estabelecimento e/ou exacerbação do EO.

Palavras chave: Fibrose Cística. Biomarcadores. Inflamação. Estresse Oxidativo. Antioxidantes. Crianças. Adolescentes.

BENNEMANN, Gabriela Datsch. **Oxidative stress markers in children and adolescents with cystic fibrosis.** Florianópolis, 2011. 134f. Dissertation (Master in Nutrition) – Graduate Program in Nutrition, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

ABSTRACT

Introduction: Patients with Cystic Fibrosis (CF) are susceptible to inflammation and oxidative stress (OS), with frequent airway obstruction and bacterial infections, with decreased antioxidant defenses and exacerbation of reactive oxygen species. **Objective:** Evaluate the inflammatory biomarkers and OS, and associate them with the clinical status of children and adolescents with CF. **Methods:** Controlled clinical trial in 55 CF patients (FCG), median age of 5.62 years (IQR 2.25 to 7.83) and 14 subjects without CF (control group - CG), median age of 3.83 years (interquartile - IQR 2.25 to 7.83) were analysed for markers of oxidative stress such as reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and activity of the myeloperoxidase enzyme (MPO), carbonyl protein (CP), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), nitric oxide metabolites (NO_x), C-reactive protein (CRP), and bacteriology of pathogenic bacteria associated to CF. Nutritional status (NS) was measured by the indices of weight, stature and body mass index for age (W/A, S/A and BMI/A) by the Z-score, lean body mass in kilograms and percentage of body fat. **Results:** Prevalent NS eutrophic had no difference between groups, mean Z-scores: W/A= -0.21±0.25 and -0.34±0.21, S/A= -0.69±0.44 and -0.51±0.23 and BMI/A= 0.78±0.34 and -0.28±0.20, respectively for CG and CFG. The Schwaschmann's score was classified as excellent, median value 90% (IQR 85-100). The main pathogenic bacterium was *S. aureus* (34.54%), followed by *P. aeruginosa* (30.9%). In CFG compared to CG, there were increased levels of TBARS (p=0.031), CP (p=0.031) and MPO activity (p=0.001) and decreased levels of GSH (p=0.001). The patient with positive culture for *P. aeruginosa* demonstrated higher levels of CP (p=0.002), NO_x (p=0.023) and CRP (p=0.017). **Conclusion:** Considering the increase referred in TBARS, PC and MPO, and the decrease in GSH, there is a suggest framework for oxidative stress (OS) in patients with systemic CF, but apparently the presence of infection doesn't influenced, as well as periods of bacterial

infection weren't decisive on establishment and /or exacerbation of the OS.

Keywords: Cystic Fibrosis. Biomarkers. Inflammation. Oxidative Stress. Antioxidants. Children. Adolescents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiopatologia da Doença Pulmonar na Fibrose Cística.....	26
Figura 2 - Grupos avaliados no estudo	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade de vitaminas lipossolúveis para suplementação propostas pelo Consenso Americano de Fibrose Cística em 2006.....	56
Tabela 2	Composição nutricional dos suplementos vitamínicos Source CF [®] e ADEKS [®]	57
Tabela 3	Valores de referência de biomarcadores clínicos hospitalares.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>B. Cepacea</i>	<i>Burkholderia cepacea</i>
BIA	<i>Bioelectrical Impedance Analysis</i> /Análise da Impedância Bioelétrica
CAT	Catalase
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembran Regulator</i> /Proteína Reguladora Transmembrana da Fibrose Cística
CFF	<i>Cystic Fibrosis Foundation</i> /Fundação de Fibrose Cística
CVF%	Percentual da Capacidade Vital Forçada
DHN-MA	<i>Dihydroxynonane Mercapturic Acid</i> /Dihidroxinonano-Ácido Mercaptúrico
DHSS	<i>Department of Health and Social Security</i> / <i>Departamento de Saúde e Segurança Social</i>
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EO	Estresse Oxidativo
EN	Estado Nutricional
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESPEN	<i>European Society for Clinical Nutrition and Metabolism</i> /Sociedade Européia para Nutrição Clínica e Metabolismo
FC	Fibrose Cística
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
ITR	Imunotripsinogênio Reativo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase</i> / Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NCHS	<i>National Center for Health Statistics</i> / Centro Nacional para Estatísticas em Saúde
NOx	Metabólitos do Óxido Nítrico
O ₂ ^{•-}	Ânion Superóxido
•OH	Radical Hidroxila
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PC	Proteína Carbonilada
PCR	Proteína C Reativa

<i>S. aureus</i>	<i>Staphilococcus aureus</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reaction substance</i> / Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TMR	Taxa de Metabolismo de Repouso
VEF ₁	Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo
WHO	<i>World Health Organization</i>
¹ O ₂	Oxigênio Singlete
4-HNE-P	4-Hidroxinonenal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 FIBROSE CÍSTICA.....	22
2.2 FIBROSE CÍSTICA E ESTADO NUTRICIONAL.....	27
2.3 RADICAIS LIVRES, SISTEMAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	37
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO E PROCESSO INFLAMATÓRIO NA FIBROSE CÍSTICA.....	42
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4 SUJEITOS E MÉTODOS.....	50
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	50
4.2 PROTOCOLO DE PESQUISA.....	50
4.3 SUJEITOS.....	51
4.3.1 Grupo Controle.....	51
4.3.2 Grupo Fibrose Cística sem Infecção por Bactérias Patogênicas.....	51
4.3.3 Grupo Fibrose Cística com Infecção por Bactérias Patogênicas.....	52
4.4 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL.....	54
4.4.1 Avaliação Antropométrica.....	54
4.4.2 Determinação das Dobras Cutâneas.....	55
4.5 SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA.....	56
4.6 ESCORE DE SHWACHMAN-KULCZYCKI.....	57
4.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PULMONAR.....	58
4.8 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS NA AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	58
4.8.1 Proteína Total, Albumina e Creatinina.....	58
4.8.2 Hemograma.....	59
4.8.3 Teste Sudam III e Esteatócrito.....	59

4.8.4 Determinação bacteriológica.....	60
4.9 AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	60
4.9.1 Glutathione Reduzida (GSH).....	61
4.9.2 Catalase (CAT).....	61
4.9.3 Glutathione Peroxidase (GPx).....	62
4.9.4 Determinação da Lipoperoxidação.....	62
4.9.5 Determinação da Proteína Carbonilada (PC).....	62
4.9.6 Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	63
4.9.7 Proteína C Reativa (PCR).....	63
4.9.8 Metabólitos do Óxido Nítrico (NOx).....	63
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
5 ARTIGO ORIGINAL.....	65
6 APLICABILIDADE DA PESQUISA.....	96
7 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS.....	97
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	122
ANEXO A – Parecer do comitê de ética e pesquisa do Hospital Infantil Joana de Gusmão.....	124
ANEXO B – Critérios da World Health Organization (2006 e 2007) para classificação do Estado Nutricional de crianças e adolescentes.....	128
ANEXO C - Fórmulas para cálculo da circunferência muscular do braço pela área muscular do braço.....	132
ANEXO D - Equações para o cálculo da densidade corporal e percentual de gordura corporal.....	133
ANEXO E - Escore de Shwachman-Kulczicky.....	135

1 INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC), doença metabólica também denominada Mucoviscidose, foi caracterizada em 1938 pela má absorção de gordura e proteínas, esteatorréia, déficit no crescimento e infecção pulmonar. Posteriormente, em 1946, foi reconhecida como sendo de origem genética, transmitida de forma autossômica recessiva (DAVIS, 2006).

A doença é causada por um defeito no gene codificador de uma proteína do canal de cloro, conhecida como “*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*” (CFTR), que é expressa no epitélio de vários órgãos, incluindo os pulmões, pâncreas, trato gastrointestinal, trato reprodutivo, e pele, assim como a mucosa nasal (RIBEIRO, 2002; COELHO et al., 2007; CHEUNG; DEBER, 2008).

Nos pacientes com FC, a obstrução das vias aéreas ocorre devido ao muco espesso produzido, o que possibilita a infecção, principalmente por *Pseudomona aeruginosa*, bactéria responsável por infecções pulmonares recorrentes (WOOD; GIBSON; GARG, 2005; DAVIS, 2006) contribuindo para a disfunção respiratória (BOUCHER, 2007; LEAL et al., 2008).

As principais manifestações clínicas são o aumento da concentração de cloro e sódio no suor, insuficiência pancreática, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) supurativa progressiva. Observa-se que a doença respiratória é caracterizada por períodos de exacerbação pulmonar, sendo esta a principal responsável pela diminuição na sobrevida e aumento da frequência das internações destes pacientes (AMIN; RATJEN, 2008; CHAVES et al., 2009, ABOIT et al., 2009). A desnutrição secundária afeta a função pulmonar, uma vez que a perda de peso pode levar a redução da massa magra, com conseqüências nos músculos respiratórios e na elasticidade pulmonar (BENTUR et al., 1996), além do aumento do gasto energético, associado à baixa ingestão dietética devido à anorexia e vômitos (CREVELING et al., 1997).

Evidências sugerem que o estresse oxidativo (EO), causado por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs), representa um papel importante na progressão da FC (VASCONCELOS et al., 2007; LIU, 2010). Nesses pacientes, ocorre um desequilíbrio nas concentrações pulmonares e alveolares de oxidantes e antioxidantes, assim como inflamação crônica, que resultam em danos celulares (JUNGAS, 2002; KOWALTOWSKI et al., 2009).

Durante o processo inflamatório, os mecanismos de defesa do pulmão podem tornar-se insuficientes, tornando-o vulnerável, e

evoluindo para uma disfunção progressiva do órgão (LANG et al., 2002), devido à elevada produção de EROs e ERNs, que são radicais livres cuJo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio (VISIOLI; KEANEY; HALLIWELL, 2000). Associado a este fato, o desencadeamento do EO pode contribuir para a exacerbação da FC (BROWN; KELLY, 1994a; van DER VLIET, 1997), e pode se manifestar pelo aumento da oxidação protéica e lipídica no plasma (BROWN; KELLY, 1994b; BROWN et al., 1996; DOMINGUEZ, 1998) e nas secreções das vias aéreas (van DER VLIET; CROSS, 2000).

Estudos mostram o papel do EO na regulação da função e expressão da CFTR (KREINDLER et al., 2005; SADIKOT et al., 2005; CANTIN et al., 2006; QU et al., 2008; SCHWARZER et al., 2008). A piocianina, um composto secretado pela bactéria *P. aeruginosa* (SADIKOT et al., 2005; SCHWARZER et al., 2008), bem como a fumaça de cigarro (KREINDLER et al., 2005), e a exposição ao ozônio (QU et al., 2008), são capazes de inibir a secreção de cloreto no epitélio brônquico humano, sugerindo que os oxidantes podem modular a função da CFTR .

Cantin et al. (2006) observaram que o EO suprime a expressão do RNA mensageiro na proteína CFTR. Recentemente foi demonstrada uma sequência de eventos moleculares que regulam a inibição da expressão da CFTR pelo EO, utilizando como marcador o regulador de transcrição Nrf2 (RENÉ; LOPEZ; CLAUSTRES, 2010).

A partir das considerações acima, avaliou-se neste estudo, marcadores do processo inflamatório e do estresse oxidativo em crianças e adolescentes portadores de FC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FIBROSE CÍSTICA

Caracterizada como doença genética autossômica recessiva, a fibrose cística (FC) é causada por mutações em um único gene, localizado no braço longo do cromossomo 7, codificador de uma glicoproteína complexa, a reguladora de transporte iônico, conhecida como *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR).

Localizada nas superfícies apicais das células epiteliais, a CFTR integra a família dos "transportadores de membrana acoplados ao ATP (adenosina trifosfato)" (DEAN; RZHETSKY; ALLIKMETS, 2001). Além disso, interfere no funcionamento de outras proteínas de membrana, como receptores acoplados à proteína G, canais iônicos (cloro, sódio e potássio) e o canal permutador de cloreto e bicarbonato ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), alterando os processos de fluidificação e acidificação das organelas celulares (COLLINS, 1992; CHEUNG; DEBER, 2008).

Cada indivíduo herda um gene CFTR do pai e um da mãe, chamados de alelos CFTR (ANTUNES, 2008). A presença de dois alelos com mutações no gene da FC provoca inatividade ou funcionamento parcial da CFTR, ocasionando redução na excreção do cloro e aumento da eletro-negatividade intracelular, provocando hiperabsorção de sódio para preservar o equilíbrio eletroquímico e, secundariamente, de água para a célula por ação osmótica. Ocorre então, desidratação da superfície celular, com conseqüente aumento das secreções mucosas e de sua viscosidade, favorecendo a obstrução dos ductos, acompanhada de reação inflamatória e posterior processo de fibrose, que acomete células do trato respiratório, gastrintestinal, hepatobiliar e pâncreas, e do sistema reprodutor (RIBEIRO, 2002; DAVIS, 2006).

A literatura refere repercussões multissistêmicas, a maioria relacionada com o comprometimento da função das glândulas exócrinas que geram secreções espessas e pegajosas, caracterizadas por dano pulmonar progressivo levando a falhas respiratórias, disfunção pancreática, doença hepática que pode progredir para cirrose, problemas relacionados à motilidade intestinal, e elevação de eletrólitos no suor. Praticamente todos os homens com FC são inférteis devido à atresia ou ausência congênita bilateral dos ductos deferentes (RAMSEY; FARREL; PENCHARZ, 1992; MERELLE, 2001; SCHILLER, 2010).

Quando ocorre mutação somente em um alelo, o indivíduo é chamado portador da FC, e existem mais de 1.500 mutações descritas, responsáveis pela transmissão da doença. No entanto, uma deleção do aminoácido fenilalanina na posição 508 está presente em aproximadamente 66% dos cromossomos dos pacientes com FC no mundo todo, sendo esta a mutação mais freqüente, conhecida como delta F508 (SINAASAPPEL et al., 2002; ANTUNES, 2008).

A triagem neonatal para FC é feita por meio da dosagem de imunotripsinogênio reativo (ITR), com a mesma amostra de sangue colhido no teste do pezinho para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito e anemia. A dosagem avalia a integridade da função do

pâncreas, uma vez que o tripsinogênio é um precursor da enzima pancreática, e sua concentração costuma estar elevada no sangue dos recém-nascidos com FC. Isso ocorre mesmo nos casos onde ainda há suficiência do pâncreas, pois a obstrução dos canalículos e ductos já ocorre no período intra-útero, levando a um refluxo das enzimas para a circulação, com conseqüente aumento do tripsinogênio (CASTELLANI et al., 2009; ZEMANICK, 2009). Estudos confirmam a utilidade da dosagem de ITR desde 1980, e atualmente sua eficácia melhorou devido à outra abordagem, na qual, se o resultado der positivo, com valores >70 ng/ dL, deverá ser feita nova dosagem, e se esta ainda se apresentar elevada, deverá ser seguida por um teste de dosagem de eletrólitos no suor ou análise de DNA para mutações no gene CFTR, para confirmação do diagnóstico (CASTELLANI et al., 2009, BALASCAKOVÁ et al., 2009).

Caracterizada como a doença hereditária letal que mais afeta a população caucasiana, a incidência de FC varia entre os países (PLANELLS-CASES; JENTSCH, 2009). Foram encontradas incidências variando entre 1: 2.000 e 1: 5.000 caucasianos nascidos vivos na Europa, nos Estados Unidos e no Canadá. As maiores incidências na Europa são encontradas nas Ilhas Britânicas (1: 2.000 nascidos vivos) e na França (1: 2.500 nascidos vivos). Em outros grupos étnicos a incidência é menos proeminente (em hispânicos 1: 8.000) e é rara na população nativa da África e Ásia (1: 50.000) (RASKIN, 2001; PLANELLS-CASES; JENTSCH, 2009). A incidência da doença no Sul e Sudeste do Brasil é de 1: 7.500 nascidos vivos (RASKIN, 2001).

De acordo com a *Cystic Fibrosis Foundation* (2006), nos últimos 30 anos houve aumento marcante na expectativa de vida dos portadores de FC. Atualmente, a sobrevida de 80 a 90% dos pacientes chega a ser superior aos 20 anos de idade, aumentando-a na medida em que é realizado o diagnóstico precoce (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2006). No Brasil, a sobrevida média no período de 1979-1989 era de apenas 6,4 anos, saltando para 12,6 anos no período de 1970-1994. Na década de 1990-2000 observou-se uma mediana de sobrevida de 18,4 anos de idade após o diagnóstico (ALVAREZ et al., 2004; ROSA et al., 2008).

A incidência não pode ser estimada nesta população, uma vez que não há estudos epidemiológicos ou de triagem neonatal abrangente que permitam esta estimativa, pois menos de 10% do total anual de casos são diagnosticados (ROSA et al., 2008). Embora não existam dados fidedignos sobre a incidência/prevalência de FC no Brasil, de acordo

com a portaria nº 338 de 29 de junho de 2005, há aproximadamente 2 mil portadores de FC no País com diagnóstico confirmado e recebendo tratamento.

A avaliação da gravidade da FC é feita utilizando-se o escore de Shwachman e Kulczycky (1958), um instrumento clínico baseado em pontuações dadas para as seguintes categorias: atividade geral, estado nutricional, alterações na propedêutica pulmonar e achados radiológicos. Sua variação é de 20 a 100. Quanto mais baixo for o seu valor, maior é a gravidade do caso.

As manifestações pulmonares são a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com FC. A CFTR está localizada na superfície apical das células epiteliais mucosas das vias aéreas e das células serosas das glândulas submucosas (AMIN; RATJEN, 2008). A falta de atividade da CFTR conduz à uma diminuição na secreção de cloreto, bem como hiper-absorção de sódio, já que uma das funções fisiológicas do CFTR é inibir o canal de sódio epitelial. Isso resulta num esgotamento no volume do líquido da superfície das vias aéreas, sendo este necessário para a função ciliar normal, levando a um colapso dos cílios respiratórios, com conseqüente prejuízo no *clearance* mucociliar e retenção de muco nas vias aéreas inferiores (SOUTHERN, 2007; GELLER; RUBIN, 2009; RENNOLDS et al., 2010).

O muco é definido como um gel visco-elástico, adesivo e heterogêneo produzido pelas células caliciformes e glândulas submucosas. Em pessoas saudáveis, age como uma secreção protetora cujos principais componentes poliméricos são as gelificantes mucinas, com predomínio da MUC5AC e MUC5B.

O muco normal é importante para a hidratação das vias aéreas e para capturar as bactérias e agentes irritantes inalados (GELLER; RUBIN, 2009). A ausência do líquido da superfície das vias aéreas nos fibrocísticos altera a composição do muco na camada luminal, tornando-o mais viscoso e aderente, formando uma camada de aprisionamento para os microorganismos inalados que não são eficazmente removidos das vias aéreas. Com isso, há predisposição à infecção bacteriana crônica e recorrentes exacerbações pulmonares nestes pacientes, levando ao aumento da obstrução das vias aéreas e eventual falência respiratória (Figura 1) (SOUTHERN, 2007; AMIN; RATJEN, 2008; GELLER; RUBIN, 2009).

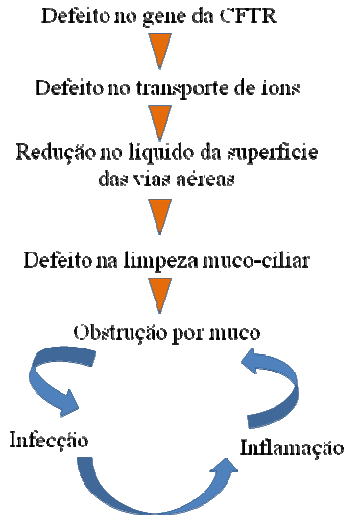


Figura 1 – Fisiopatologia da doença pulmonar na fibrose cística
 Fonte: AMIN; RATJEN, 2008.

São diversos os patógenos que podem infectar as vias aéreas na fibrose cística, alguns deles são: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, nos pacientes mais jovens. O desenvolvimento de *Pseudomona aeruginosa* é favorecido mais tarde, geralmente na adolescência, devido ao ambiente anaeróbio das secreções, as quais favorecem o desenvolvimento desta bactéria e subseqüentes biofilmes, que a protegem contra as defesas imunes e os antibióticos, evoluindo para a cronicidade, caracterizada pelo aparecimento do fenótipo mucoide (GELLER; RUBIN, 2009).

Adicionalmente, outros microrganismos são encontrados nas secreções respiratórias, destacando-se: o Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia gladioli*, *Pandoraea* spp., *Ralstonia* spp. e *Inquilinus limosus*. Essas agressões bacterianas ao tecido pulmonar são associadas a períodos de exacerbação, definidos clinicamente como aumento dos sintomas respiratórios (tosse, volume e cor do escarro, ou falta de ar) associados a uma queda na espirometria, em comparação com os valores usuais para o paciente (ABBOTT et al., 2009). Um

componente-chave para a saúde do pulmão nestes pacientes é o constante depuramento do líquido de superfície (SOUTHERN, 2007).

Protocolos clínicos consideram, dentre estas principais bactérias, consideradas patogênicas para a FC, a *Pseudomona aeruginosa* como sendo a mais agressiva para os pacientes fibrocísticos (GRASSMÉ et al., 2010). De modo geral, a infecção por estas bactérias pode ser classificada da seguinte maneira, de acordo com os períodos e tipo do microorganismo: Infecção: Presença de microorganismos patogênicos para FC (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aspergillus fumigatus*, *Acromobacter xylosoxidans* e micobactérias atípicas) em cultura de escarro/aspirado traqueal/ swab de orofaringe. Primo-infecção: Primeira cultura positiva para microorganismos patogênicos para FC. Infecção Intermitente: Infecções, por mesma bactéria patogênica, que não atinjam a frequência de três episódios em seis meses. Infecção Crônica: três culturas positivas, com intervalo maior que um mês entre elas, em um período de seis meses, por mesma bactéria patogênica (REIS; DAMACENO, 1998).

2.2 FIBROSE CÍSTICA E ESTADO NUTRICIONAL

Os pacientes portadores de FC apresentam estreita associação entre o aumento da taxa metabólica basal e conseqüente desenvolvimento da desnutrição, o que justifica um acompanhamento adequado da dieta (PENCHARZ; DURIE, 2000; POWERS et al., 2005).

A desnutrição crônica e os problemas de crescimento nos pacientes com FC estão associados ao déficit energético e à alta demanda energética (HENRICHFREISE et al., 2007). Situações interdependentes, como comprometimento da função pulmonar, anorexia e refluxo gastroesofágico que ocasionam vômitos, insuficiência pancreática e complicações biliares e intestinais, são responsáveis pelo aumento das necessidades energéticas, ingestão diminuída e aumento das perdas atribuídas à inadequação nutricional com conseqüente perda da massa magra e depressão da função imunológica (PENCHARZ; DURIE, 2000; WOOD; GIBSON; GARB, 2005).

Muitos pacientes fibrocísticos apresentam redução da densidade mineral óssea (MORTON, 2009), e estudos sugerem que a

mineralização deficiente do osso ocorre na infância (SERMET-GAUDELUS; SOUBERBIELLE; RUIZ, 2007; WOLFENDEN, 2008; DOUROS et al., 2008). A etiologia da baixa densidade mineral óssea na FC é uma complexa interação de fatores que incluem o efeito da mutação da própria CFTR, o estado nutricional, incluindo o baixo IMC, deficiência das vitaminas D e K, baixa ingestão de cálcio, a severidade da doença, recorrentes infecções com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias circulantes, puberdade atrasada, hipogonadismo secundário, diabetes melito relacionado à fibrose cística (DMFC), baixa atividade física, tratamento com corticosteróides ou outros medicamentos que causam perda óssea, como acetato de medroxiprogesterona de depósito e de terapia imunossupressora (MORTON, 2009).

O pâncreas normal secreta enzimas responsáveis pela digestão luminal de gorduras, proteínas e carboidratos (INNIS; DAVIDSON, 2008). A função defeituosa da CFTR no pâncreas exócrino leva à redução na secreção de suco pancreático e bicarbonato, com obstrução dos ductos por secreções viscosas e pegajosas que resultam em insuficiência pancreática (CHEN; INNIS, 2004; DAVIS, 2006; STALLINGS et al., 2008), a qual acomete cerca de 85% dos pacientes fibrocísticos (FIATES, 2001; INNIS; DAVIDSON, 2008) e leva a má absorção de macronutrientes, principalmente lipídeos e proteínas, bem como das vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e do mineral cálcio, ocasionando dor, distensão abdominal e diarreia, favorecendo assim, a desnutrição (INNIS; DAVIDSON, 2008; STALVEY; FLOTTE, 2009).

Faz parte do tratamento desses pacientes a reposição enzimática e vitamínica (BOROWITZ; BAKER; STALLINGS, 2002), que apresenta melhor efeito quando administrada após a ingestão de cada refeição, e quando as refeições são realizadas em intervalos regulares (BOROWITZ; BAKER; STALLINGS, 2002). A terapia com enzimas pancreáticas encapsuladas aumenta a absorção de gordura de aproximadamente 50 a 60%, em indivíduos com FC com insuficiência pancreática, para cerca de 85%, porém, a má absorção de gordura residual permanece (DAVIDSON, 2000; DODGE; TURCK, 2006; STALLINGS et al., 2008). A avaliação da terapia de reposição de enzimas pode ser realizada subjetivamente conforme parâmetros de crescimento e padrões de evacuações (BOROWITZ; BAKER; STALLINGS, 2002).

As mutações específicas da proteína CFTR estão associadas à insuficiência pancreática de forma dominante, sendo utilizado como

preditivo do prognóstico clínico do paciente (STALVEY; FLOTTE, 2009). Como consequência da doença, ocorre redução na secreção intestinal de fluidos e eletrólitos, que resulta na diminuição do pH duodenal, secreções espessas e viscosas cobrindo a borda em escova e as microvilosidades. Outras consequências são distúrbios da permeabilidade e da motilidade gastrointestinal, e da secreção e composição biliar. Estes fatores contribuem para a incapacidade de indivíduos com FC em alcançar a digestão normal dos nutrientes, apesar da reposição de enzimas pancreáticas (INNIS; DAVIDSON, 2008; STALVEY; FLOTTE, 2009).

A suplementação das vitaminas A, D, E e K faz parte do protocolo de tratamento destes pacientes, segundo o que preconiza Borowitz et al. (2002). A suplementação de vitamina C, zinco e selênio obedecem à ingestão diária recomendada (BOROWITZ; BAKER; STALLINGS, 2002; CANTIN, 2007).

O uso de um “coquetel” antioxidante (beta-caroteno, alfa-tocoferol, gama-tocoferol e outros tocoferóis, coenzima Q10, vitamina D e vitamina K) demonstrou-se eficaz no aumento dos níveis séricos destes nutrientes, bem como na redução de marcadores inflamatórios no escarro, sem a modificação da função pulmonar e contaminação bacteriana (PAPAS, 2007).

A terapia de reposição enzimática também faz parte do protocolo de tratamento destes pacientes. As enzimas devem ser administradas concomitantes a qualquer refeição com gordura, mesmo com as dietas elementares e semi-elementares, não sendo necessária administração junto com frutas.

Existem vários tipos de enzimas disponíveis comercialmente, com preparações em pós, comprimidos, cápsulas com micro-esferas, minimicroesferas, dose padrão e altas doses (>20.000 UI de lipase), sendo o tipo prescrito dependente da disponibilidade local e idade do paciente. As enzimas mais utilizadas são cápsulas de micro-esferas revestidas com uma proteção entérica sensível ao pH e de origem suína. Estas enzimas dissolvem-se em pH 5,5 a 6,0, evitando a inativação pela acidez gástrica.

A dose inicial geralmente prescrita varia de 500 a 1.500 UI de lipase/kg/refeição (BOROWITZ; BAKER; STALLINGS, 2002). Segundo Kerem et al., (2005) a prescrição pode ser 400 a 4.000 UI de lipase/grama de gordura ingerida por dia. A dose é aumentada progressivamente de acordo com os sintomas gastrointestinais, ganho ponderal e a perda de gordura nas fezes. A prescrição de enzimas pode ser de até 2.500 UI de lipase/kg/refeição ou de 10.000 UI/kg/dia

(LITTLEWOOD; WOLFE; CONWAY, 2006). Recomenda-se que a enzima seja dividida em duas doses, ingeridas no início e durante, ou fim da refeição, principalmente se for uma refeição demorada. Entretanto, muitos pacientes toleram uma única dose no início da refeição, (KEREM et al., 2005). No caso de lactentes ou crianças que não conseguem ingerir a cápsula inteira, recomenda-se abri-la e ofertar à criança com leite materno, fórmula infantil ou, preferencialmente, suco ou papa de fruta ácida, mantendo a sua proteção entérica, sempre na colher e em uma única dose, não misturando no total da comida (BOROWITZ; BAKER; STALLINGS, 2002).

Em estudo realizado durante o período de um ano, 18 indivíduos de três meses a 18 anos de idade foram acompanhados em três momentos: antes da intervenção nutricional, com seis meses e após 12 meses. Os autores concluíram que o estado nutricional (EN) melhorou com a conscientização da importância da suplementação vitamínica, do uso correto das enzimas pancreáticas e o aumento da ingestão de micronutrientes (GASPAR et al., 2002).

O EN tem efeito significativo sobre a doença pulmonar, progressão e sobrevida de pacientes com FC (KONSTAN et al., 2003; CHUAN; LAI; SHOFF, 2008). Outras conseqüências decorrentes da desnutrição e presença de doença pulmonar crônica nos pacientes com FC são a hipoproteinemia, deficiência de vitamina E, anemia hemolítica, hiponatremia, hipocloremia e desidratação. A desnutrição caracteriza-se como grave o suficiente para causar depleção de massa corporal e nanismo de crescimento (BOROWITZ; BAKER; STALLINGS, 2002; KEREM et al., 2005).

A relação entre peso corporal e função pulmonar foi avaliada em pacientes com FC, em dois estudos de revisão. O gasto energético foi influenciado pelo aumento do trabalho respiratório associado ao processo inflamatório e as infecções recorrentes (BARBOSA, 2008; AMIN; RATJEN, 2008). A inflamação pulmonar relacionou-se ao aumento da taxa metabólica de repouso (TMR), condição em que as exacerbações agudas da doença crônica do pulmão aumentaram a TMR, cujos valores retornaram para o nível basal algumas semanas após o tratamento da inflamação (PENCHARZ; DURIE, 2000). Nestes pacientes a TMR aumentou na mesma proporção em que ocorreu um declínio da função pulmonar.

O diagnóstico nutricional pelo índice de massa corporal (IMC) foi avaliado em 39 pacientes com FC (idade média de $23,9 \pm 3,7$ anos) e a função pulmonar foi verificada pelo volume expiratório forçado no

primeiro segundo (VEF1) e pela capacidade vital forçada (CVF%). Os pacientes foram agrupados segundo a presença ou ausência de desnutrição. O IMC médio foi de $19,5 \pm 2,9$ kg/ m² (12,8 - 24,9 kg/ m²), sendo estabelecido diagnóstico de desnutrição em 11 pacientes (28,2%), dos quais cinco tinham desnutrição grave. O estado nutricional normal foi observado em 28 pacientes (71,8%) e risco de desnutrição em 9, de acordo com os critérios da *European Society for Clinical Nutrition and Metabolism* (ESPEN). Houve diferença significativa entre desnutridos e não desnutridos, em relação ao VEF1% e CVF%. Além disso, os pacientes com desnutrição obtiveram maior frequência de colonização por *P. aeruginosa* e fungos (GOZDZIK et al., 2008).

O comportamento alimentar de crianças com FC entre um e doze anos de idade foi avaliado em um estudo controlado por um questionário estruturado aplicado aos pais. Os problemas relatados foram a falta de prazer em alimentar-se, a resistência em terminar a refeição, pouco apetite, preferência na ingestão de líquidos do que sólidos, comer lanches nos horários das grandes refeições (almoço e jantar) e tentativas de negociar os alimentos. Estes problemas foram identificados mais entre os meninos e nas faixas etárias entre 5 a 12 anos de idade (DUFF et al., 2003). Uma das propostas relatadas na literatura (ADDE; RODRIGUES; CARDOSO, 2004; ROSA et al., 2008) para melhorar a aceitabilidade dos alimentos seria o seu preparo, de maneira a torná-los palatáveis, sem perder o valor nutritivo e mantendo o alto valor energético (MARTÍNEZ-COSTA et al., 2005).

A melhora do estado nutricional em crianças com FC tem por objetivo garantir o ganho de peso e o crescimento, bem como o aporte adequado de ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais para evitar o atraso da puberdade, e reduzir a taxa de declínio clínico. Orientações dietéticas são baseadas na necessidade de compensar o gasto de energia devido à presença da infecção, à dificuldade respiratória e o aumento das perdas alimentares devido à má absorção (ROSA et al., 2008).

O pâncreas não produz enzimas suficientes para a completa digestão dos alimentos ingeridos e as primeiras manifestações são a má digestão e má absorção de gorduras. Os ductos pancreáticos ficam obstruídos por muco espesso, impedindo o suco pancreático de atingir o duodeno. A diminuição ou ausência de enzimas pancreáticas faz com que as proteínas requeridas para o crescimento e reparo de tecidos do corpo não sejam totalmente utilizadas. A gordura, nutriente energético, quando não é absorvida, pode levar à deficiência de vitaminas lipossolúveis, bem como atraso no crescimento devido à ingestão energética inadequada (ROSA et al., 2008). As recomendações de

ingestão para gênero e idade variam de 120% a 150% (LITTLEWOOD; MAC DONALD, 1987) da necessidade energética diária recomendada segundo a *Recommended Daily Amounts* (RDA), publicada pelo *Department of Health and Social Security* (DHSS, 1985). O percentual de lipídeos na dieta deve ser de 40% (KALIVIANAKIS et al., 2009) e a necessidade de proteínas pode variar de 150% a 200% da RDA (MAC DONALD, 2000).

O consumo dietético de crianças com FC, comparado com controles saudáveis mostrou que, apesar dos fibrocísticos consumirem significativamente mais energia, muitas vezes as necessidades não são alcançadas (TRABULSI et al., 2006; NASR; DRURY, 2008). Situação observada em outro estudo, no qual, mesmo com o consumo calórico aumentado, as crianças com FC não atingem a necessidade energética, pois têm menor peso e estatura quando comparadas ao seu par controlado saudável, principalmente aquelas na faixa etária entre 5 e 8 anos (WHITE et al., 2007). Relatou-se a dificuldade em alcançar a recomendação de 120% de energia e 40% em lipídeos para todos os pacientes (KAWCHAK, 1996; WESTWOOD; SAITOWITZ, 1999). Alguns estudos sugerem que não é necessário atingir 120% das RDAs (Recomendações Nutricionais para a população americana sadia) em energia em todas as fases da doença (STETTLER et al., 1997; MARCUS et al., 1998), uma vez que as RDAs são calculadas referentes à idade e não ao peso, sugerindo que as necessidades energéticas são superestimadas (WOOTON, 1991).

De acordo com o Consenso Americano de Fibrose Cística para as crianças entre 5 e 10 anos de idade há riscos no crescimento e no desenvolvimento, devido ao aumento da atividade física, à redução da ingestão alimentar e à ingestão inadequada de enzimas. Na faixa etária entre 11 e 18 anos de idade, período onde geralmente ocorre o desenvolvimento da puberdade, as taxas de crescimento aumentam, assim como a atividade física, havendo necessidade de maior aporte energético (BOROWITZ; BAKER; STALLINGS, 2002).

Em um ensaio clínico controlado, observou-se melhora significativa nos índices de crescimento, evidenciados pelo peso e estatura, nos pacientes com diagnóstico precoce para FC. Esses resultados demonstram que o diagnóstico precoce e o tratamento nutricional favorecem a melhora e a manutenção dos parâmetros de crescimento e peso corporal (FARRELL, 2001). Em estudo retrospectivo com dados de 98 pacientes, com idade entre 0 e 18 anos, o diagnóstico para FC foi considerado tardio, com idade média de 8,5

anos e mediana de 2,5 anos de idade (variando entre 2 dias a 16,3 anos de idade). Nestes pacientes foi comum a insuficiência nas variáveis do crescimento ao diagnóstico: peso e estatura abaixo do percentil 5°. A deficiência de vitamina E, no momento do diagnóstico, esteve presente em 70% das crianças. A média do perímetro cefálico encontrava-se no percentil 32° [Intervalo de Confiança (IC) de 95% estabelecido para o intervalo entre os percentis 24° e 41°]. Este resultado foi significativamente menor do que o perímetro cefálico médio de crianças com níveis adequados de vitamina E, cujo valor médio encontrou-se no percentil 63° (IC 95% estabelecido para o intervalo entre os percentis 47° e 78°) (STEINRATHS; VALLANCE; DAVIDSON, 2008). Estes achados estão de acordo com o que foi observado em um estudo randomizado controlado, que teve por objetivo comparar o diagnóstico de FC realizado pela triagem neonatal ao diagnóstico tardio feito somente por dados clínicos. Um em cada 15 pacientes diagnosticados clinicamente foi a óbito, não havendo óbitos no grupo rastreado desde o nascimento (LEE et al., 2003). Da mesma maneira, em estudo britânico, as crianças foram selecionadas aleatoriamente, para o grupo de triagem neonatal ou não, durante um período de 5 anos. Houve 4 óbitos precoces entre os 59 pacientes com FC que não foram diagnosticados por triagem e não houve mortes entre os 74 pacientes que tiveram diagnóstico por triagem neonatal (DOULL et al., 2001).

Com o objetivo de verificar se os valores de percentil de estatura para idade podem ser preditivos de maior sobrevivência, foram avaliados em estudo longitudinal no Centro de Fibrose Cística, nos Estados Unidos. A análise dos dados referentes a avaliação antropométrica identificou que os pacientes mais baixos tiveram menor sobrevida, levando a crer que a baixa estatura é um fator negativo para pacientes com FC (BEKER; COHEN-RUSSEK; FLINK, 2001).

Os valores de percentil de IMC, em estudo transversal, foram comparados com índices antropométricos pelo percentil de estatura para idade, peso para idade e peso para estatura definidos em 4.577 crianças fibrocísticas. Os autores concluíram que o percentil de IMC foi mais sensível e acurado para predizer o estado nutricional do que os demais indicadores, servindo de orientação para uma intervenção terapêutica precoce (WIEDEMANN; PAUL; STERN, 2007).

A avaliação do EN também pode ser realizada pela análise de composição de gordura corporal por meio da análise da Impedância Biolétrica (BIA). A composição corporal avaliada por medidas de dobras cutâneas e medidas de circunferências foi comparada com os resultados da avaliação de BIA em 58 indivíduos entre 4 e 18 anos de

idade. Os autores concluíram que os fibrocísticos tinham diminuição da massa magra, tanto pela medida das dobras cutâneas e circunferência muscular do braço, quanto pela BIA (GROENWEG, 2002).

O percentil de ponto de corte para desnutrição, utilizando o indicador circunferência muscular do braço (CMB), é maior para pacientes com FC (percentil 10^o) do que para a população geral (percentil 5^o). Em estudo transversal, com 48 crianças e adolescentes de 6 a 18 anos de idade portadores de FC, a CMB classificou um maior número de pacientes como desnutridos, quando comparada ao índice de massa corporal em relação à idade (IMC/I). Dentre os pacientes classificados como desnutridos pela CMB, 39% destes apresentavam classificação de eutrofia pelo indicador IMC/I (CHAVES et al., 2009).

A composição corporal avaliada por meio da BIA, medida pelo fluxo de pequena corrente elétrica alternada, mostrou que esta técnica pode ser utilizada tanto para indivíduos saudáveis quanto para aqueles com doenças crônicas. A BIA estima a real quantidade de gordura corporal total, mas também pode sofrer variações decorrentes da posição do corpo, hidratação, consumo alimentar e atividades físicas recentes antes da realização do exame. A BIA pode ser considerada confiável para estimar o percentual de massa magra associada à antropometria, e para detectar mudanças no estado nutricional (GROENWEG, 2002).

Foram avaliados o percentual de gordura corporal e o percentil de IMC em indivíduos de 2 a 20 anos de idade para verificar a concordância e discrepância entre os dois indicadores de avaliação nutricional. Os autores observaram que a porcentagem de gordura corporal subestimou a severidade da desnutrição em crianças com baixa estatura e superestimou a falência do estado nutricional nas crianças mais altas (ZHANG; LAI, 2004).

Estudo transversal que avaliou características sócio-demográficas, clínicas e nutricionais em 21 pacientes fibrocísticos, com idade menor ou igual à 18 anos, em um centro de referência no nordeste do Brasil (PINTO; SILVA; BRITTO, 2009). A avaliação nutricional foi feita pelo escore Z de estatura para idade (E/I), peso para idade (P/I) e peso para estatura (P/E), definidos como escore Z >-1, a partir das referências da WHO (2006/2007). Já o percentual de peso para estatura (%P/E) foi classificado de acordo com as recomendações do Consenso Americano em Fibrose Cística (2002). A média de escore Z para P/I, E/I e P/E, respectivamente, foi de $-0,73 \pm 0,28$, $-0,34 \pm 0,21$ e $-0,73 \pm 0,35$. A média de percentual para o P/E foi de $94,52 \pm 1,58\%$. Valores maiores foram mais predominantes entre as crianças menores de 5 anos,

do que naquelas de maiores faixas etárias, para ambos os critérios. O percentual de desnutridos foi maior quando a avaliação foi feita pelo escore Z do que por %P/E (déficit nutricional em 66,7% e 33,3%, respectivamente; $p < 0,05$). O déficit nutricional também foi encontrado quando avaliada a composição corporal pelas medidas da área muscular e área gordurosa do braço (FRISANCHO, 1981). Os escores apresentaram valores abaixo de 60% dos padrões de normalidade, especialmente para a faixa etária entre 5 e 10 anos. A média de idade ao diagnóstico foi de $3,8 \pm 3,9$ anos, e as principais características clínicas foram infecção respiratória (85,7%) e esteatorréia (66,7%). Os pacientes cujos indicadores do estado nutricional estiveram acima dos limites de normalidade, apresentaram melhores condições socioeconômicas ($p < 0,05$). O estado nutricional adequado também favoreceu melhores resultados para a avaliação clínica, representada pelos valores do escore de Shwachman ($p < 0,05$). Este estudo apresentou média de idade do diagnóstico superior à média apresentada pela *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) (2006), que é de seis meses. Apesar disso, a avaliação do escore de Shwachman e o número de infecções respiratórias mostraram que os pacientes apresentavam boas condições clínicas (PINTO; SILVA; BRITTO, 2009).

Chuan e colaboradores utilizaram em seu estudo (2008), as diretrizes da CFF revisadas em 2005 (SCHECHTER; MARGOLIS, 2005), com o objetivo de avaliar o uso do indicador “percentual de peso corporal ideal (%PCI)” como critério de avaliação da falência do estado nutricional de crianças com FC, e também a recomendação de que estes pacientes deveriam ter o percentil para índice de massa corporal (pIMC) ≥ 50 . Foram comparados dados de 14.702 crianças provenientes de 113 centros de FC nos Estados Unidos. A falência do estado nutricional foi classificada pelo %PCI $< 90\%$ de acordo com a CFF 2002 (BOROWITZ; BAKER; STALLINGS, 2002), e pIMC $< 50^{\circ}$ de acordo com a CFF 2005 (SCHECHTER; MARGOLIS, 2005). Constatou-se que o uso do %PCI não era adequado na avaliação de crianças com estatura elevada e a eliminação deste parâmetro resultou em uma redução de 6% (de 33% para 27%) na taxa de falência do estado nutricional nos Estados Unidos. O uso do pIMC $< 50^{\circ}$ levou à classificação de 57% das crianças como abaixo do IMC para idade, e a partir deste estudo iniciou-se a implementação deste parâmetro de avaliação em todos os centros de fibrose cística americanos (CHUAN; LAI; SHOFF, 2008).

O acelerado crescimento e o desenvolvimento durante os dois primeiros anos de vida são particularmente importantes para o sistema nervoso central (SNC), o que o torna vulnerável aos choques internos e

externos. Alterações no perímetro cefálico (PC) podem representar variações anormais, determinadas geneticamente, mas também revelar presença de doenças no SNC, ou ser resultante de doenças sistêmicas e danos cerebrais durante o primeiro ano de vida (SCHONHAUT, 2004; DOGAN et al., 2005).

Em estudo realizado com 52 crianças, os autores sugerem que, na FC, apesar do diagnóstico precoce e atenção nutricional, o crescimento da cabeça desenvolve-se posteriormente em relação ao corpo, porém o potencial intelectual nestas crianças parece ser preservado. A expressão da proteína CFTR também foi encontrada no cérebro e, embora seu significado não seja claro, é possível que influencie na secreção de fluido cerebrospinal, que pode ser deficiente na FC, levando a uma redução do volume cerebral. Estudos utilizando ressonância magnética para calcular o volume ventricular podem fornecer mais informações a respeito deste assunto (GHOSAL et al., 1994).

Para classificação do estado nutricional, o Consenso Americano de Fibrose Cística no ano de 2002 sugeriu a utilização preconizada pelo NCHS/CDC (2000) para definir o estado nutricional desta população, o que ainda é utilizado pelos centros de atendimento a pacientes mucoviscidóticos. Entretanto, recentemente em 2006 e 2007, a WHO reconstruiu a referência de crescimento recomendada pelo *National Center for Health Statistics* (NCHS), publicado por Hamill et al. (1979). acrescentando os dados de crianças de 18 a 71 meses provenientes do padrão de crescimento da WHO, aos dados da amostra original dos participantes de 1 a 24 anos, com o objetivo de facilitar a classificação na transição aos 5 anos de idade. Foram aplicados os métodos estatísticos mais atuais para o desenvolvimento de referências para crianças pré-escolares, e essas novas curvas adaptam-se bem ao padrão de crescimento infantil aos 5 anos de idade e aos pontos de corte de sobrepeso e obesidade recomendados para os adultos. Dessa forma, fornece pontos de corte para todas as idades, e corresponde à referência adequada para a avaliação nutricional das crianças e adolescentes dos 5 aos 19 anos.

Com relação às dobras cutâneas, Frisancho (1981) propõe o uso da Circunferência Muscular do Braço (CMB), Área Muscular do Braço (AMB) e Área Gordurosa do Braço (AGB) estimada a partir dos valores de Circunferência do Braço (CB) e Dobra Cutânea Tricipital (DT), para a identificação de pacientes com desnutrição energética protéica e depleção muscular a partir de um ano de idade.

A avaliação e diagnóstico nutricional, tanto por medidas antropométricas, como por meio da BIA são necessários para a conduta terapêutica dos pacientes fibrocísticos.

2.3 RADICAIS LIVRES, SISTEMAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO

Em 1954, Gerschman publicou uma teoria na qual relatava que o oxigênio poderia ter propriedades tóxicas através de suas formas reduzidas. Em 1956, Denham Harman et al., propuseram o conceito de radicais livres como substâncias reativas que possuem papel importante no processo de envelhecimento (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VALKO et al., 2007).

Os radicais livres de oxigênio, nitrogênio ou cloro são definidos como moléculas ou fragmentos de moléculas que contêm um ou mais elétrons não emparelhados no orbital atômico ou molecular mais externo. Estes elétrons não pareados promovem, usualmente, um considerável nível de reatividade nestas moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os radicais livres são produtos normais do metabolismo celular. São produzidos principalmente pelo sistema de elétrons localizado na membrana mitocondrial interior, pela ação de enzimas como xantina oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminoxidase, ciclooxigenase e lipoxigenase, e pelo sistema de fagócitos NADPH oxidase/ mieloperoxidase (HALLIWELL, 1997; HALLIWELL, 2009). Fontes externas como os constituintes dietéticos, a radiação ultravioleta, os gases radioativos e os poluentes ambientais também podem contribuir com o aumento de substâncias oxidantes (ZEIDLER, 2004).

Os efeitos benéficos dos radicais livres ocorrem quando estão em baixa ou moderada concentração e consistem, por exemplo, na defesa contra agentes infecciosos e na ativação de sistemas de sinalização celular. Entretanto, quando existe uma produção exacerbada de radicais livres e/ou uma deficiência de antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos necessários para neutralizar essas substâncias, tem-se uma situação conhecida como estresse oxidativo (EO). Os prejuízos causados pelo excesso de radicais livres consistem em danos celulares que podem atingir lipídeos de membranas, carboidratos, proteínas e DNA, promovendo a inibição de reações normais do organismo. O estresse oxidativo está associado com inúmeras doenças crônicas, tais como

câncer, diabetes melito, obesidade, doenças cardiovasculares, desordens neurodegenerativas e também com o processo de envelhecimento (VINCENT; TAYLOR, 2006).

Os radicais livres derivados do oxigênio representam a classe mais importante das espécies reativas no organismo vivo. Cerca de 95% do oxigênio produzido durante o metabolismo aeróbico é utilizado para a produção de energia, mas o restante não é totalmente oxidado em água e gera radicais livres (KOWALTOWSKI et al., 2009). As principais espécies reativas de oxigênio incluem o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), o hidroperóxido (H_2O_2), e o oxigênio singlete (1O_2) (RONSEIN, 2006; VALKO et al., 2007).

O radical superóxido é, dentre estas principais formas, a que menos apresenta capacidade de oxidação, com pouca reatividade em soluções aquosas. Ocorre em quase todas as células aeróbicas, produzido principalmente na cadeia respiratória mitocondrial e durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Apesar de pouco reativo, o ânion superóxido é considerado uma espécie reativa de oxigênio primária, com capacidade de interagir com outras moléculas gerando as espécies reativas de oxigênio secundárias, principalmente através de processos catalisados por enzimas ou metais (MIAO; DARET; CLAIR, 2009).

O radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) é a espécie reativa de oxigênio mais reativa e deletéria dos sistemas biológicos que utilizam oxigênio. Tem a capacidade de se combinar rapidamente com metais através das reações de Fenton e de Haber-Weiss e também com outros radicais, podendo atingir e destruir membranas celulares, proteínas e causar mutações em ácidos nucléicos. Sua meia-vida é muito curta, com duração aproximada de 10^{-9} segundos, e sua concentração é extremamente baixa de $\sim 10^{-18}$ M (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOWALTOWSKI et al., 2009).

O hidroperóxido (H_2O_2), por sua vez, apesar de não ser um radical livre, por não possuir elétrons desemparelhados na última camada, é bastante tóxico e deletério. O H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar membranas, incluindo a nuclear induzindo danos na molécula de DNA, além de participar das reações que produzem radical hidroxila (HALLIWELL, 2004). Os peroxissomos são um dos principais locais no qual o consumo de oxigênio leva à produção de H_2O_2 ; entretanto, a organela também possui enzimas antioxidantes que mantêm o equilíbrio em seu interior. A lesão em peroxissomos promove o extravasamento de H_2O_2 para o citosol, contribuindo assim, para um significativo aumento do EO na célula. Adicionalmente, a

mieloperoxidase também produz H_2O_2 a partir de duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$ e, na presença de uma hialida (como o cloreto), em ácido hipocloroso. Esta reação mata microrganismos através da oxidação de membrana e ligações moleculares prejudiciais (FRÖDE; MEDEIROS, 2001; VASCONCELOS et al., 2007).

O oxigênio singlete (1O_2) é uma forma excitada de oxigênio molecular. Não se trata de um radical livre, pois não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. Parece ter ações em alguns eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RONSEIN, 2006).

Dentre as espécies reativas de nitrogênio, o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) é a menor molécula considerada como um radical livre (GHAFOURIFAR; CADENAS, 2005). Consiste em uma espécie reativa bastante abundante no organismo humano e que atua como sinalizador molecular em uma série de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa, relaxamento da musculatura lisa e regulação do sistema imune. O $^{\bullet}NO$ tem vida média de apenas alguns segundos e é solúvel tanto no ambiente lipídico quanto no aquoso. Ao reagir com o oxigênio e água, libera ânions nitrito e nitrato. Sua reação com o ânion superóxido promove a liberação de peróxido nitrito ($ONOO^-$), que é um potente agente oxidante capaz de causar fragmentação de DNA e oxidação lipídica (CARR et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2007).

Diante da exposição às diversas fontes de espécies reativas, o organismo humano possui mecanismos de defesa para evitar danos maiores provocados por estas substâncias. Os mecanismos de defesa consistem de sistemas e substâncias conhecidas como antioxidantes. O termo antioxidante pode ser definido como, uma substância que, mesmo quando presente em baixas concentrações, comparada aos substratos oxidáveis, retarda ou previne significativamente a oxidação destes substratos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As principais defesas antioxidantes, de origem enzimática incluem a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). As principais de origem não-enzimáticas são representadas, por exemplo, pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatona reduzida (GSH), ácido úrico, carotenóides, flavonóides (VALKO et al., 2007; KOWALTOWSKI et al., 2009).

A SOD converte $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e possui duas isoformas, a cobre-zinco (CuZn-SOD) presente no citosol, lisossomas, núcleo e espaço

entre as membranas interna e externa da mitocôndria e a manganês (Mn-SOD) localizada na mitocôndria. Já a catalase (CAT), atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O . Esta enzima é encontrada principalmente no peroxissoma, a organela responsável pela desintoxicação celular, oxidação de ácidos graxos de cadeia longa e que é fonte de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete, e também nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco (VALKO et al., 2007).

A glutationa peroxidase (GPx) atua sobre peróxidos em geral (VINCENT; TAYLOR, 2006). Possui quatro sub formas: GPx1, GPx2, GPx3 e GPx4, as quais são encontradas em diferentes tecidos e exercem ação sobre diferentes substratos. Esta família de enzimas possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima. Além disso, utiliza o tripeptídeo glutationa reduzida (GSH) como doador de elétrons para a redução do H_2O_2 e outros peróxidos orgânicos. O tripeptídeo glutationa, após ser oxidado, pode retornar à sua forma reduzida através da ação da enzima glutationa redutase (GR) (ROVER-JÚNIOR, 2001; LAGUERRE et al., 2009).

O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a GSH, tocoferóis, ascorbato, α -tocopherol, ácido úrico e β -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro) (VALKO et al., 2007).

A GSH é um tripeptídeo que serve de cofator para as reações das enzimas da família da GPx e de GST, e é considerado o principal composto antioxidante intracelular. É o único tiol não protéico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de espécies reativas de oxigênio (VASCONCELOS et al., 2007).

Com isso, verifica-se que as principais defesas antioxidantes dependem de substâncias derivadas da alimentação tais como zinco, cobre, selênio, flavonóides, vitamina E, vitamina C e β -caroteno. Sendo assim, os antioxidantes obtidos da alimentação como os minerais e as vitaminas mostram-se extremamente importantes nas ações contra os radicais livres (SIES; STAHL, 1995; BARREIROS; DAVID, 2006).

Quando a produção de espécies reativas supera as defesas antioxidantes, são vários os efeitos do estresse oxidativo nos sistemas

biológicos (SIES; STAHL, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Nos carboidratos, o $\cdot\text{OH}$ reage com $(\text{CHOH})_n$ levando à quebra da cadeia de importantes moléculas, tais como o ácido hialurônico. Nos ácidos nucleicos, as espécies reativas de oxigênio atacam a desoxirribose, as bases purínicas e pirimidínicas ocasionando a quebra da cadeia do DNA, a ligação cruzada entre as fitas e modificações nas suas bases levando a mutações e apoptose (VASCONCELOS et al., 2007).

As proteínas têm muitos sítios reativos. Durante o estresse oxidativo, ocorre fragmentação das cadeias e oxidação de muitos aminoácidos, com produção de compostos carbonilados. Além disso, processos reversíveis de oxidação e redução podem ocorrer nas proteínas que contêm sítios de ligação com metais, produzindo sinais que são reconhecidos por proteases celulares específicas que destroem tais proteínas sinalizadas (WOOD et al., 2005; STACCHIOTTI et al., 2009).

A peroxidação lipídica é causada pelo ataque de uma espécie reativa que retira um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono, caracterizando a etapa de iniciação. Este radical é estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Este dieno conjugado reage com O_2 e forma o radical peroxila, que por sua vez, tende a retirar átomo de H de outro ácido graxo poli-insaturado, caracterizando a reação em cadeia da etapa de propagação (NIKI, 2009). A combinação do radical peroxila com o H^\bullet abstraído gera o lipídeo hidroperóxido (LOOH). Este último, ao sofrer quebra forma aldeídos como malonaldeído. A terceira e última etapa da peroxidação lipídica, a etapa de terminação, instala-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferol e β -caroteno). Todas estas modificações oxidativas alteram a fluidez e a permeabilidade da membrana, promovendo expansão do líquido intracelular e risco de ruptura da membrana da célula e também das organelas, com conseqüente morte celular (NIKI, 2009; CATALA, 2009).

As substâncias envolvidas no binômio antioxidante/ pró-oxidante podem ser quantificadas associando as técnicas bioquímicas tradicionais de amostragem e determinação espectrofotométrica, técnicas cromatográficas, eletroanalíticas, ressonância magnética e espectrometria de massas. Os métodos espectrofotométricos e

cromatográficos são geralmente empregados para medir atividade enzimática, como por exemplo SOD, CAT, GPx, e/ou a concentração de tripeptídeos: glutatona total (GT), reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e aldeídos, como o malondialdeído (MDA). Estas medidas podem ser realizadas em tecidos, sangue e outros fluidos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LAGUERRE et al., 2009).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO E PROCESSO INFLAMATÓRIO NA FIBROSE CÍSTICA

O estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento de inúmeras doenças do pulmão, tais como FC, doença pulmonar obstrutiva crônica e asma. Todas estas condições são caracterizadas pelo desequilíbrio entre as quantidades de EROs e as defesas antioxidantes disponíveis. No pulmão, as EROs podem surgir de fontes endógenas, tais como o influxo de células inflamatórias ou de fontes exógenas, como poluição do ar e cigarro (KREINDLER et al., 2005). Com o aumento da produção de EROs, ocorre uma modificação nas vias respiratórias, levando à hiperatividade brônquica e ao aumento da inflamação (KELLY, 1999; AMIN; RATJEN, 2008).

Estudos referem a existência de desequilíbrio oxidante/antioxidante indicando o estresse oxidativo como ator importante no cenário da inflamação crônica que conduz à fibrose e à deterioração progressiva da função pulmonar na FC (TRUDEL et al., 2009). A inflamação das vias aéreas na FC se apresenta excessiva e prolongada devido à colonização bacteriana e em associação a um elevado número de neutrófilos. Elevados níveis de produtos de oxidação de lipídeos e de proteínas encontrados em fluidos de lavagem broncoalveolar, ar exalado condensado e escarro dos pacientes com FC, fornecem evidências de estresse oxidativo nestes fluidos de revestimento epitelial. Esses danos oxidativos se devem a um aumento da carga oxidante, resultante da liberação de oxidantes pelos neutrófilos e *P. aeruginosa*, que provocam infecção crônica das vias aéreas na FC, e a principal consequência é a peroxidação lipídica, ou degeneração oxidativa de lipídeos (TRUDEL et al., 2009; CIENCEWICKI; TRIVEDI; KLEBERGER, 2009).

Devido à sua interface com o ambiente, o pulmão é um dos principais órgãos-alvo do prejuízo causado por oxidantes exógenos, tais

como poluentes ambientais, e EROs endógenos geradas por células inflamatórias (CIENCEWICKI; TRIVEDI; KLEBERGER, 2009). O pulmão, assim como os demais tecidos, tem uma série de defesas antioxidantes, que ajudam a manter um equilíbrio do estado redox. Estes antioxidantes estão presentes no espaço intracelular, vascular e no fluido de revestimento do trato respiratório (REID; MISSO; AGGARWAL, 2007; AMIN; RATJEN, 2008).

A piocianina (N-metil-1-hidroxi-fenazina) é um pigmento que age como fator de virulência redox produzido pelo patógeno *P. aeruginosa*, conhecida por comprometer a depuração mucociliar (SADIKOT et al., 2005). O potencial redox padrão da piocianina (- 34 mV) é alto o suficiente para permitir uma transferência de elétrons entre NAD (P) H (- 320 mV) e glutathiona (-240 mV), e para que a piocianina reduzida rapidamente reaja com oxigênio molecular para produzir ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é o precursor de H_2O_2 e outras EROs (O'MALLEY, 2004). Estudo *in vitro* mostrou que a exposição de células epiteliais brônquicas humanas à piocianina aumentou a taxa de liberação de H_2O_2 celular três vezes acima da produção endógena normal (SCHWARZER et al., 2008). Medidas do potencial redox do compartimento citosólico, utilizando um sensor redox, mostrou que o pigmento oxidou o citosol a partir de um valor basal de -318 ± 5 mV para $-48,0 \pm 4,6$ mV dentro de 2 horas. Somente as células epiteliais brônquicas de homocigotos para delta F508 CFTR não secretaram Cl^- em resposta à piocianina ou H_2O_2 , indicando que esses oxidantes visam especificamente a CFTR Cl^- e não a outras condutâncias. O tratamento com piocianina total também diminuiu os níveis de glutathiona celular para 62% e os níveis celulares de ATP para 46% após 24 h, mostrando que a piocianina é um fator-chave para os ciclos redox no citosol, gera H_2O_2 , esgota glutathiona e ATP, e prejudica a função CFTR em pulmões infectados por *P. aeruginosa*. A quantidade de glutathiona reduzida (GSH) no fluido de revestimento do trato respiratório é particularmente elevada, e novas descobertas começam a revelar seu papel na defesa dos pulmões (KELLY, 1999; INNIS, 2008).

Estudos têm contribuído para a compreensão do papel da CFTR como regulador celular do transporte de glutathiona (QU et al., 2008; SCHWARZER et al., 2008). A expressão do gene CFTR é suprimida pelo estresse oxidativo causado por butil hidroquinona terciária (BHQ), um oxidante sub-letal que codifica um gene da subunidade enzimática glutamilsteína sintetase (-GCShs) para a síntese de glutathiona, aumentando seus níveis celulares, e reduzindo a expressão da CFTR em

células epiteliais T84 e Calu-3 (CANTIN et al., 2006). Em outro estudo observou-se a mutação da CFTR como causadora do aumento dos níveis de EROs e estresse oxidativo mitocondrial como consequência de menores níveis de GSH (CHILDERS, 2007). A célula glandular serosa submucosa é o principal local de expressão do canal iônico cloreto CFTR, que é conhecido pela disfunção na FC (BERGAMINI et al., 2009), sendo proposto que a secreção de ânions por células serosas, estimulada por EROs é dependente da CFTR (COWLEY; LINDSELL, 2002). A ausência deste mecanismo compensatório protetor pode expor o pulmão às EROs por longos períodos, o que poderia favorecer a doença no pulmão tal como ocorre na FC (CIENCEWICKI; TRIVEDI; KLEBERGER, 2009).

Algumas evidências apóiam a participação de EROs como mediadores de danos no tecido pulmonar na FC, tendo em vista estudos que mediram os produtos de oxidação de lipídeos e proteínas no plasma. Estes estudos têm mostrado que, em crianças com mais idade e em adultos, pode-se encontrar um aumento das concentrações plasmáticas de produtos de oxidação em pacientes com FC, em comparação a um grupo controle (PORTAL et al., 1995; REID; MISSO; AGGARWAL, 2007). Um estudo revelou correlação entre as concentrações plasmáticas de um marcador de oxidação lipídica (o malondialdeído) e a função pulmonar (BROWN; KELLY, 1994b). A origem desses produtos de oxidação não é clara, embora seja possível que eles sejam o resultado do estresse oxidativo associado à inflamação pulmonar, outros estudos também mostraram que há um defeito no metabolismo intracelular de oxigênio nos pacientes com FC (von RUECKER; BERTELE; HARMS, 1984; KOWALTOWSKI et al., 2009), o qual resulta no aumento dos níveis de EROs durante o processo oxidativo mitocondrial. Pode ser que este segundo mecanismo seja predominantemente responsável pelo aumento dos níveis plasmáticos de produtos de oxidação observados em pacientes com FC (KOWALTOWSKI et al., 2009).

O pulmão é o principal local onde se encontram altas concentrações do antioxidante glutatona, principalmente no fluido de revestimento epitelial (CANTIN et al., 2006). As concentrações de glutatona nos fluidos de revestimento epitelial são marcadamente diminuídas em pacientes com FC, contribuindo para o desequilíbrio oxidante/ antioxidante. Tem sido postulado que a CFTR, participando na exportação apical de glutatona reduzida (GSH), está diretamente envolvida na regulação da homeostase de GSH nos fluidos de revestimento epitelial. Assim, a CFTR poderia ser considerada como um

importante agente na homeostase antioxidante dos fluidos de revestimento epitelial e, assim, um causador intrínseco de desequilíbrio oxidativo em vias aéreas de pacientes fibrocísticos, bem como a CFTR de camundongos. Este último aparece como um modelo adequado para investigar a constituição do desequilíbrio de oxirredução na FC (LANDS, 1999; TRUDEL et al., 2009).

Estudo que avaliou marcadores do equilíbrio oxidante/antioxidante no plasma de 12 pacientes (7 não-fumantes e 5 fumantes) com fibrose pulmonar idiopática (FPI), no fluido broncoalveolar em 24 pacientes com FPI (17 não-fumantes e 7 fumantes) e de 31 indivíduos saudáveis (23 não-fumantes e 8 fumantes) observou que a capacidade antioxidante em equivalentes ao trolox (TEAC, o equivalente hidrossolúvel da vitamina E), no plasma foi menor para os pacientes não-fumantes com FPI, em comparação com os não fumantes saudáveis. Tendências semelhantes no plasma e no fluido broncoalveolar foram observadas em pacientes com FPI fumantes em comparação com indivíduos sem FPI, porém fumantes. O nível de glutathiona reduzida (GSH) foi menor no fluido broncoalveolar dos pacientes com FPI não-fumante em comparação com os não fumantes saudáveis. Em contrapartida, os níveis de GSH foram mais elevados nos pacientes fumantes com FPI do que nos doentes não-fumantes. Os níveis de produtos da peroxidação lipídica medidos no plasma através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram significativamente maiores em ambos os fumantes, e nos pacientes com FPI não-fumante em comparação com os não fumantes saudáveis (RAHMAN; MAC NEEW, 2000).

Recentes evidências de que a diminuição na expressão e função da CFTR são moduladas por estresse oxidativo sugerem que estes danos na proteína podem prejudicar a resposta adaptativa a oxidantes. A insuficiência pancreática na FC também aumenta a susceptibilidade a deficiências de antioxidantes lipofílicos (CANTIN, 2007).

Estudo realizado, em Montreal, avaliou a relação entre a tolerância à glicose e o estresse oxidativo em 31 crianças com FC, com idade entre 10 e 18 anos, os quais foram submetidos a teste oral de tolerância à glicose. Foi avaliada glutathiona no sangue, proteínas modificados pelo 4-hidroxinonenal (4-HNE-P), urina e 1,4-dihidroxinonano ácido mercaptúrico (DHN-MA), e perfil de ácidos graxos plasmáticos. A fim de verificar o perfil de inflamação e infecção, também foi avaliada a colonização pulmonar por *P. aeruginosa*, pelo teste de escarro de orofaringe. Cinquenta e dois por cento dos pacientes apresentaram níveis normais de tolerância à glicose, 42% apresentaram

intolerância à glicose, e 6% apresentaram diabetes melito relacionado à fibrose cística. Foi apresentada uma tendência do aumento da colonização por *P. aeruginosa* nas crianças com intolerância à glicose e com presença do diabetes melito relacionado à fibrose cística. As concentrações do 4-hidroxinoneal (4-HNE-P) aumentaram significativamente com a prevalência do diabetes melito, apresentando uma correlação positiva. Já o DHN-MA e o perfil de ácidos graxos apresentaram correlação negativa com valores alterados no teste de tolerância oral à glicose. Somente o marcador glutationa não apresentou diferença de valores entre os grupos com e sem alteração no teste. Este estudo evidencia um aumento do estresse oxidativo com a piora do metabolismo da glicose (NTIMBANE et al., 2008).

A infecção das vias respiratórias e processos inflamatórios no pulmão, bem como a perda da função da CFTR, são fontes potenciais de oxidantes e da deficiência de antioxidantes, contribuindo com o estresse oxidativo presente na FC.

Shmarina, Pukhalsky e Kokarovtseva (2001) estudaram o comportamento do marcador malondialdeído, considerado o principal produto final da peroxidação de lipídeos, o qual apresentou níveis elevados em pacientes com FC, quando estes foram comparados a um grupo controle. Foi investigado que a quase totalidade destes pacientes realizou tratamento com micro-esferas enzimáticas, iniciada nos períodos de exacerbação pulmonar aguda, ou seja, quando sua suscetibilidade ao estresse oxidativo é marcadamente aumentado. Esta terapia de reposição enzimática melhorou a absorção de nutrientes, o que pode ter resultado em uma elevação nos ácidos graxos poliinsaturados do plasma, nas lipoproteínas e colesterol. Deste modo, ocorreu a produção de novos alvos lipídicos para os radicais livres na circulação sanguínea, e os sistema de defesa antioxidante já debilitado nesses pacientes não foi suficiente para impedir a sua oxidação. Lagrange, Durieu e Ecochard (2004), identificaram níveis diminuídos nos marcadores de peroxidação lipídica TBARS e malondialdeído, justificando que a peroxidação lipídica é um processo complexo, cuja eliminação dos metabólitos plasmáticos ocorre de maneira rápida, sendo difícil sua interpretação.

Aumento na peroxidação de lipídeos também foi verificado em um estudo desenvolvido por um grupo australiano (REID; MISSO; AGGARWAL, 2007), com 17 indivíduos adultos comparados a um grupo de indivíduos saudáveis. Foram avaliados mediadores lipídicos derivados do processo inflamatório, as prostaglandinas E2 (PGE2) e 8-

iso-F2 α , (8-iso-PGF2 α), e os cisteinil-leucotrienos totais (cys-LT), avaliados no escarro. As análises foram realizadas em dois momentos: durante o período de exacerbação da FC, e após o tratamento dos sintomas. Os valores dos mediadores lipídicos encontrados em ambos os momentos não diferiram entre si, permanecendo aumentados quando comparados aos controles, sugerindo um intenso estresse oxidativo e geração de mediadores inflamatórios derivados de lipídeos persistentes nesses pacientes. Há várias explicações possíveis para esse estresse oxidativo, apesar do tratamento continuado e melhora clínica: primeiramente, a utilização dos antioxidantes endógenos tanto nos períodos de estabilidade como em exacerbação, devido às características inflamatórias da doença (SHMARINA; PUKHALSKY; KOKAROVITSEVA, 2001; WOOD et al., 2005); outra explicação seria o consumo constante de enzimas pancreáticas, e suplementação de vitaminas lipossolúveis, favorecendo o aumento de substratos para peroxidação lipídica (GRIMBLE; TAPIA, 1998; SHMARINA; PUKHALSKY; KOKAROVITSEVA, 2001). E, finalmente, o aumento da peroxidação lipídica pode estar ocorrendo devido a uma longa ação de pró-oxidantes que vem ocorrendo nestes pacientes, devido aos sintomas pulmonares e gastro-intestinais (WITKO-SARSAT et al., 1995)

Tem havido debate na literatura a respeito de a inflamação nos pulmões de crianças com FC ser: a) conseqüência de infecção (CANTIN, 1995; ROSENFELD; GILBSON; MCNAMARA, 2001), b) ou se a infecção é uma conseqüência de danos inflamatórios no tecido (GRIESE et al.; 2004; KETTLE; CHAN; OSBERS; 2004; THOMSON; BRENNAN; SENTHILMOHAN, 2010). Estudo desenvolvido por Kettle et al. (2004), com 22 indivíduos portadores de FC e 7 indivíduos saudáveis, apresentou níveis elevados da MPO (mediana 3,6 versus 0,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein; $p < 0,002$), mostrando aumento no processo inflamatório e aumento na PC (medianas 0,98 versus 0,40 nmol/mg proteína, $p < 0,001$), indicando presença de estresse oxidativo. No grupo com FC, houve uma resposta inflamatória a uma infecção, demonstrável a julgar pelo aumento da mieloperoxidase e da cloração da proteína. No entanto, em algumas crianças estes marcadores de inflamação foram elevados, mesmo quando eram indetectáveis infecções ativas. Isso pode indicar que a inflamação pode existir na ausência de infecção. Uma explicação seria o resultado de uma infecção prévia ou representaria uma infecção ativa que estava abaixo do limite de detecção (KETTLE; CHAN; OSBERS, 2004). Thomson, Brennan e Senthilmohan (2010) também

apresentam a mieloperoxidase como sendo a principal peroxidase identificada nas vias aéreas de crianças com FC, resultado esperado em uma inflamação caracterizada pelo aumento da presença de neutrófilos, como ocorre na FC.

A glutationa, um tripeptídeo antioxidante que desempenha um papel essencial na proteção das células epiteliais contra o estresse oxidativo e xenobióticos (CACCIATORE et al., 2010) teve seus níveis marcadamente diminuídos nos pacientes portadores de FC. Ocorre um transporte direto de GSH pela proteína CFTR, e os níveis de glutationa citoplasmática rapidamente aumentam nas células epiteliais expostas ao estresse oxidativo (FORMAN; HONGQIAO; RINNA, 2009; DAULETBAEV; RICKMANN; VIEL, 2010). Um estudo demonstrou que o estresse oxidativo pode suprimir a expressão da CFTR bem como sua função, representando uma resposta adaptativa do epitélio celular a um estresse oxidativo exógeno. Com isso, o conteúdo celular da GSH é aumentado devido ao transporte insuficiente (CANTIN et al., 2006). Além de regular a síntese de glutationa, as células epiteliais são capazes de modular o transporte transmembrana de glutationa. Níveis diminuídos de GSH foram demonstrados em inúmeros estudos (RAHMAN; MAC NEEW, 2000; CANTIN et al., 2006, CACCIATORE et al., 2010), e a principal característica destes níveis diminuídos refere-se ao transporte defeituoso da glutationa reduzida pela CFTR mutante.

Níveis diminuídos da enzima glutationa peroxidase (GPx) também foram identificados nos participantes de um estudo (WOOD; FITZGERALD; GARG, 2002) realizado com 15 crianças portadoras de FC em período de exacerbação, com análises antes e após 14 dias de antibioticoterapia. No grupo portador de FC, mesmo após o período de tratamento, os níveis da GPx continuaram diminuídos.

Thomson, Brennan e Senthilmohan (2010), ao compararem níveis de proteína carbonilada em lavados broncoalveolares das vias aéreas de pacientes infectados por *Pseudomonas aeruginosas*, com aqueles que apresentavam ausência desta bactéria, não identificaram diferenças significativas entre os grupos.

Estudos desenvolvidos por Linnane et al. (1998) e Jones et al. (2000) apresentaram aumento nas concentrações de NOx no ar exalado de pacientes com FC (STEWART, KATIAL, 2007). Entretanto, a maioria dos estudos tem observado baixos ou iguais níveis de NOx em pacientes com FC, quando comparados a indivíduos saudáveis (GRASEMANN et al., 2000; ROBROKS; ROSIAS; van DER VLIET,

2008; CHAPMAN; MORRISSEY; VASU, 2010; KEEN, 2010). Esta diminuição no NO_x pode ser considerada um índice negativo no prognóstico da doença (MATTOSCIO et al., 2010).

Estudos afirmam que existe um envolvimento de duas enzimas caracterizadas como redutases de nitratos, as nitrato redutases respiratórias NarA e NarG, encontradas no patógeno *P. aeruginosa*, na via de denitrificação no pulmão, e que o soro de pacientes com FC, apresenta antígenos específicos para estas enzimas (PLATT et al., 2008; SCHOBERT; JAHN, 2010). Estes estudos complementaram a informação de que a desnitrificação no pulmão ocorria apenas como um processo gerador de energia, pela produção e a conversão (redução) do produto intermediário, óxido nítrico (\bullet NO), um radical livre altamente reativo, que é produzido pela enzima nitrito redutase (NirS) e reduzido a óxido nitroso pela óxido nítrico redutase (NorCB) (SPIRO, 2007; PULLAN, 2008; SCHOBERT; JAHN, 2010).

Estudo desenvolvido por Martin et al. (2010) apresentou resultados aumentados para níveis séricos da PCR em 36 indivíduos adultos com FC, infectados por *P. aeruginosa*. Outro trabalho cujos níveis de PCR encontraram-se acima dos valores desejáveis, foi desenvolvido por Slobodianik et al. (2010) com 17 crianças portadoras de FC não hospitalizadas, com idade entre 3 meses e 10 anos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e correlacionar o estado nutricional, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, em crianças e adolescentes portadores de fibrose cística.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o estado nutricional pelos índices peso-para-idade (P/I), estatura-para-idade (E/I) e índice de massa corpórea em relação à idade (IMC/I);

- Avaliar a composição corporal (% de gordura e massa magra);
- Avaliar o estresse oxidativo medindo os níveis de glutathiona reduzida (GSH), e das atividades enzimáticas da catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx);
- Avaliar a atividade da mieloperoxidase (MPO), metabólitos de óxido nítrico (NOx) e proteína C reativa;
- Avaliar o dano protéico medindo os níveis de proteína carbonilada;
- Avaliar o dano lipídico por meio da peroxidação lipídica (TBARS).

4 SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo clínico controlado, realizado no Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), Florianópolis, Brasil. Os pacientes com diagnóstico de Fibrose Cística são integrantes da Associação Catarinense de Assistência ao Mucoviscidótico (ACAM). Este estudo é um sub-projeto do estudo sobre “Marcadores pró-inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfagia em fibrocísticos” financiado pelo CNPQ (# 474945/2008-1). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Seres Humanos do HIJG (# 048/2009) (ANEXO A) e está de acordo com a *World Medical Association, Declaration of Helsinki* (2008). Os familiares ou responsáveis foram esclarecidos sobre a pesquisa e avaliações, e após terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram incluídos no estudo (APÊNDICE A).

4.2 PROTOCOLO DE PESQUISA

O protocolo de pesquisa envolveu os seguintes itens: idade, sexo, data de nascimento; data do diagnóstico da doença; dados antropométricos (peso, altura e dobras cutâneas tricipital, bicipital, sub-escapular e supra-ilíaca); exames bioquímicos (hemograma, proteínas

totais, albumina e creatinina), esteatócrito e bacteriologia (*swab* de orofaringe).

4.3 SUJEITOS

A população de pacientes portadores de FC atendidos no HIJG compreendeu 101 crianças e adolescentes, dos quais, 10 faziam uso crônico de antibióticos e 2 apresentaram febre no momento da coleta, portanto, foram excluídos do estudo. Também foram excluídas 5 crianças com idade inferior a um ano, considerada idade mínima para a coleta, e 3 com diagnóstico recente da doença, motivo pelo qual não foi repassado o contato, pelos profissionais da Instituição, com justificativa de danos psicológicos; e 3 pais se recusaram a permitir a participação dos filhos no estudo.

Muitos números de telefone para contato eram inexistentes ou não atendiam (11 crianças), e os demais não tiveram consultas agendadas no ambulatório de acompanhamento nas datas em que foram realizadas as coletas de dados. Sendo assim, a amostra, formada por conveniência não probabilística, foi composta por 69 indivíduos, sendo 55 portadores de FC e 14 controles com idade entre 01 e 16 anos incompletos, distribuídos entre os grupos (Figura 2).

4.3.1 Grupo Controle

O grupo controle foi selecionado entre os pacientes do ambulatório de ortopedia do HIJG. *Critérios de inclusão*: crianças e adolescentes, sem diagnóstico de fibrose cística, e sem processo inflamatório, pareadas em idade e sexo com os participantes dos grupos portadores de Fibrose Cística e com diagnóstico nutricional de eutrofia. *Critérios de exclusão*: portadores de doenças inflamatórias (asma, doenças inflamatórias intestinais, doenças reumáticas), neurológicas, degenerativas, insuficiência renal e/ou diabetes, uso de antibióticos e ou hormônios, drogas antiinflamatórias não hormonais, em 6 meses antes da coleta do estudo, pacientes com sintoma de RGE (pirose, regurgitação de alimento, tosse freqüente).

4.3.2 Grupo Fibrose Cística sem Infecção por Bactérias Patogênicas

Critérios de inclusão: crianças e adolescentes com diagnóstico de Fibrose Cística, com comprometimento classificado como moderado pelo Escore de Schwachman-Kulczycki (1958), em avaliação realizada por profissional médico, estáveis clinicamente pelo menos 30 dias antes da coleta dos dados, que não apresentem resultado do exame bacteriológico de swab de orofaringe, do momento da coleta, positivo para as bactérias *Pseudomonas aeruginosas*, *Staphilococcus aureus* e Complexo *Burkholderia cepacia*. *Critérios de exclusão:* Pacientes em uso de antibióticos no período, ou até um mês anterior ao dia de coleta e aqueles em período de exacerbação pulmonar, definida como a presença de pelo menos três dos seguintes sintomas: tosse aumentada, produção de esputo aumentada e/ou alteração na aparência deste, febre de $\geq 38^{\circ}\text{C}$ por pelo menos 4 h em um período de 24 h em mais de uma ocasião na semana anterior, frequência respiratória aumentada e/ou dificuldade de respirar, novas descobertas no exame do tórax (por exemplo, chiados, crepitação, respiração ofegante) ou na radiografia do tórax, tolerância reduzida a exercícios, redução no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) $\geq 10\%$ do valor anterior dentro dos últimos 3 meses, absenteísmo da escola devido à doença na semana anterior, perda de peso ≥ 1 kg ou 5% do peso corporal associada com anorexia e ingestão reduzida da dieta.

4.3.3 Grupo Fibrose Cística com Infecção por Bactérias Patogênicas

Critérios de inclusão: crianças e adolescentes com diagnóstico de Fibrose Cística com comprometimento classificado como moderado pelo Escore de Schwachman-Kulczycki (1958), em avaliação realizada por profissional médico, estáveis clinicamente pelo menos 30 dias antes da coleta dos dados, que tenham resultado do exame bacteriológico de swab de orofaringe, positivo para as principais bactérias consideradas patogênicas para a doença *Pseudomonas aeruginosas*, *Staphilococcus aureus* e Complexo *Burkholderia cepacia*. *Critérios de exclusão:* Pacientes em período de exacerbação pulmonar, definida como a presença de pelo menos três dos seguintes sintomas: tosse aumentada, produção de esputo aumentada e/ou alteração na aparência do esputo, febre de $\geq 38^{\circ}\text{C}$ por pelo menos 4 h em um período de 24 h em mais de uma ocasião na semana anterior, frequência respiratória aumentada e/ou

dificuldade de respirar, novas descobertas no exame do tórax (ex.: chiados, crepitação, respiração ofegante) ou na radiografia do tórax, tolerância reduzida a exercícios, redução no FEV₁ ≥10% do valor anterior dentro dos últimos 3 meses, absenteísmo da escola devido à doença na semana anterior, perda de peso ≥ 1 kg ou 5% do peso corporal associada com anorexia e ingestão reduzida da dieta.

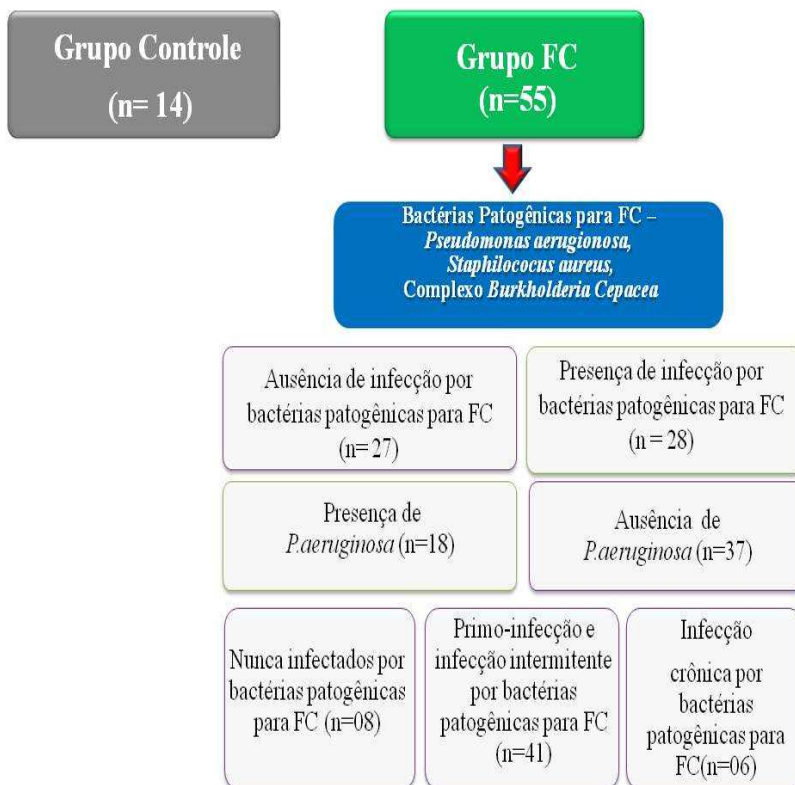


Figura 2 - Grupos avaliados no estudo

4.4 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

4.4.1 Avaliação Antropométrica

Medidas antropométricas foram tomadas, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization – WHO*), por um profissional treinado. O peso de crianças até 2 anos foi aferido utilizando balança digital pediátrica, marca Filizola[®] (Santo André, São Paulo, Brasil) com capacidade máxima 15 kg, resolução de 0,01 kg. Para as crianças maiores, foi utilizada balança digital BK 50 F (Balmak[®], Santa Bárbara d'Oeste, São Paulo, Brasil), com capacidade máxima de 150 kg e resolução de 0,1 kg. O paciente foi pesado em jejum, com a bexiga vazia, sem sapatos e com roupas leves (WHO, 1995). O comprimento das crianças até 2 anos, foi obtido com elas em posição deitada em decúbito dorsal, a cabeça fixada por um auxiliar, os joelhos estendidos e os pés formando um ângulo de 90°, empregando-se estadiômetro infantil graduado de 0 a 150 cm (resolução: 1mm), com placa móvel (Sanny[®], São Paulo, São Paulo, Brasil) (WHO, 1995). Nas crianças maiores a estatura foi verificada por meio de um antropômetro (Alturaexata[®], Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), com escala de precisão de 0,1cm. O paciente foi posicionado sobre a base do antropômetro, estando descalço, ereto, com o peso do corpo distribuído igualmente sobre ambos os pés, colocando as superfícies posteriores dos calcanhares, as nádegas e a região occipital em contato com a escala de medida e com a cabeça orientada de modo que a linha de visão ficasse perpendicular ao corpo, ou seja, paralela ao solo. O avaliado foi orientado a inspirar profundamente e, em apnéia respiratória, foi mensurada a estatura em metro e com uma aproximação de 0,1 cm. A referência para a mensuração foi o ponto mais alto da cabeça com pressão suficiente para comprimir o cabelo. Foram realizadas duas medidas e, calculando-se a média aritmética entre elas (WHO, 1995).

A classificação do estado nutricional foi realizada de acordo com os novos critérios adotados pela (WHO, 2006 e 2007), utilizando-se os indicadores peso-para-idade (P/I), estatura-para-idade (E/I), peso-para-estatura (P/E), e índice de massa corporal para a idade (IMC/I) (ANEXO B).

4.4.2 Determinação das Dobras Cutâneas

As medidas foram realizadas segundo metodologia da WHO (1995) por avaliador treinado, no lado direito do corpo, com o avaliado disposto em posição ereta. A circunferência do braço (CB) foi obtida no ponto médio lateral entre o ponto acromial da escápula e o olecrano da ulna com uma fita métrica inelástica, com precisão de 0,1 centímetro (cm). O avaliado foi orientado a permanecer de pé, com os braços estendidos livremente próximos ao corpo e com as palmas voltadas para as coxas. Foram realizadas três medições, sendo a média utilizada nas análises.

Foram aferidas as medidas da dobra cutânea tricipital (DCT), dobra cutânea bicipital (DCB), dobra cutânea subescapular (DCSE) e dobra cutânea supra-ilíaca (DCSI), utilizando o Compasso de Dobras Cutâneas *Lange skinfold caliper*[®] (Beta Technology Corporated, Santa Cruz, Califórnia, EUA), com escala em milímetros (mm). Foram realizadas três medições no lado direito, sendo utilizada a média entre as três medidas. DCT e DCB foram pinçadas no ponto médio do braço, sendo DCB na face anterior e DCT na posterior. A DCSE foi pinçada abaixo do ângulo inferior da escápula direita, aproximadamente a 45° do plano horizontal, e DCSI foi obtida obliquamente em relação ao eixo longitudinal, na metade da distância entre o último arco costal e a crista ilíaca, sobre a linha axilar medial.

A circunferência muscular do braço (CMB) foi calculada pela fórmula apresentada no ANEXO C, onde constam também as fórmulas para estimativa da área muscular e de gordura. Tanto CMB quanto área muscular do braço (AMB) e área gordurosa do braço (AGB) foram analisadas de acordo com Frisancho (1981), sendo considerados baixos os valores menores ou iguais ao percentil 5°.

Para estimativa do percentual de gordura corporal a partir das dobras cutâneas foram utilizadas as fórmulas propostas por Weststrate e Deurenberg (1988) de acordo com o sexo, e para a faixa etária de 0 a 18 anos, a partir do somatório de quatro dobras: DCB, DCT, DCSE, DCSI, que reflete uma relação entre percentual de gordura e densidade corporal, e foi posteriormente comparada às tabelas de normalidade para o percentual de gordura. As fórmulas utilizadas para o cálculo da densidade corporal e do percentual de gordura corporal estão discriminadas no ANEXO D (WESTSTRATE; DEURENBERG, 1988).

A quantidade de massa magra (kg), comparada com os dados do estudo de Weinsier et al. (1992).

4.5 SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA

A suplementação das vitaminas A, D, E e K, que era parte do protocolo de tratamento destes pacientes, e seguiu as doses propostas por Borowitz, Baker e Stallings (2002) está na Tabela 1. A suplementação de vitamina C, zinco e selênio obedeceu os valores propostos por Cantin (2007).

Tabela 1- Quantidade de vitaminas lipossolúveis para suplementação propostas pelo Consenso Americano de Fibrose Cística em 2006.

Idade	Vitamina A (UI)	Vitamina D (UI)	Vitamina E (UI)	Vitamina K (mg)
0 a 12 meses	1.500	40 – 50	40 a 50	0,3 - 0,5
1 a 3 anos	5000	80 – 150	80 a 150	0,3 - 0,5
4 a 8 anos	5.000 a 10.000	100 – 120	100 a 200	0,3 - 0,5
>8 anos	10.000	200 – 400	200 a 400	0,3 - 0,5

Fonte: BOROWITZ; BAKER; STALLINGS, 2002

De acordo com o protocolo de tratamento desta doença, as crianças com idade entre 1 e 3 anos recebem diariamente 2 ml do suplemento vitamínico SourceCF[®] (Eurand Pharmaceuticals, Huntsville, Alabama, EUA), cuja composição química encontra-se na Tabela 2. Os pacientes com idade entre 4 e 10 anos recebem 1 drágea ao dia do suplemento vitamínico ADEK's[®] (Axcan Pharma, Birmingham, Alabama, EUA), e os maiores de 10 anos recebem 2 drágeas ao dia deste mesmo suplemento, cuja composição química encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição nutricional dos suplementos vitamínico Source CF[®] e ADEK's[®].

Cada porção contém	SourceCF[®] (2 ml / dia)	ADEK's[®] (1drágea)
Vitamina A (retinol e beta-caroteno) (UI)	9.254 UI	11.502
Vitamina D (UI)	1.000	800
Vitamina E (acetato de alfa-tocoferol) (UI)	100	103
Vitamina K (fitonadiona) (UI)	600	800
Vitamina C (ascorbato sódico) (mg)	90	90
Tiamina (vitamina B ₁) (mg)	1	1
Riboflavina (mg)	1,2	1,2
Niacina (niacinamida) (mg)	12	12
Vitamina B ₆ (piridoxina HCl) (mg)	1,2	1,2
Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina) (mg)	8	8
Biotina (mcg)	30	30
Ácido Pantotênico (d-Panthenol) (mg)	6	6
Zinco (gluconato de zinco) (mg)	10	10

Fonte: Bulas dos medicamentos Source CF[®] e ADEK's[®]

4.6 ESCORE DE SHWACHMAN-KULCZYCKI

O escore de *Shwachman-Kulczycki* foi utilizado para classificar a gravidade da doença. Pontua atividades gerais, exame clínico, estado nutricional e achado radiológicos. Cada item apresenta o mesmo peso, vinte e cinco pontos, e o total de cem pontos representa escore perfeito. O paciente foi considerado com estado excelente, quando apresentava escore acima de 86, bom quando o escore estava entre 71 e 85, médio entre 56 e 70, moderado entre 41 e 55, e grave quando ≤ 40 (SHWACHMAN-KULCZYCKI, 1958) (ANEXO E).

4.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PULMONAR

A função pulmonar foi avaliada com espirômetro (Puritan-Bennett Corporation[®]), modelo Renaissance Spirometry System (Wilmington-NC, USA), segundo recomendações da American Thoracic Society. A obstrução respiratória foi avaliada pelos valores do Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (VEF₁) (PELLEGRINO et al., 2005).

4.8 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS NA AVALIAÇÃO CLÍNICA

As amostras sanguíneas para as determinações bioquímicas foram coletadas com o paciente com 10 h de jejum, com seringas e agulhas descartáveis na veia cubital. O sangue foi coletado pelo laboratório prestador de serviços ao Hospital Infantil Joana de Gusmão, Ciência Laboratório Médico Ltda[®]. As análises laboratoriais foram realizadas imediatamente após a coleta, no soro (com exceção do hemograma). Para obtenção do mesmo, as amostras foram incubadas 10 minutos em banho-maria a 37°C e posteriormente centrifugadas a 3.000 RPM por 10 minutos.

4.8.1 Proteína Total, Albumina e Creatinina

A proteína total foi analisada no soro pelo método Biureto, com valores de referência de 6,0 a 8,0 g/ dL (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949). A albumina foi determinada pelo método verde de bromocresol, utilizando o Kit Labtest Diagnóstica[®], por meio de colorimetria, sendo o valor de referência de 3,5 a 5,5 g/ dL (ASHWOOD; BURTIS, 1996). A creatinina foi determinada usando-se o método automático cinético no aparelho Alcyon 300 Abbot. A faixa de normalidade da creatinina é de 0,4 a 1,3 mg/ dL (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

4.8.2 Hemograma

O hemograma foi analisado no sangue total pelo método semi-automatizado. Os valores de referência (ASHWOOD; BURTIS, 1996; MCPHERSON; PINCUS, 2006; WALLACH, 2003) para os leucócitos, neutrófilos segmentados e linfócitos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de referência de biomarcadores clínicos hospitalares

Análise Laboratorial	Valor de Referência	Faixa Etária
Hemácias (mL/mm ³)	4,2 - 5,6	1 - 18 anos
Hemoglobina g/dL	12,5 - 16,1	6 meses a 18 anos
Hematócrito (%)	36 - 47	6 meses a 18 anos
Leucócitos (p/mm ³)	4.000 a 10.000	6 meses a 18 anos
Neutrófilos segmentados (p/mm ³)	1.000 - 6.000	1 - 2 anos
	1.200 - 6.000	2 - 9 anos
	1.300 - 6.000	9 - 17 anos
Linfócitos (p/mm ³)	1.800 - 9.000	1 - 2 anos
	1.000 - 5.500	2 - 9 anos
	1.300 - 3.500	9 - 17 anos
Monócitos (p/mm ³)	0 a 1000	1 - 18 anos

Fonte: ASHWOOD; BURTIS, 1996; MCPHERSON; PINCUS, 2006; WALLACH, 2003.

4.8.3 Teste Sudam III e Esteatócrito

O Teste Sudam III e Esteatócrito avaliaram a perda de gordura fecal. O teste SUDAM III, identificou a presença ou ausência de gordura nas fezes (SILVEIRA-JÚNIOR, 1988) e o teste de Esteatócrito, realizado pelo método *Phuapradit*, avaliou o percentual de gordura nas fezes, sendo considerados adequados valores inferiores a 4% (MELO; SILVEIRA, 1995; VALLADA, 1988).

4.8.4 Determinação bacteriológica

As amostras de escarro expectorado foram obtidas pela manhã, tendo o paciente sido orientado para higiene oral apenas com água. A amostra foi coletada com o auxílio de um *swab* estéril, introduzido na cavidade orofaríngea, diretamente em um frasco estéril de boca larga, após esforço de tosse profunda. O material foi processado logo após a coleta, segundo metodologia de Gilligan (2006).

A avaliação foi feita pelo exame microscópico de Gram cujos homogeneizados formados a partir de 0,5 mL da porção purulenta do escarro adicionado a 1 mL de solução salina estéril foram inoculados em uma placa contendo ágar sangue de carneiro (ASC), uma placa contendo ágar chocolate (ACH) suplementado com 0,1% de extrato de levedo (Oxoid, São Paulo, Brasil) e com 20 µg/mL de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), outra placa contendo o meio ágar eosina azul de metileno (EMB) e uma última contendo meio seletivo para "*B. cepacia*" (BCSA) (MCPHERSON; PINCUS, 2006). Uma das placas de ASC e a de ACH foram incubadas na ausência de oxigênio (sistema GasPak, Becton Dickinson, Maryland, EUA) para impedir eventual crescimento de bactérias aeróbias estritas. As placas restantes foram incubadas em aerobiose a 35°C, examinadas após 48h, mantidas à temperatura ambiente, e reexaminadas após outras 48h.

A partir dessas amostras foi possível estabelecer um escore para infecção, no qual a contagem para patógenos igual a zero indicava ausência de infecção, e a contagem mista de flora oral ou colônias isoladas numa escala $< 10^2$ unidades formadoras de colônias (ufc)/mL, ou $\geq 10^5$ (ufc)/mL, caracterizava presença de infecção para FC.

4.9 AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO

Amostras de sangue (8 mL) foram colhidas à vácuo em tubo contendo anticoagulante EDTA para realização da dosagem da GSH, CAT, GPx, PC, TBARS, MPO, PCR e NO. Alíquotas de sangue total foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 12% (1:4, v:v) e estocadas imediatamente em nitrogênio líquido (-170°C), até a realização da análise de GSH. A separação dos eritrócitos e plasma foi

realizada pela centrifugação a 2.500 g durante 10 minutos do sangue total, obtendo-se a fração plasmática e eritrócitos. As amostras foram estocadas em freezer a -80°C , com exceção do plasma utilizado para análise do TBARS, que foi estocado em nitrogênio líquido (-170°C), até a realização das análises. Para obtenção dos hemolisados utilizados nas análises de CAT e GPx, os eritrócitos foram lavados 2 vezes com solução salina e depois centrifugados (5.000 g por 3 min) para posteriormente sofrerem lise por sucessivos congelamentos e descongelamentos. Uma última centrifugação (5.000 g, por 5 min) forneceu o sobrenadante (hemolisado).

4.9.1 Glutathiona Reduzida (GSH)

A concentração de GSH no sangue total foi determinada pelo método de Beutler, Duron e Kelly (1963). A adição de 0,2 mL de ácido nitrobenzóico (DTNB) 2.525 mM nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão fosfato 0,8M, pH 8,0 e 0,1 mL do extrato ácido (0,2 mL de TCA a 12% e 0,8 mL de sangue total), permitiu após 2 minutos, a obtenção da formação máxima do ânion tiolato (TNB), de cor amarela, foi mensurada a 412 nm, em espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália). As concentrações foram expressas em $\mu\text{mol}/\text{mL}$ de glutathiona reduzida.

4.9.2 Catalase (CAT)

A CAT foi determinada nos hemolisados utilizando-se o método descrito por Aebi (1984). Este ensaio quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em 240 nm, pela enzima presente na amostra. Nesta determinação foram utilizados 3 mL de uma solução de peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, preparada e titulada no dia da análise, à qual foi adicionado 30 μL da amostra e o valor da constante (k) de velocidade da atividade da enzima, calculado nos segundos iniciais, utilizando espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores expressos em $\text{mmol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mL}$.

4.9.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

A Glutathione peroxidase (GPx) foi dosada utilizando espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália), a 340 nm pelo sistema de glutathione/ NADPH/ glutathione reductase pela dismutação do terebutilhidroperóxido (FLOHÉ; GUNZLER, 1984). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$.

4.9.4 Determinação da Lipoperoxidação

As substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidas no plasma dos indivíduos. O teste usado para avaliar o dano celular foi baseado no trabalho descrito por Ohkawa, Oshishi e Yagi (1979), e Bird e Draper (1984). O plasma foi precipitado pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 12% e agitado vigorosamente por 5 segundos (1 mL de TCA a 12% para 100 μL da amostra). Em seguida, foi incubado por 60 minutos a 100°C na presença de 0,9 mL de tampão Tris-HCL 60 mM, pH 7,4 (0,1 mM DPTA) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73%. Após a incubação, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5°C, e posteriormente centrifugado. A leitura foi realizada em 535 nm, em espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália) e os valores expressos em nmol/mL .

4.9.5 Determinação da Proteína Carbonilada (PC)

Oxidação de proteínas foi quantificada em níveis de proteína carbonilada de acordo com o método de Levine et al. (1990), baseado em detecção espectrofotométrica do produto final da reação do 2,4-dinitrofenilhidrazina com a proteína carbonilada para formar proteína hidrazonas em 370 nm, sendo os resultados expressos em nmoles por miligrama de proteína, usando $\varepsilon = 22 \mu\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Leitura realizada

em espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália).

4.9.6 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Volumes de 100 μL de soro foram transferidos para cubetas e a reação bioquímica foi iniciada com a adição de 360 μL de meio tampão (0,167 mg/ mL de o-dianisidina 2 HCL e 0,0005% de H_2O_2) (RAO et al. 1993). Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 μL de azida sódica (1%). A seguir, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante transferido em cubetas, para posterior leitura das densidades óticas (450 nm) em espectrofotômetro Organon Teknica (Roseland-NJ, EUA). Curvas-padrão com concentrações conhecidas da mieloperoxidase (0,7-140 mU/ mL) também tem suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos em mU/ mL, com o auxílio da equação da reta.

4.9.7 Proteína C Reativa (PCR)

A dosagem da proteína C reativa foi feita pelo método de nefelometria. Partículas de poliestireno revestidas com um anticorpo monoclonal específico contra a PCR humana, quando misturadas com amostras que contém PCR, formam aglutinados que dispersam a luz aglutinada. O resultado é avaliado por comparação com um padrão de concentração conhecida. Equipamento: Behring Nefelômetro BN 2 (Dade Behring, Germany, sensibilidade de 3mg/L) no soro. Valores expressos em mg/ L. Valores de referência no método: < 3mg/L.

4.9.8 Metabólitos do Óxido Nítrico (NOx)

A determinação dos metabólitos de óxido nítrico (NOx) foi realizada no soro pela mensuração das concentrações de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), utilizando a reação de Griess, conforme a metodologia descrita por Green et al. (1982). A reação foi quantificada pela da medida da densidade ótica (543 nm) em leitor de ELISA (Organon-Teknica, - Roseland-NJ, USA). Resultado expresso em $\mu\text{mol/L}$.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A digitação de todos os dados foi realizada em duplicata para comparação e detecção de possíveis erros. Os campos não coincidentes foram conferidos nos originais e retificados.

Anteriormente à análise estatística, foi aplicado o teste de normalidade e homogeneidade dos dados, Kolmogorov Smirnov, sendo então aplicado o teste estatístico apropriado. Variáveis contínuas foram expressas em média e erro padrão da média, se apresentasse distribuição normal, ou intervalo interquartil (IQ) (25 a 75%) quando a distribuição foi não normal. Variáveis categóricas foram apresentadas por frequência de distribuição. A diferença entre as médias nos grupos foi verificada por *Kruskal Wallis*, seguida do teste *post-hoc* de Tamahne, para observar a significância da diferença de média entre todos os grupos.

Os índices antropométricos recomendados para classificação da WHO (2005/2006) foram calculados no programa WHO Anthro Plus (2008). Os softwares Microsoft Excel[®] (Microsoft Office XP, Redmond, Washington, USA) e Statistical Package for the Social Science[®] for Windows (SPSS Inc, 2006, Chicago, IL, USA) (versão 16.0) foram utilizados para as análises dos dados, sendo adotada significância mínima de 5% ($p < 0,05$).

5 ARTIGO ORIGINAL

Marcadores Inflamatórios e de Estresse Oxidativo em Crianças e Adolescentes com Fibrose Cística**RESUMO**

Este estudo avaliou os marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, proteína C reativa (PCR), atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), metabólitos do óxido nítrico (NOx), níveis da glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT), de proteína carbonil (PC), e de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, (TBARS), associando-os com o estado clínico de crianças e adolescentes com Fibrose Cística (FC). Consistiu em estudo clínico em 55 pacientes com FC, idade mediana de 5,62 anos (interquartil IQR=2,25-7,83). Grupo controle (GC) (n=14) sem FC e normais para o peso, idade mediana de 3,83 anos (IQR=2,25-7,83). Estado nutricional prevalente foi eutrofia sem diferença entre os grupos FC e GC, escores-Z médios: peso-para-idade= $-0,21 \pm 0,25$ e de $-0,34 \pm 0,21$, estatura-para-idade de $-0,69 \pm 0,44$ e $-0,51 \pm 0,23$, e IMC-para-idade de $0,78 \pm 0,34$ e $-0,28 \pm 0,20$. No grupo FC em relação ao GC observa-se níveis aumentados de TBARS ($p=0,031$), PC ($p=0,031$) e MPO ($p=0,001$), e níveis diminuídos da GSH ($p=0,001$) e GPx ($p=0,024$). Considerando os aumentos referidos no TBARS, PC e MPO, e a diminuição nos níveis de GSH, é sugerido um quadro de estresse oxidativo (EO) sistêmico nos pacientes com FC, porém, aparentemente a presença de infecção não implicou, bem como os períodos de infecção bacteriana não foram determinantes no estabelecimento e/ou exacerbação do EO.

Palavras chave: Fibrose cística. Biomarcadores. Inflamação. Estresse oxidativo. Antioxidantes. Crianças. Adolescentes

Introdução

A exacerbação na produção de oxidantes e do comprometimento das defesas antioxidantes conduzem ao estresse oxidativo (EO) em pacientes com Fibrose Cística (FC) [1,2,3]. A produção excessiva de radicais livres ocorre principalmente devido às anormalidades no transporte de íons nas vias respiratórias [4]. A fibrose presente nos pulmões contribui para a secreção de muco espesso pelas glândulas submucosas [5]. Com os ductos obstruídos, os pulmões estão predispostos a ter infecções, por presença de colonização bacteriana crônica, prioritariamente por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* [6,7,8,9]. Alterações pulmonares contribuem para o aumento do metabolismo energético, em parte pelo aumento do trabalho respiratório, e severidade da infecção pulmonar, o que favorece deficiências nos fatores antioxidantes [10], e o estabelecimento de subnutrição na FC [11].

O tripeptídeo glutationa reduzida (GSH), presente no fluido epitelial do trato respiratório inferior, constitui uma das primeiras linhas de defesa antioxidante para proteger o tecido pulmonar de toxinas inaladas e manutenção da produção de surfactante [12]. O tecido pulmonar é particularmente vulnerável ao ataque oxidativo, por inalação do oxigênio puro, toxinas do ar, e liberação de espécies reativas de oxigênio por fagócitos [13,14]. As concentrações de glutationa são marcadamente diminuídas nos fluidos de revestimento epitelial de pacientes com FC (cerca de 5-10% do normal) e plasma sanguíneo (cerca de 50% do normal) [15,16,17]. Investigações têm contribuído para a compreensão da importância do papel da *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR) como regulador celular do transporte de glutationa [18,19]. A CFTR poderá estar diretamente envolvida na regulação da homeostase de GSH nos fluidos de revestimento epitelial na exportação apical de GSH. A disfunção causada na CFTR diminui o transporte da GSH para o meio extracelular por meio das membranas das células epiteliais [12,18,19].

Dos seis tipos de enzimas glutationa-peroxidases (GPx) conhecidas, quatro têm papel antioxidante em todos os compartimentos das células e interstícios [20]. Esta família de enzimas possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima, e atuam na redução do peróxido de hidrogênio, lipídeos e hidroperóxidos de

fosfolipídeos, diminuindo a propagação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Também reduzem hidroperóxidos intermediários nas vias da cicloxigenase e da lipoxigenase e diminuem a produção de prostaglandinas e leucotrienos inflamatórios [20]. Modulam ainda, a redução do peróxido de hidrogênio e a produção de superóxido [21], utilizando o GSH como doador de elétrons para a redução. O tripeptídeo glutationa, após ser oxidado, pode retornar à sua forma reduzida através da ação da enzima glutationa redutase (GR) [21,22]. Além destes antioxidantes, tem-se a enzima catalase (CAT), que atua na decomposição do peróxido de hidrogênio a oxigênio e água. Esta enzima é encontrada principalmente no peroxissoma, organela responsável pela desintoxicação celular, oxidação de ácidos graxos de cadeia longa e que é fonte de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio *singlete* [23].

As espécies reativas de oxigênio destroem as membranas lipídicas celulares, e os produtos da peroxidação lipídica têm sido detectados no ar exalado, e amostras de sangue periférico e urina de pacientes com FC [24].

Durante o estresse oxidativo, ocorre fragmentação das cadeias e oxidação de muitos aminoácidos, com produção de compostos carbonilados. Além disso, processos reversíveis de oxidação e redução podem ocorrer nas proteínas que contêm sítios de ligação com metais, produzindo sinais que são reconhecidos por proteases celulares específicas que destroem tais proteínas sinalizadas [25, 26].

Dada a presença sistemática de infecção na doença pulmonar FC, o acompanhamento desse processo por meio de marcadores de estresse oxidativo podem desempenhar um papel fundamental na progressão da doença e acompanhamento do estado clínico.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar biomarcadores de estresse oxidativo tais como a glutationa reduzida (GSH), glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT), proteína carbonil (PC), substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, (TBARS), atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), metabólitos do óxido nítrico (NOx), proteína C reativa (PCR) e associa-los com o estado clínico de crianças e adolescentes com FC.

Materiais e Métodos

Amostra do Estudo

Cinquenta e cinco crianças e adolescentes que tinham diagnóstico de FC (n= 26, sexo masculino e n= 29, sexo feminino) com idade mediana de 5,62 anos (intervalo interquartil (IQR) 3,43 - 9,14) participaram de um estudo clínico, entre março-2009 a outubro-2010. A população fazia parte da Associação Catarinense de Assistência ao Mucoviscidótico (ACAM) do Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis, SC, Brasil. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital (#048/2008) e estava de acordo com a *World Medical Association-Helsinki Declaration* [27]. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado pelos responsáveis. No período do estudo, o ambulatório dos mucoviscidóticos tinha 101 pacientes em atendimento, dos quais, foram excluídos: 10 com uso crônico de antibióticos, 02 com febre no momento da coleta, 05 com idade menor um ano, 03 com problemas psicológicos, 03 recusas, 23 por falta de contato.

Foram estudados quatorze controles, com idade entre 1 e 16 anos incompletos, e mediana de 3,83 anos (IQ 2,25 - 7,83) (n= 10, sexo masculino e n= 04, sexo feminino) sem fibrose cística e sem processo inflamatório, normais para o peso, e pareados em idade e sexo com o grupo FC. Excluiu-se os indivíduos portadores de doenças inflamatórias (asma, doenças inflamatórias intestinais, doenças reumáticas), neurológicas, degenerativas, insuficiência renal e/ou diabetes melito, uso de antibióticos e ou hormônios, drogas antiinflamatórias não hormonais, até 6 meses antes da coleta.

O grupo FC foi caracterizado pela bacteriologia realizada, no momento da coleta de dados, de acordo com a presença de microorganismos patogênicos para FC: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Complexo Burkholderia cepacia*. Além destas bactérias pesquisou-se a presença de *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aspergillus fumigatus*, *Acromobacter xylosoxidans* e micobactérias atípicas. Classificados da seguinte maneira: **Nunca infectados por bactérias patogênicas para FC** - pacientes que nunca apresentaram culturas positivas dos microorganismos patogênicos para FC, **Primoinfecção** - primeira cultura positiva para microorganismos patogênicos para FC, **Infecção Intermitente** - Infecções, por mesma bactéria patogênica, que não atingiu a frequência de três episódios em seis meses, e **Infecção Crônica** - três culturas positivas, com intervalo maior que um mês entre elas, em um período de seis meses, por mesma bactéria patogênica.

Dados clínicos

O prognóstico da doença foi avaliado pelo Escore de Shwachman-Kulczyck (1958) [28]. Este escore, utilizado para classificar a gravidade da doença, pontua as atividades gerais tais como exame clínico, estado nutricional e achado radiológicos. Cada item apresenta o mesmo peso, vinte e cinco pontos, e o total de cem pontos representa escore perfeito. O estado do paciente foi considerado excelente quando o escore foi acima de 86, bom quando o escore estava entre 71 e 85, médio entre 56 e 70, moderado entre 41 e 55, e grave ≤ 40 [28]. Considerou-se ainda a idade do diagnóstico da doença.

Suplementação vitamínica

A suplementação das vitaminas A, D, E e K, era parte do protocolo de tratamento destes pacientes, e seguiu as doses propostas por Borowitz, Baker e Stallings (2002) [29]. A suplementação de vitamina C, zinco e selênio obedeceu aos valores propostos por Cantin (2007) [30].

Avaliação da Função Pulmonar

A função pulmonar foi avaliada com espirômetro da Puritan-Bennett Corporation[®], modelo Renaissance Spirometry System (Wilmington-NC, USA), de acordo com as recomendações da *American Thoracic Society*. A obstrução respiratória foi avaliada pelos valores do Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (VEF₁) [31].

Microbiologia

A microbiologia foi avaliada por procedimentos padrões clínicos, e as amostras foram coletadas por profissional de enfermagem, com o paciente em jejum de 10 horas. O escarro para a bacteriologia foi coletado com o auxílio de um *swab* estéril, introduzido na cavidade

orofaríngea, diretamente em um frasco estéril de boca larga, após esforço de tosse profunda. O material foi processado logo após a coleta, segundo metodologia de Gilligan et al. (2006) [32] sendo avaliado pelo exame microscópico de Gram, cujos homogeneizados formados a partir de 0,5 mL da porção purulenta do escarro adicionado a 1 mL de solução salina estéril foram inoculados em uma placa contendo ágar sangue de carneiro (ASC), uma placa contendo ágar chocolate (ACH) suplementado com 0,1% de extrato de levedo (Oxoid[®], São Paulo, SP, Brasil) e com 20 µg/mL de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Sigma-Aldrich[®], São Paulo, SP, Brasil), outra placa contendo o meio ágar eosina azul de metileno (EMB) e uma última contendo meio seletivo para Complexo *Burkholderia cepacea* [33]. Uma das placas de ASC e a de ACH foram incubadas na ausência de oxigênio (sistema GasPak, Becton Dickinson, Maryland, EUA) para impedir eventual crescimento de bactérias aeróbias estritas. As placas restantes foram incubadas em aerobiose a 35°C, examinadas após 48h, mantidas à temperatura ambiente, e reexaminadas após outras 48h. A partir dessas amostras, foi possível estabelecer um escore para infecção, no qual a contagem para patógenos igual a zero indicava ausência de infecção, e a contagem mista de flora oral ou colônias isoladas numa escala $< 10^2$ unidades formadoras de colônias (ufc)/ mL, ou $\geq 10^5$ (ufc)/mL, caracterizava presença de infecção para FC.

Avaliação nutricional

Avaliação antropométrica foi realizada de acordo com a *World Health Organization* (WHO) [34], por um profissional treinado. O peso de crianças até 2 anos foi tomado na balança digital pediátrica - Filizola[®] (Santo André, São Paulo, Brasil) com capacidade máxima 15 kg, resolução de 0,01 kg e as crianças maiores com a balança digital BK 50 F (Balmak[®], Santa Bárbara d'Oeste, São Paulo, Brasil), de capacidade máxima de 150 kg e resolução de 0,1 kg [34]. O comprimento das crianças até 2 anos, foi obtido com estadiômetro infantil graduado de 0 a 150 cm, resolução: 1 mm (Sanny[®], São Paulo, São Paulo, Brasil) Nas crianças acima de 2 anos a estatura foi verificada com antropômetro (Alturaexata[®], Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), de escala precisão de 0,1 cm [34]. O protocolo incluía: paciente em jejum, bexiga vazia, sem sapatos e roupas leves. O índice de massa

corporal (IMC) foi calculado pela fórmula: $IMC = P/(A)^2$, sendo P= peso, em quilogramas, e A= altura, em metro elevado ao quadrado, (kg/m^2). O estado nutricional foi diagnosticado pelo IMC segundo a WHO (2006, 2007) [35,36]. Para aferição da medida de circunferência e das dobras cutâneas utilizou-se fita métrica inelástica, com precisão de 0,1 centímetro (cm) e o Compasso de Dobras Cutâneas Lange skinfold caliper[®] (Beta Technology Corporated - Santa Cruz, Califórnia, EUA), com escala em milímetros (mm). Para a circunferência braquial (CB) e a dobra cutânea tricipital (DCT) utilizou-se os valores de referência segundo Frisancho (1981) [37]. As dobras cutâneas bicipital (DCB), subescapular (DCSE) e supra-ilíaca (DCSI) foram aferidas para o posterior cálculo de percentual de gordura corporal. Foram calculados os valores em quilogramas da massa gorda e massa magra [38]. A quantidade de massa magra (kg), foi comparada com os dados do estudo de Weinsier et al. (1992) [39].

Parâmetros clínicos

O sangue foi coletado com jejum de 10 h. Os dados bioquímicos avaliados e seus respectivos valores de referência foram a hemoglobina (11,5 - 14,5 g/ dL), hematócrito (33 - 43%), leucócitos ($4000 - 12.000/mm^3$), neutrófilos segmentados ($1200 - 6.000/mm^3$) e linfócitos ($1000 - 5.500/mm^3$) foram determinados pelo método semi-automatizado [33, 40,41]. A proteína total foi analisada no soro pelo método Biureto, com valores de referência de 6,0 a 8,0 g/dL [42]. A albumina (3,5 a 5,5 g/ dL) foi utilizado o Kit Labtest Diagnóstica[®] (Lagoa Santa, MG, Brasil) e avaliada por meio de colorimetria do equipamento Cobas Mira equipment (Roche[®], Rio de Janeiro, RJ, Brasil) [43]. A creatinina foi determinada usando-se o método automático cinético no aparelho Alcyon 300[®] (Abbot, Goiânia, GO, Brasil). A faixa de normalidade adotada foi de 0,4 a 1,3 mg/ dL [42,32] [33,44].

Biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação

Amostras de sangue (8 mL) foram colhidas à vácuo em tubo contendo anticoagulante EDTA para realização da dosagem da GSH,

CAT, GPx, PC, TBARS, MPO, PCR e NO. Alíquotas de sangue total foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 12% (1:4, v:v) e estocadas imediatamente em nitrogênio líquido (-170°C), até a realização da análise de GSH. A separação dos eritrócitos e plasma foi realizada pela centrifugação a 2.500 g durante 10 minutos do sangue total, obtendo-se a fração plasmática e eritrócitos. As amostras foram estocadas em freezer a -80°C, com exceção do plasma utilizado para análise do TBARS, que foi estocado em nitrogênio líquido (-170°C), até a realização das análises. Para obtenção dos hemolisados utilizados nas análises de CAT e GPx, os eritrócitos foram lavados 2 vezes com solução salina e depois centrifugados (5.000 g por 3 min) para posteriormente sofrerem lise por sucessivos congelamentos e descongelamentos. Uma última centrifugação (5.000 g, por 5 min) forneceu o sobrenadante (hemolisado).

Glutathione Reduzida (GSH)

A GSH foi determinada pelo método de Beutler et al. (1963) [45] no sangue total. A obtenção da formação máxima do ânion tiolato (TNB), de cor amarela, é mensurada a 412nm, em espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália), e suas concentrações expressas em $\mu\text{mol}/\text{mL}$ de glutathione reduzida.

Catalase (CAT)

A CAT foi determinada nos hemolisados utilizando-se o método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984) [46], ensaio que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em 240 nm, pela enzima presente na amostra. O valor da constante de velocidade da atividade da enzima (k) foi calculado nos segundos iniciais, e os valores expressos em $\text{mmol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mL}$.

Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx foi dosada a 340 nm por espectrofotometria, pelo sistema de glutatona NADPH/ glutatona redutase pela dismutação do tercbutilhidroperóxido [47], e os valores expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$.

Biomarcador de Lipoperoxidação

As substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidas no plasma dos indivíduos. O teste baseou-se no trabalho descrito por Ohkawa, Oshishi e Yagi [48] e Bird e Draper (1984) [49]. O plasma foi precipitado pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 12%, incubado por 60 minutos a 100°C na presença de 0,9 mL de tampão Tris-HCL 60 mM, pH 7,4 (0,1 mM DPTA) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73%. Após a incubação, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5°C , e posteriormente centrifugado. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 535 nm, e os valores expressos em nmol/mL .

Biomarcador de oxidação de proteínas

A proteína carbonilada foi determinada de acordo com o método de Levine et al. (1990) [50]. O produto final da reação do 2,4-dinitrofenilhidrazina com a proteína carbonilada, formando proteínas hidrazonas em 370 nm, foi detectado utilizando-se um espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália). Os resultados foram expressos em nmoles por miligrama de proteína, usando $\epsilon = 22 \mu\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A MPO foi medida no soro de acordo com o método desenvolvido por Rao *et al.* (1993) [51], estimado pela medida colorimétrica a 450 nm, utilizando-se leitor de ELISA (Organon Teknika - Roseland-NJ, USA). Resultados foram expressos como mU/mL.

Metabólitos de óxido nítrico (NOx)

O NOx foi obtido no soro pela mensuração das concentrações de nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), utilizando a reação de Griess, conforme a metodologia descrita por Green et al. (1982) [52]. A reação foi quantificada pela medida da densidade ótica (543 nm) em leitor de ELISA (Organon-Teknica, - Roseland-NJ, USA). Resultados expressos em µmol/L.

Proteína C reativa (PCR)

A PCR foi dosada pelo método de nefelometria em aparelho BN II (Dade Behring, Germany, sensibilidade de 3mg/ L) no soro. Resultados expressos em mg/ L.

Análise Estatística

A digitação de todos os dados foi realizada em duplicata para comparação e detecção de possíveis erros. Os campos não coincidentes foram conferidos nos originais e retificados. Os índices antropométricos recomendados para classificação da WHO (2006/2007) [34,35] foram calculados no programa WHO Anthro Plus (2008) [53]. Anteriormente à análise estatística foi aplicado teste de normalidade e homogeneidade dos dados, Kolmogorov Smirnov, sendo então aplicado o teste estatístico apropriado. Variáveis contínuas foram expressas em média e erro padrão da média, quando tinham distribuição simétrica, ou por intervalo interquartil (IQ) (25 a 75%) quando a distribuição era assimétrica. Variáveis categóricas foram apresentadas por frequência de distribuição. A diferença entre médias entre os grupos foi verificada por Kruskal Wallis, seguidas do teste *post-hoc* de Tamahne, quando necessário observar a significância da diferença de média entre todos os grupos. Os softwares Microsoft Excel® (Microsoft Office XP, Redmond, Washington, USA) e Statistical Package for the Social Science® for Windows (SPSS Inc, 2006, Chicago, IL, USA) (versão

16.0) foram utilizados para as análises dos dados, sendo adotada significância mínima de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Características da amostra do estudo

A distribuição dos grupos por idade foi homogênea, porém, por sexo apresentou proporção heterogênea, com predominância do sexo feminino em ambos os grupos: Grupo Controles: 10 (71,42%) e Grupo FC: 29 (52,72%). O estado nutricional foi classificado em eutrofia, para a maioria dos avaliados e as diferenças encontradas entre os grupos não foram significativas, sendo os escores-Z médios do peso-para-idade de $-0,21 \pm 0,25$ e de $-0,34 \pm 0,21$, estatura-para-idade de $-0,69 \pm 0,44$ e de $-0,51 \pm 0,23$ e IMC-para-idade de $0,78 \pm 0,34$ e IMC de $41,06 \pm 1,85$ em valor absoluto, respectivamente para os grupos portadores de fibrose cística e grupo controle. O valor médio para o Escore de Schwaschmann foi classificado como excelente, com valor da mediana igual a 90 % (IQR 85-100). A principal bactéria patogênica presente na amostra foi a *Staphylococcus aureus* (34,54%), seguida pela *Pseudomona aeruginosa* (30,9%). Houve um aumento significativo do número de leucócitos e linfócitos ($p = 0,006$ e $p = 0,045$ respectivamente) no grupo FC (Tabela 1).

Tabela 1 - Características clínicas, bioquímicas e antropométricas do grupo controle e dos pacientes portadores de fibrose cística (FC) do estudo.

Variável	Valores de Referência	Grupo Controle (n=14)	Grupo Fibrose Cística (n=55)	p
Idade [£] (anos)	-	3,83 (2,25-7,83)	5,62 (3,43-9,14)	0,780
F [£] n (%)	-	10 (71,42)	29 (52,72)	
M [£] n (%)	-	04 (28,57)	26 (47,27)	
P/I [£] (escore-Z) ^{WHO}	≥ - 2 e ≤ +2	-0,21±0,25 (-0,16)	-0,34±0,211 (-0,21)	0,230
E/I [£] (escore-Z) ^{WHO}	≥ - 2	-0,69±0,44 (-0,72)	-0,51±0,23 (-0,54)	0,100
IMC/I [★] (escore-Z) ^{WHO}	≥ - 2 e ≤ +1	0,78±0,34 (0,54)	-0,28±0,20 (-0,035)	0,196
CMB [★] (cm)	p 50°	1,36 (1,24-1,64)	1,33 (1,17-1,48)	0,945
Massa Magra [£] (kg)	9,3 a 17,2	15,44 (9,52-21,23)	12,15 (7,68-17,83)	0,560
%GC [★]	< 30	30,24 (21,93-33,56)	25,16 (20,96-	0,450
Diagnóstico [£] (anos)	-	NA	0,5 (0,16-2,00)	-
Schwaschman [£] (%)	> 80%	NA	90 (85-100)	-
ProteínaTotal [★] (g/dL)	6,0 a 8,0	7,05 (6,77-7,42)	6,90 (6,40-7,30)	0,250
Albumina [★] (g/dL)	2,5 a 5,5	4,05 (3,30-4,35)	4,20 (3,90-4,60)	0,650
Creatinina [★] (mg/dL)	0,4 a 1,3	0,40 (0,31-0,50)	0,39 (0,32-0,50)	0,320
Hemoglobina [£] (g/dL)	12,0 a 16,1	11,70 (10,67-12,83)	12,50 (11,70-13,40)	0,620
Hematócrito [£] (%)	35,0 a 47,0	35,65 (32,52-37,67)	37,10 (34,70-39,80)	0,490
Leucócitos [£] (p/mm ³)	4000 a 10000	7000 (6125-9250)	9800 (7300-12900)	0,006*
Neutróf. segm. [★] (p/mm ³)	1000 a 6000	3706 (3049-5721)	4752 (3480-6510)	0,230
Linfócitos [£] (p/mm ³)	1800 a 9000	2684 (2429-3476)	3472 (2546-4587)	0,045*
Monócitos [★] (p/mm ³)	0 a 1000	381,00(305,2531,0)	384 (300-574)	0,400
Esteatócrito [£] (%)	0,00	NA	0,00 (0,00-30,00)	0,730

Resultados: mediana (intervalo interquartil). escore Z: Média ± Erro Padrão da Média (Mediana). [£]Teste t Student. [★]Teste de Mann Whitney. F: sexo feminino M: sexo masculino E/I. Estatura-para-idade. P/I: peso-para-idade. IMC/I: índice de massa corporal-para-idade. WHO: *World Health Organization*. NA: Não aplicável. E.Schwaschmann: Escore de Schwaschmann. CMB: Circunferência muscular do braço. %GC: percentual de gordura corporal. Neutróf segm: Nutrófilos segmentados.

Biomarcadores séricos

A Tabela 2 compara indivíduos com presença e ausência de FC, e no grupo portador da doença, avalia um importante indicador do prognóstico, que é a presença ou ausência da bactéria *P. aeruginosa*, cuja patogenicidade conduz a inúmeras complicações, principalmente de ordem pulmonar e imune. Estes indivíduos foram agrupados conforme presença (podendo incluir outras bactérias, patogênicas ou não, desde que houvesse presença da *P. aeruginosa*) ou ausência da *P. aeruginosa* (podendo incluir outras bactérias, patogênicas ou não, desde que não houvesse cultura positiva para *P. aeruginosa*). As médias de concentrações sanguíneas dos biomarcadores de estresse oxidativo e inflamatórios foram comparadas em todos os grupos, em relação ao grupo controle.

No grupo FC em relação ao controle, observa-se níveis significativamente aumentados de TBARS ($p= 0,031$), proteína carbonil ($p= 0,013$), na atividade da MPO ($p= 0,001$), nos níveis de NOx ($p= 0,001$), bem como níveis significativamente diminuídos da GSH ($p= 0,001$) (Tabela 2).

A cultura positiva para *P. aeruginosa* apresentou, como reflexo significativos nos resultados de biomarcadores oxidativos e inflamatórios, maiores níveis de TBARS ($p= 0,001$), PC ($p= 0,002$) e NOx ($p= 0,032$), e PCR ($p= 0,049$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentrações sanguíneas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonil (PC), glutatona reduzida (GSH), glutatona peroxidase (GPx), atividade da catalase (CAT) e mieloperoxidase (MPO), metabólitos de óxido nítrico (NOx), proteína C reativa (PCR) de pacientes portadores de FC e com ausência da doença (controles).

Variável	GC	GFC			P.	p ^b
	(n= 14)	Todos (GFC) (n= 55)	Ausência de <i>P.aeruginosa</i> [‡] (n= 37)	Presença de <i>aeruginosa</i> [‡] (n= 18)		
TBARS* (nmol/mL)	0,07 (0,04-0,11)	0,21 (0,15-0,26)	0,031*	0,20 (0,16-0,24)	0,22 (0,18-0,52)	0,001*
PC (nmol/ing/PTN)	0,03 (0,02-0,05)	0,047 (0,02-0,07)	0,013*	0,03 (0,02-0,05)	0,09 (0,02-0,06)	0,001*
GSH* (µmol/mL)	0,83 (0,67-0,94)	0,75 (0,62-0,94)	0,001*	0,80 (0,63-1,01)	0,72 (0,88-1,29)	0,239
GPx* (µmol/min/mL)	3,19 (2,40-3,42)	2,01 (0,98-3,05)	0,115	1,98 (0,98-3,00)	2,81 (1,01-3,18)	0,114
CAT* (mU/mL)	32,20 (21,64-38,05)	22,57 (17,69-27,44)	0,316	22,61 (18,71-27,14)	20,69 (12,75-27,25)	0,190
MPO [€] (mU/mL)	198,91 (174,28-207,29)	372,30(283,41-460,30)	0,001*	372,30 (313,36-450,34)	379,63 (200,00-475,50)	0,050
NOx (µmol/L)	30,25 (26,77-33,62)	36,45 (30,30-55,30)	0,001*	35,20 (30,2-49,85)	47,45(31,70-69,57)	0,032*
PCR* (mg/L)	0,27 (0,21-0,70)	0,65 (0,18-1,57)	0,057	0,46 (0,16-1,78)	0,70 (0,30-1,20)	0,049*

Resultados: mediana (intervalo interquartil). GC: Grupo Controle. GFC: Grupo Fibrose Cística. [€] MPO n=09. [‡] Pacientes GFC que apresentaram cultura negativa para *P.aeruginosa* no momento da coleta. [‡] Pacientes GFC que apresentaram cultura negativa para *P.aeruginosa* na coleta. ^a Diferenças entre GC e GFC analisado pelo teste t Student para amostras independentes e ^{*}Teste de Mann Whitney. ^b Diferenças entre o GFC com Ausência de *P. aeruginosa* e o GFC com Presença de *P. aeruginosa* analisado pelo teste t Student para amostras independentes e ^{*}Teste de Mann Whitney.

Os biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação foram avaliados entre os grupos de pacientes portadores de fibrose cística com presença ou ausência de infecção por bactérias consideradas patogênicas para a doença (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Complexo Burkholderia cepacea*), comparando-os ao grupo controle. O Grupo com **ausência de infecção por bactérias patogênicas para FC** e o Grupo com **presença de infecção por bactérias patogênicas para FC** apresentaram valores significativos mais altos do biomarcador de estresse oxidativo TBARS (ambos $p < 0,001$) e do biomarcador inflamatório MPO (ambos $p < 0,001$) quando comparados ao grupo controle. Também foram encontrados valores significativamente mais altos de proteína carbonilada ($p = 0,043$), atividade da enzima catalase ($p = 0,001$) e NOx ($p = 0,003$) no grupo com **presença de infecção por bactérias patogênicas para FC** quando comparado ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentrações sanguíneas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonil (PC), glutatona reduzida (GSH), glutatona peroxidase (GPx), atividade da catalase (CAT) e da mieloperoxidase (MPO), metabólitos de óxido nítrico (NOx), proteína C reativa (PCR) de indivíduos com ausência da doença, o grupo controles e pacientes portadores de FC distribuídos de acordo com a presença ou ausência de infecção por bactérias patogênicas para fibrose cística [†] no momento da coleta.

Variável	GC (n= 14)		GFC (n= 55)		p ^d	Presença de infecção por bactérias patogênicas para FC (n= 28)		p ^b
			Ausência de infecção por bactérias patogênicas para FC (n= 27)					
TBARS* (nmol/mL)	0,07 (0,04-0,11)		0,20 (0,17-0,24)		< 0,001 *	0,21 (0,08-0,27)		< 0,001 *
PC (nmol/mg/PPTN total)	0,03 (0,02-0,05)		0,03 (0,02-0,05)		1,000	0,06 (0,04-0,11)		0,001 *
GSH* (µmol/mL)	0,83 (0,67-0,94)		0,82 (0,70-1,01)		0,734	0,69 (0,59-0,90)		0,614
GPx* (µmol/min/mL)	3,19 (2,40-3,42)		2,01 (1,29-3,16)		1,145	2,20 (0,78-3,65)		0,154
CAT* (mmol/min·mL)	32,20 (21,64-38,05)		23,37 (19,12-27,44)		0,079	20,48 (14,55-27,23)		0,043 *
MPO [€] (nU/mL)	198,91 (174,28-207,29)		363,39 (289,44-426,25)		< 0,001 *	410,54 (239,76-487,54)		< 0,001 *
NOx (µmol/L)	30,25 (26,77- 33,62)		36,40 (30,20-50,70)		0,051	285,12 (238,23-436,80)		0,003 *
PCR* (mg/L)	0,27 (0,21-0,70)		0,43 (0,17-1,93)		0,459	0,74 (0,22-1,34)		0,940

Resultados: mediana (intervalo interquartil). GC: Grupo Controle. GFC: Grupo Fibrose Cística. [€] MPO n= 09. ^b: Ausência de infecção por Bactérias patogênicas para FC vs GC. ^p: Presença de infecção por bactérias patogênicas para FC VS GC.

A tabela 4 agrupa os indivíduos do estudo de acordo com os períodos de infecção bacteriana, avaliados de maneira retrospectiva a partir do momento da coleta, num período de até 6 meses, tendo como parâmetro os resultados das culturas no exame de bacteriologia, comparados ao grupo controle. O grupo de Nunca infectados foi constituído por crianças e adolescentes que nunca apresentaram cultura negativa para as bactérias consideradas patogênicas para FC. Já no grupo Primoinfecção e Infecção Intermitente foram incluídas crianças e adolescentes que apresentaram a primeira cultura positiva para microorganismos patogênicos para FC, e aqueles que apresentaram infecções por mesma bactéria patogênica, que não tenham atingido a frequência de três episódios. O grupo infecção crônica foi composto por pacientes que apresentaram três culturas positivas, com intervalo maior que um mês entre elas, por mesma bactéria patogênica.

O biomarcador TBARS apresentou diferença significativa para os grupos Nunca Infectados e Primoinfecção/Infecção Intermitente, quando estes eram comparados ao grupo controle ($p= 0,040$ e $p< 0,001$ respectivamente) (Tabela 4).

A proteína carbonil não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Porém, a diferença de médias entre os grupos Primoinfecção/Infecção Intermitente, e o grupo controle, apresentou tendência à significância ($p= 0,058$) (Tabela 4).

As glutathionas apresentaram os seguintes comportamentos: glutathiona reduzida não teve seus valores significativamente distintos entre os grupos, sendo a média dos valores nos grupos com FC, todos menores do que no do grupo controle. A glutathiona peroxidase teve seus níveis significativamente menores em relação ao grupo controle, apenas no grupo Infecção Crônica ($p< 0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentrações sanguíneas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonyl (PC), glutatona reduzida (GSH), glutatona peroxidase (GPx), atividade da catalase (CAT) e da mieloperoxidase (MPO), metabólitos de óxido nítrico (NOx) e proteína C reativa (PCR) de acordo com tipo de infecção bacteriana.

Variável	GC (n= 14)		GFC (n=55)		p ^b	Infecção Crônica ^o (n=06)	p ^c
	Nunca infectados por bactérias patogênicas paraFC. ^y (n= 08)	p ^d	Primoinfecção/ Infec.Intermittente [*] (n=41)	p ^e			
TBARS* (nmol/mL)	0,07 (0,04-0,11)	0,040	0,23 (0,13-0,25)	0,21(0,15-0,26)	0,001	0,21 (0,11-0,23)	0,113
PC (nmol/mg PTN)	0,03 (0,02-0,05)	1,00	0,02 (0,015-0,061)	0,047 (0,027-0,075)	0,058	0,066 (0,052-0,107)	0,096
GSH* (µmol/mL)	0,83 (0,67-0,94)	0,962	0,95 (0,80-1,01)	0,74 (0,60-0,92)	0,890	0,64 (0,58-0,75)	0,776
GPx* (µmol/min/mL)	3,19 (2,40-3,67)	0,216	2,24 (1,44-2,88)	2,60 (1,09-3,93)	0,566	0,72 (0,31-1,15)	0,001
CAT (mmol/min/mL)	32,20 (21,64-38,05)	0,457	24,29 (19,25-30,91)	22,57 (17,14-28,10)	0,998	19,78 (14,58-22,46)	0,362
MPO [€] (mU/mL)	198,91(174,28-207,29)	0,009	411,06 (336,67-536,52)	359,72 (280,68-439,34)	< 0,001	398,49 (231,66-490,68)	0,188
NOx (µmol/L)	30,25 (26,77-33,62)	0,869	33,20 (30,55-40,08)	37,30 (31,00-55,55)	< 0,001	35,30 (24,25-84,85)	0,793
PCR* (mg/L)	0,27 (0,21-0,70)	0,870	0,98 (0,21-2,11)	0,46 (0,17-1,16)	0,456	0,95 (0,21-2,28)	0,932

Resultados: mediana (intervalo interquartil). GC: Grupo Controle. GFC: Grupo Fibrose Cística. [€] MPO n=09. ^y: Pacientes que nunca apresentaram cultura positiva para as bactérias patogênicas para FC: *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. cepacia*. ^{*}: Pacientes que apresentaram a primeira infecção, ou que não tenham atingido três episódios de infecção em seis meses, por bactérias patogênicas para FC. ^o: Três culturas positivas, com intervalo maior que um mês entre elas, em um período de seis meses, por mesma bactéria patogênica para FC. ^h: Nunca infectados por bactérias patogênicas para FC vs GC. ^p: Primoinfecção/Infecção Intermittente vs GC. ^p: Infecção Crônica vs GC.

Os biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação foram avaliados pelo indicador de volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) em pacientes com FC. A função pulmonar foi considerada estável ($VEF_1 > 80\%$) ou instável ($VEF_1 \leq 80\%$), e, estes foram comparados ao Grupo Controle. Realizaram este exame apenas crianças maiores de 5 anos, totalizando 28 indivíduos caracterizados da seguinte maneira: Grupo controle (07), grupo função pulmonar estável (08) e Grupo função pulmonar Instável (13). No Grupo de função pulmonar estável ($VEF_1 > 80\%$), o biomarcador TBARS apresentou-se significativamente elevado em relação ao grupo controle, com mediana 0,20 nmol/mL (IQR 0,11 - 0,25) ($p= 0,018$), e também houve um aumento significativo na atividade da MPO tanto nos pacientes estáveis: mediana 366,00 mU/mL, (IQR 245,00 - 494,34) ($p= 0,009$), como nos instáveis: mediana 352,92 mU/mL (IQR 229,81 - 512,68) ($p= 0,021$). É importante ressaltar que, dos 8 indivíduos caracterizados como estáveis no resultado da espirometria, apenas um indivíduo não apresentou infecção por *P. aeruginosa* no momento da coleta. O dano protéico avaliado pela PC foi significativo ($p= 0,021$) no grupo instável, com valor da mediana em 0,073 nmol/mg de proteína total (IQR= 0,045 - 0,11). O dano inflamatório foi caracterizado por valores significativamente menores da PCR no grupo estável quando comparado ao grupo controle: mediana do grupo estável 0,77 mg/ L (IQR 0,15 - 3,51) e do grupo controle 0,28 mg/L (IQR 0,23 - 0,59) ($p= 0,002$).

Discussão

Os biomarcadores TBARS, proteína carbonilada (PC) e a atividade da MPO foram marcadores que mostraram níveis aumentados, enquanto níveis diminuídos nas enzimas GSH e GPx estavam presentes no grupo com fibrose cística, quando comparados ao grupo controle, sem fibrose cística. O aumento na peroxidação de lipídeos, observado por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), assemelha-se ao trabalho desenvolvido por Schmarina et al. (2001) [53], cujo marcador estudado foi o malondialdeído. Os níveis aumentados de TBARS no grupo com FC deste estudo podem ser interpretados como um fator sistêmico do aumento do estresse oxidativo. Foi investigado por Grimble e Tapia (1998) [55], que a quase totalidade destes pacientes realiza tratamento com micro-esferas enzimáticas, iniciada nos períodos de exacerbação pulmonar aguda, ou seja, quando sua suscetibilidade ao

estresse oxidativo é marcadamente aumentada. A terapia de reposição enzimática melhorou a absorção de nutrientes, o que pode ter resultado em uma elevação nos ácidos graxos poliinsaturados do plasma, nas lipoproteínas e colesterol. Deste modo, ocorreria a produção de novos alvos lipídicos para os radicais livres na circulação sanguínea, e o sistema de defesa antioxidante já em déficit nesses pacientes não seria suficiente para impedir a sua oxidação. Lagrange-Puget et al. (2004) [56], ao contrário do que foi encontrado neste estudo, identificaram níveis diminuídos nos marcadores de peroxidação lipídica TBARS e malondialdeído, justificando que a peroxidação lipídica é um processo complexo, cuja eliminação dos metabólitos plasmáticos ocorre de maneira rápida, sendo difícil sua interpretação.

Aumento na peroxidação de lipídeos também foi verificado no estudo desenvolvido por um grupo australiano [57], com 17 indivíduos adultos com (mediana da idade 28 anos (IQR 18 - 43), comparados a um grupo de indivíduos saudáveis, avaliou mediadores lipídicos derivados do processo inflamatório, as prostaglandinas E2 (PGE2) e 8-iso-F2 α , (8-iso-PGF2 α), e os cisteinil-leucotrienos totais (cys-LT), avaliadas no escarro. As análises foram realizadas em dois momentos: durante o período de exacerbação da FC, e após o tratamento dos sintomas. Os valores dos mediadores lipídicos encontrados em ambos os momentos não diferem entre si, permanecendo aumentados quando comparados aos controles, sugerindo um intenso estresse oxidativo e geração de mediadores inflamatórios derivados de lipídeos persistente nesses pacientes. Há várias explicações possíveis para esse estresse oxidativo, apesar do tratamento continuado e melhora clínica. Uma delas, é que poderia ocorrer um consumo constante dos antioxidantes endógenos destes pacientes (em períodos de estabilidade ou exacerbação, devido às características inflamatórias da doença), em níveis insuficientes para agir até mesmo em situações de estresse oxidativo diminuído [25,55]. A outra explicação poderia ser o uso de enzimas pancreáticas constante desses pacientes, e suplementação de vitaminas lipossolúveis favorece o aumento de substratos para peroxidação lipídica [56,57]. Além disso, a possibilidade do aumento da peroxidação lipídica poderia estar presente devido a uma longa ação de pró-oxidantes que vem ocorrendo nestes pacientes, devido aos sintomas pulmonares e gastro-intestinais [58].

Níveis elevados da MPO e PC, também foram encontrados no estudo de Kettle et al. (2004) [59], quando os pacientes portadores de FC (n= 22) eram comparados a um grupo controle saudável (n= 7), por meio de análises de amostras de lavado bronco-alveolar. O grupo

portador da doença e o grupo controle apresentaram, respectivamente o valor da mediana 3,6 vs 0,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína ($p < 0,002$) para MPO, mostrando aumento no processo inflamatório, e mediana 0,098 vs 0,040 nmol/mg proteína ($p < 0,001$) para PC, indicando presença de estresse oxidativo. A literatura tem apresentado estudos a respeito de a inflamação nos pulmões de crianças com fibrose cística ser uma consequência de infecção [60], ou se a infecção é que seria uma consequência de danos inflamatórios no tecido [61]. No grupo com FC, houve uma resposta inflamatória a uma infecção, com aumento da mieloperoxidase e da cloração da proteína. No entanto, em algumas crianças estes marcadores de inflamação foram elevados, mesmo quando eram indetectáveis as infecções ativas. Isso pode indicar que a resposta inflamatória pode persistir na ausência de infecção. Uma explicação poderia ser o resultado de uma infecção prévia ou poderia representar uma infecção ativa que estava abaixo do limite de detecção [59,62]. Thomson et al. [63] também observou a mieloperoxidase como sendo a principal peroxidase identificada nas vias aéreas de crianças com FC, resultado esperado em uma inflamação caracterizada pelo aumento da presença de neutrófilos, como ocorre na FC.

A glutatona, um tripeptídeo antioxidante que desempenha um papel essencial na proteção das células epiteliais contra o estresse oxidativo e xenobióticos [12] teve seus níveis marcadamente diminuídos nos pacientes portadores de FC no presente estudo. É conhecido que a proteína CFTR age diretamente no transporte da GSH, e que os níveis de glutatona citoplasmática rapidamente aumentam nas células epiteliais expostas ao estresse oxidativo [64,65]. Um estudo mostrou que o estresse oxidativo pode suprimir a expressão da CFTR bem como sua função, representando uma resposta adaptativa do epitélio celular a um estresse oxidativo exógeno. Com isso, o conteúdo celular da GSH seria aumentado devido ao seu transporte insuficiente [66]. Além de regular a síntese de glutatona, as células epiteliais são capazes de modular o transporte transmembrana de glutatona. Níveis diminuídos de GSH foram mostrados em inúmeros estudos [12,66,67] e a principal característica destes níveis diminuídos refere-se ao transporte prejudicado da GSH pela CFTR mutante.

Níveis diminuídos da enzima glutatona peroxidase (GPx) também foram identificados nos participantes de um estudo realizado com 15 crianças portadoras de FC em período de exacerbação, com análises antes e após 14 dias de antibioticoterapia [68]. No grupo portador de fibrose cística, mesmo após o período de tratamento, os

níveis da GPx continuaram diminuídos ($16,2 \pm 1,1$ e $13,8 \pm 0,7$ u/g Hb) antes e após tratamento, respectivamente [68].

Para melhor elucidar a relação entre a inflamação e o estresse oxidativo na FC, verificou-se se os biomarcadores foram influenciados pela infecção das vias aéreas, por meio da presença ou ausência do patógeno *Pseudomona aeruginosa*. Quando o grupo portador de FC foi analisado a partir da presença ou ausência da bactéria, observou-se um aumento significativo em PC, NOx e PCR do grupo com cultura positiva para esta bactéria.

Contrariamente, Thomson et al. (2010) [63], ao compararem níveis de proteína carbonilada em lavados bronco-alveolares das vias aéreas de pacientes infectados por *Pseudomonas aeruginosas*, com aqueles que apresentavam ausência desta bactéria, não identificaram diferenças significativas entre os grupos.

Os níveis aumentados de NOx condizem com aqueles publicados por Linnane et al. (1998) [69] e Jones et al. (2000) [70], que encontraram um aumento nas concentrações de NOx no ar exalado de pacientes com FC [71]. Porém, é importante ressaltar que a maior parte dos estudos apresentam baixos ou iguais níveis de NOx de pacientes com FC quando comparados a pacientes saudáveis [72,73,74,75,76].

O presente estudo observou níveis elevados para proteína C reativa quando esta foi analisada nos pacientes infectados por *P. aeruginosa* (mediana 0,84 IQR 0,18 - 1,00 mg/L) vs não infectados (mediana 0,65 IQR 0,16 - 1,78 mg/L). O estudo de Martin et al. (2010) [77] também apresentou resultados aumentados para níveis séricos da PCR em 36 indivíduos adultos com FC, infectados por *P. aeruginosa*. Outro trabalho cujos níveis de PCR encontravam-se acima dos valores de referência foi desenvolvido por Slobodianik et al. (2010) [78], com 17 crianças portadoras de FC não hospitalizadas com idade entre 3 meses e 10 anos.

Por meio desta pesquisa, que considerou dentre os diversos aspectos clínicos da doença, a presença de infecção por bactérias patogênicas, a função pulmonar, e as diferentes maneiras de agrupamentos destes indivíduos, pode-se concluir que:

a) Considerando os aumentos referidos no TBARS, PC e MPO, e a diminuição nos níveis de GSH, é sugerido um quadro de estresse oxidativo (EO) sistêmico nos pacientes com FC;

b) Aparentemente, o protocolo de suplementação em uso para os pacientes com FC não é suficiente para evitar o EO sistêmico nestes

pacientes. Particularmente, sugere-se um aumento de 2 a 3 vezes na suplementação diária;

c) Aparentemente, a presença de infecção não implica no estabelecimento e/ou exacerbação do EO.

d) Da mesma forma, os períodos de infecção bacteriana não foram determinantes no estabelecimento e/ou exacerbação do EO.

Agradecimentos

À equipe multidisciplinar de Estudos em Fibrose Cística do Hospital Infantil Joana de Gusmão, que gentilmente nos acompanhou durante todo o período de execução do estudo.

Referências

[1] van Der Vliet, A.; Nguyen, M. N.; Shigenaga, M. K.; Eiserich, J. P.; Marelich, G.P.; Cross, C. E. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **279**:537-546; 2000.

[2] Hoffman, L.R.; Richardson, A.R.; Houston, L.S.; Kulasekara, H.D.; Martens-Habbena, W.; Klausen, M.; Burns, J. L.; Stahl, D. A.; Hassett, D. J.; Fang, F. C.; Miller, S.I. Nutrient Availability as a Mechanism for Selection of Antibiotic Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF Airway. *PLoS Pathog.* **6**(1):100-107; 2010.

[3] Liu, R. M.; Pravia, K. A. G. Oxidative stress and glutathione in TGF- β - mediated fibrogenesis. *Free Rad. Biol. Med.* **48**:1-15; 2010.

[4] Elizur, A.; Cannon, C. L.; Ferkol, T. W. Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest.* **133**:489-495; 2008.

[5] Schiller, K. R.; Maniak, P. J.; O'Grady, S. M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **299**(5):912-921; 2010.

[6] Davis, P. M. Cystic Fibrosis since 1938. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**:475-482; 2006.

[7] Boucher, R. C. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu. Rev. Med.* **58**:157-170; 2007.

[8] Leal, T.; Fajac, I.; Wallace, H. L.; Lebecque, P.; Lebacqz, J.; Hubert, D.; Dall'Ava, J.; Dusser, D.; Ganesan, A. P.; Knoop, C.; Cumps, J.; Wallemacq, P.; Southern, K.W. Airway ion transport impacts on disease presentation and severity in cystic fibrosis. *Clin. Biochem.* **41**:764-772; 2008.

[9] Rosa, F. R.; Dias, F. G.; Nobre, Luciana N.; Morais, H. A. Cystic fibrosis: a clinical and nutritional approach. *Rev. Nutr.* **21**(6):725-737; 2008.

[10] Shamseer, L.; Adams, D.; Brown, N.; Johnson, J. A.; Vohra, S. Antioxidant micronutrients for lung disease in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **12**: 734-738; 2010.

[11] Chavez, C. R. M. M.; Britto, J. A. A.; Oliveira, C. Q.; Gomes, M. M.; Cunha, A. L. P. Associação entre medidas do estado nutricional e a função pulmonar de crianças e adolescentes com fibrose cística, *J. Bras. Pneumol.* **35**:409-414; 2009.

[12] Cacciatore, I.; Cornacchia, C.; Pinnen, F.; Mollica, A.; Di Stefano, A. Prodrug Approach for Increasing Cellular Glutathione Levels. *Molecules.* **15**:1242-1264; 2010.

[13] Kidd, P.M. Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alt. Med. Rev.* **2**:155-176; 1997.

[14] Kowaltowski, A. J.; Souza-Pinto, N. C.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **47**:333-343; 2009.

[15] Lands, L. C.; Grey, V.; Smountas, A. A.; Violeta G.; McKenna K.; McKenna, D. Lymphocyte Glutathione Levels in Children With Cystic Fibrosis. *Chest*, **116**:201-205; 1999.

- [16] Hudson, V. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *J. Free Radic. Biol. Med.* **30**:1440-1461; 2001.
- [17] Trudel, S.; Kelly, M.; Fritsch, J.; Nguyen-Khoa, T.; Therond, P.; Couturier, M.; Dadlez, M.; Debski, J.; Touqui, L.; Vallee, B.; Ollero, M.; Edelman, A.; Brouillard, F. Peroxiredoxin 6 Fails to Limit Phospholipid Peroxidation in Lung from Cfr-Knockout Mice Subjected to Oxidative Challenge. *Plos One*, **4**(6):607-618; 2009.
- [18] Qu, F.; Qin, X. Q.; Cui, Y. R.; Xiang, Y.; Tan, Y. R.; Liu, H. J.; Peng, L. H.; Zhou, X. Y.; Liu, C.; Zhu, X. L. Ozone stress down-regulates the expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bronchial epithelial cells. *Chem. Biol. Interact.* **179**:219-226; 2009.
- [19] Schwarzer, C.; Fischer, H.; Kim, E. J.; Barber, K. J.; Mills, A. D.; Kurth, M. K.; Gruenert, D. C.; Suh, J. H.; E. Machen, T. E.; Illek, B. Oxidative stress caused by pyocyanin impairs CFTR Cl⁻ transport in human bronchial epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **45**:1653-1662; 2008.
- [20] Angstwurm, M. W. A.; Gaertner, R. Practicalities of selenium supplementation in critically ill patients. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **9**:233-238; 2006.
- [21] Rover-Junior, L. Sistema Antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova.* **24**(1):112-119; 2001.
- [22] Laguerre, M. Lopez-giraldo, L. J.; Lecomte, J.; Villeneuve P. Widespread methods and new analytical approaches in antioxidant evaluation. *Inform.* **20**:328-332; 2009.
- [23] Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**(1):44-84; 2007.
- [24] Wood, L. G.; Fitzgerald, D. A.; Garg, M. L. Hypothesis: vitamin E complements polyunsaturated fatty acids in essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *J. Am. Coll. Nutr.* **22**:253-257; 2002.

[25] Wood, L. G.; Garg, M. L., Simpson, J. L., Mori, T. A.; Croft, K. D.; Wark, P. A. B.; Gibson, P. G. Induced sputum 8-isoprostane concentrations in inflammatory airway diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**:426-430; 2005.

[26] Stacchiotti, A.; Morandini, F.; Bettoni, F., Schena, I.; Lavazza, A.; Grigolato, P.G.; Apostoli, P.; Rezzani, R.; Aleo, M.F. Stress proteins and oxidative damage in a renal derived cell line exposed to inorganic mercury and lead. *Toxicology*, **264**(3):215-224; 2009.

[27] World Medical Association. Declaration of Helsinki, Seoul, 59nd General Assembly-WMA. 2008. Disponível em: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>. Acessado em: 12 Set. 2009.

[28] Schwachman, H.; Kulczycki, L.L. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis; studies made over a five-to fourteen-year period. *Am. J. Dis. Child.* **96**(1):6-15; 1958.

[29] Borowitz, D.; Baker, R. D.; Stallings, V. Consensus report on nutrition for pediatric patients with cystic fibrosis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **35**(3):246-259; 2002.

[30] Cantin, A. M. Antioxidants in cystic fibrosis. Conclusions from the CF antioxidant workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003. *Free Radic. Biol. Med.* **42**(1):15-31; 2007.

[31] Pellegrino, R.; Viegi, G.; Brusasco, V.; Crapo, R. O.; Burgos, F.; Casaburi, R.; Coates, A.; van Der Grinten, C. P. M.; Gustafsson, P.; Hankinson, J.; Jensen, R.; Johnson, D. C.; MacIntyre, N.; McKay, R.; Miller, M. R.; Navajas, D.; Pedersen, O. F.; J. Wanger. Interpretative strategies for lung function tests. *European Respiratory Journal.* **26**:948-968; 2005.

[32] Gilligan, P. H.; Kiska, D. L.; Appleman, M. D. *Cumitech 43, Cystic Fibrosis Microbiology*. Coordinating ed., M. D. Appleman. ASM Press, Washington, D.C, 2006.

- [33] McPherson, R. A.; Pincus, M. R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Current Produral Terminology, Standard Edition, American Medical Association, Chicago, IL. SAUDERS ELSEVIER: CPT 2006.
- [34] World Health Organization. *Physical Status: The use and interpretation of anthropometry*. WHO technical report series 854. Geneva: WHO, 1995.
- [35] World Health Organization. *Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development*. Geneva: WHO, 2006. 312 p.
- [36] World Health Organization. Multicentre Growth Reference Study Group. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull. World Health Organ.* **85**:660-667; 2007.
- [37] Frisancho, A. R. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**:2540-2545; 1981.
- [38] Weststrate, J.; Deurenberg, P. Body composition in children: proposal for a method to calculate body fat percentage from total body density or skinfold thickness measurements. *Am. J. Clin. Nutr.* **50**(110):1104-1115; 1989.
- [39] Weinsier, R.L.; Schutz, Y.; Bracco, D. Reexamination of the relationship of resting metabolic rate to fat-free mass and to the metabolically active components of fat-free mass in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**:790-794; 1992.
- [40] Vives, J. L, Aguilar, J. L. *Manual de técnicas laboratoriais em hematologia*. Barcelona: Salvat; 1987.
- [41] Wallach, J. *Interpretação de exames laboratoriais*. Rio de Janeiro: Medsi; 2003.
- [42] Gornall, A. G.; Bardawill, C. J.; David, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**:751-766, 1949.

- [43] Ashwood, E. R.; Burtis, C. *Fundamentos da química clínica: Bioquímica do sangue*. 4. ed. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, 1996.
- [44] Ravel, R. *Laboratório Clínico – aplicações clínicas dos achados laboratoriais*, 4ª edição, p. 429, 1988.
- [45] Beutler, E.; Duron, O.; Kelly, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* **61**:882-890; 1963.
- [46] Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymol.* **105**:121-126; 1984.
- [47] Flohé, L.; Gunzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**:114-121; 1984.
- [48] Ohkawa, H; Oshishi, N; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**(2):351-358; 1979.
- [49] Bird, R. P.; Draper, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods in Enzymol.* **105**:295-305; 1984.
- [50] Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C.N., Amici, A.; Climent. I.; Lenz, A. G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**:464-478; 1990.
- [51] Rao, T. S.; Currie, J. L; Shaffer, A. L; Isakon, P. C. Comparative evaluation of arachidonic acid (aa) and tetradecanoylphorbol acetate (tpa)-induced dermal inflammation. *Inflammation*, **17**(6):723-741, 1993.
- [52] Green, L. C.; Wagner, D. A. J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**(1):131-138, 1982.
- [53] World Health Organization. *Anthro Plus, Global Database on Child Growth and Malnutrition*. Department of Nutrition for Health and Development, 2008.

- [54] Shmarina, G.; Pukhalsky, A. L. Kokarovtseva, S. N. Improvement of nutrient absorption may enhance systemic oxidative stress in cystic fibrosis patients. *Mediators Inflamm.* **10**:61-67, 2001.
- [55] Grimble, R. F.; Tappia, P. S. Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. *Z. Ernährungswissenschaft.* **37**(1):57-65; 1998.
- [56] Lagrange-Puget, M.; Durieu, I.; Ecochard, R. M. Longitudinal Study of Oxidative Status in 312 Cystic Fibrosis Patients in Stable State and During Bronchial Exacerbation. *Pediatr. Pulmonol.* **38**:43-49; 2004.
- [57] Reid, D.; Misso, N.; Aggarwal, S. Oxidative stress and lipid-derived inflammatory mediators during acute exacerbations of cystic fibrosis. *Respirology*, **12**(1):63-69; 2007
- [58] Witko-Sarsat, V.; Delacourt, C.; Rabier, D.; Bardet, J.; Nguyen, A. T.; Descamps-Latscha, B. Neutrophil-derived long-lived oxidants in cystic fibrosis sputum. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**:1910-1916; 1995.
- [59] Kettle, A.; Chan, T.; Osberg, I. Myeloperoxidase and Protein Oxidation in the Airways of Young Children with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**:1317-1323; 2004.
- [60] Cantin, A. Cystic fibrosis lung inflammation: early, sustained, and severe. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**:939-941; 1995.
- [61] Rosenfeld, M.; Gibson, R.L.; Mcnamara, S. Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **32**:356-366; 2001.
- [62] Griese, M.; Ramakers, J.; Krasselt, A.; Starosta, V.; van Koningsbruggen, S.; Fischer, R.; Ratjen, F.; Mullinger, B.; Huber, R. M.; Maier, K.; Rietschel, E.; Scheuch, G. Improvement of alveolar glutathione and lung function but not oxidative state in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**:822-828; 2004.

[63] Thomson, E.; Brennan, S.; Senthilmohan R. Identifying peroxidases and their oxidants in the early pathology of cystic fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* **15**(49):1354-1360; 2010.

[64] Forman, H.; Hongqiao, Z.; Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **30**:1-12; 2009.

[65] Dauletbaev, N.; Rickmann, J.; Viel, K. Antioxidant properties of cystic fibrosis sputum. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **288**:903-909; 2010.

[66] Cantin, A. M.; Bilodeau, G.; Ouellet, C.; Liao, J., Hanrahan, J.W. Oxidant stress suppresses CFTR expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290**: 262-270, 2006.

[67] Rahman, I.; Mac Neew. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J.* **16**:534-554; 2000.

[68] Wood, L. G.; Fitzgerald, D. A.; Garg, M. L. Hypothesis: vitamin E complements polyunsaturated fatty acids in essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *J. Am. Coll. Nutr.* **22**:253-257; 2002.

[69] Linnane, S. J.; Keatings, V. M.; Costello, C. M.; Moynihan, J. B.; O'Connor, C. M.; Fitzgerald, M. X.; McLoughlin, P. Total sputum nitrate plus nitrite is raised during acute pulmonary infection in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**(1):207-212; 1998.

[70] Jones, K. L.; Hegab, A. H.; Hillman, B. C.; Simpson, K. L.; Jinkins, P. A.; Grisham, M. B.; Owens, M. W.; Sato, E.; Robbins, R. A. Elevation of nitrotyrosine and nitrate concentrations in cystic fibrosis sputum. *Pediatr. Pulmonol.* **30**(2):79-85; 2000.

[71] Stewart, L.; Katial, R. Exhaled nitric oxide, immunology and allergy clinics of North America. *J. Allergy Clin. Immunol.* **27**(4):571-586; 2007.

[72] Grasemann, H.; Knauer, N.; Büscher, R.; Hübner, K.; Drazen, J. M.; Ratjen, F. Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. **162**:2172-2176; 2000.

[73] Robroeks, C. M.; Rosias, P. P.; van Vliet, D. Biomarkers in exhaled breath condensate indicate presence and severity of cystic fibrosis in children. *Pediatr. Allergy Immunol.* **19**:652-659; 2008.

[74] Chapman, A. L. P.; Morrissey, B. M.; Vasu, V. T. Myeloperoxidase-dependent oxidative metabolism of nitric oxide in the cystic fibrosis airway. *J. Cyst. Fibros.* **9**(2):84-92; 2010.

[75] Keen, C.; Olin, A. C.; Eriksson, S.; Ekman, A.; Lindblad, A.; Basu, S.; Beermann, C.; Strandvik, B. Supplementation with fatty acids influences the airway nitric oxide and inflammatory markers in patients with cystic fibrosis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **50**(5):537-544; 2010.

[76] Mattoscio, D.; Evangelista, V.; De Cristofar, R. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in human platelets: impact on mediators and mechanisms of the inflammatory response. *FASEB J.* **24**(10):3970-3980; 2010.

[77] Martin, S.L.; Moffitt, K.L.; McDowell, A.; Greenan, C.; Bright-Thomas, R. J.; Jones, A. M.; Webb, A. K.; Elborn, J. S. Association of airway cathepsin b and s with inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **45**:860-868; 2010.

[78] Slobodianik, N. H.; Feliu, M. S.; Perris, P.; Barbeito, S.; Strasnoy, I.; Franchello, A.; Ferraro, M. Biomarker profile in children with cystic fibrosis: preliminary study. *Proc. Nutr. Soc.* **69**(3):354-356; 2010

6 APLICABILIDADE DA PESQUISA

Esta pesquisa teve caráter investigatório e avaliou os níveis sanguíneos de biomarcadores de oxidação protéica e lipídica, antioxidantes e marcadores do processo inflamatório na população estudada. Sugere-se que os biomarcadores avaliados possam ser utilizados para suplementação adequada e individualizada de vitaminas e enzimas.

7 CONCLUSÕES

Por meio desta pesquisa, que considerou dentre os diversos aspectos clínicos da doença, a presença de infecção por bactérias patogênicas, a função pulmonar, e as diferentes maneiras de agrupamentos destes indivíduos, pode-se concluir que:

a) Considerando os aumentos referidos no TBARS, PC e MPO, e a diminuição nos níveis de GSH, é sugerido um quadro de estresse oxidativo (EO) sistêmico nos pacientes com FC;

b) Aparentemente, o protocolo de suplementação em uso para os pacientes com FC não é suficiente para evitar o EO sistêmico nestes pacientes. Particularmente, sugere-se um aumento de 2 a 3 vezes na suplementação diária;

c) Aparentemente, a presença de infecção não implica no estabelecimento e/ou exacerbação do EO.

d) Da mesma forma, os períodos de infecção bacteriana não foram determinantes no estabelecimento e/ou exacerbação do EO.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, J.; HOLT, A.; HART, A.; MORTON, A. M.; MACDOUGALL, L.; POGSON, M.; MILNE, G.; RODGERS, H. C.; CONWAY, S. P. What defines a pulmonary exacerbation? The perceptions of adults with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 8, p. 356-359, 2009.

ADDE, F. V.; RODRIGUES, J. C.; CARDOSO, A. L. Seguimento nutricional de pacientes com fibrose cística: papel do aconselhamento nutricional. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 6, p. 475-482, 2004.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALVAREZ, A. E.; RIBEIRO, A. F.; HESSEL, G.; BERTUZZO, C. S.; RIBEIRO, J. D. Cystic fibrosis at a Brazilian center of excellence: clinical and laboratory characteristics of 104 patients and their association with genotype and disease severity. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. 371-379, 2004.

AMIN, R.; RATJEN, F. Cystic Fibrosis: a Review of Pulmonary and Nutritional Therapies. **Advances in Pediatrics**, v. 55, p. 99-121, 2008.

ANGSTWURM, M. W. A.; GAERTNER, R. Practicalities of selenium supplementation in critically ill patients. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 9, p. 233-238, 2006.

ANTUNES, E.T. Epidemiologia. *In*: Neto NL. **Fibrose Cística: Aspectos Nutricionais, Abordagem Multidisciplinar**. Hospital Infantil Joana de Gusmão: Florianópolis, 2008. p. 23-40.

ASHWOOD, E. R.; BURTIS, C. **Fundamentos da química clínica**. 4. ed. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, 1996. p.401.

BALASCAKOVÁ, M.; HOLUBOVÁ, A.; SKALICKÁ, V.; ZEMKOVÁ, D.; KRACMAR, P.; GONSORCÍKOVA, L.; CAMAJOVÁ, J.; PISKÁCKOVÁ, T.; LEBL, J.; DREVÍNEK, P.; GREGOR, V.; VÁVROVÁ, V.; VOTAVA, F.; MACEK JÚNIOR, M. Pilot newborn screening project for cystic fibrosis in the Czech

Republic: Defining role of the delay in its symptomatic diagnosis and influence of ultrasound-based prenatal diagnosis on the incidence of the disease. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 8, p. 224-227, 2009.

BARBOSA, E. Nutrição. *In*: Ludwig Neto N. **Fibrose Cística: Aspectos Nutricionais, Abordagem Multidisciplinar**. Hospital Infantil Joana de Gusmão: Florianópolis. 2008. p. 291-325.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1. p. 113-123, 2006.

BEKER, L. T.; RUSSEK-COHEN, E.; FINK, R. J. Stature as a prognostic factor in cystic fibrosis survival. **Journal of American Dietetic Association**, v. 101, n. 4, p. 438-442, 2001.

BENTUR, L.; KALNINS, D.; LVISSON, H.; COREY, M.; DURIE, P. R. Dietary intakes of young children with cystic fibrosis: is there a difference? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 22, p. 254-258, 1996.

BERGAMINI, G.; CIGANA, C.; SORIO, C.; DELLA PERUTA, M.; POMPELLA, A.; CORTI, A.; HUAUX, F. A.; LEAL, T.; ASSAEL, B. M.; MELOTTI, P. Effects of azithromycin on glutathione S-transferases in cystic fibrosis airway cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 41, n. 2, p. 199-206, 2009.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BIRD, R. P; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzimology**, v.105, p. 295-305, 1984.

BOROWITZ, D.; BAKER, R. D.; STALLINGS, V. Consensus report on nutrition for pediatric patients with cystic fibrosis. **Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition**, v. 35, n. 3, p. 246-259, 2002.

BOUCHER, R. C. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. **Annual Revision of Medicine**, v. 58, n. 157, p.70-81, 2007.

BROWN, R. K.; KELLY, F. J. Role of free radicals in the pathogenesis of cystic fibrosis. **Thorax**, v. 49, p. 738-742, 1994a.

BROWN, R. K.; KELLY, F. J. Evidence for increased oxidative damage in patients with cystic fibrosis. **Pediatric Research**, v. 36, p. 487-493, 1994b.

BROWN, R. K.; WYATT, H.; PRICE, J. F.; KELLY, F. J. Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. **European Respiratory Journal**, v. 9, p. 334-339, 1996.

BURTIS, C. A; ASHWOOD, E. R. **Fundamentals of Clinical Chemical**. 5 ed. Philadelphia: WD Saunders, 2001.

CACCIATORE, I.; CORNACCHIA, C.; PINNEN, F.; MOLLICA, A.; DI STEFANO, A. Prodrug approach for increasing cellular glutathione levels. **Molecules**, v. 15, p. 1242-1264, 2010.

CANTIN, A. M.; NORTH, S. L; HUBBARD.; R. C.; CRYSTAL, R. G. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. **Journal of Applied Physiology**, v. 63, p.152-157, 1987.

CANTIN, A. Cystic fibrosis lung inflammation: early, sustained, and severe. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 151, p. 939-941, 1995.

CANTIN, A. M.; BILODEAU, G.; OUELLET, C.; LIAO, J., HANRAHAN, J.W. Oxidant stress suppresses CFTR expression. **American Journal of Physiology and Cell Physiology**, v. 290, p. 262-270, 2006.

CANTIN, A. M. Antioxidants in cystic fibrosis. Conclusions from the CF antioxidant workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, n. 1, p. 15-31, 2007.

CARR, A.; MARK, R.; MCCALL; BALZ, F.. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 7, p. 1716-1723, 2000.

CASTELLANI, C.; SOUTHERN, K.W.; BROWNLEE, K.; DANKERT ROELSE, J.; DUFF, A.; FARRELL,M.; MEHTA, A.; MUNCK, A.; POLLITT, R.; SERMET-GAUDELUS, I.; WILCKEN, B.; BALLMANN, M.; CORBETTA, C.; MONESTROL, I.; FARRELL, P.; FEILCKE, M.; FÉREC, C.; GARTNER, S.; GASKIN, K.; HAMMERMANN, J.; KASHIRSKAYA, N.; LOEBER, G.; MACEK Jr., M.; MEHTA, G.; REIMAN, A.; RIZZOTTI, P.; SAMMON,A.; SANDS, D.; SMYTH, A.; SOMMERBURG, O.; TORRESANI, T.; TRAVERT, G.; VERNOOIJ, A.; ELBORN, A. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening, **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 8, n. 3, p. 153-173, 2009.

CATALA, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 157, n. 1, p. 1-11, 2009.

CHAPMAN, A. L. P.; MORRISSEY, B. M.; VASU, V. T. Myeloperoxidase-dependent oxidative metabolism of nitric oxide in the cystic fibrosis airway, **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 9, n. 2, p. 84-92, 2010.

CHAVES, C. R. M. M.; BRITTO, J. A. A.; OLIVEIRA, C. Q.; GOMES, M. M.; CUNHA, A. L. P. Associação entre medidas do estado nutricional e a função pulmonar de crianças e adolescentes com fibrose cística. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 5, p. 409-414, 2009.

CHEN, A; INNIS, S. Assessment of Phospholipid Malabsorption by Quantification of Fecal Phospholipid. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 39, p. 85-91, 2004.

CHEUNG, J. C; DEBER, C. M. Misfolding of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and disease. **Biochemistry**, v. 47, p. 1465-1473, 2008.

CHILDERS, M. A new model of cystic fibrosis pathology: Lack of transport of glutathione and its thiocyanate conjugates. **Medical Hypothesis**, v. 68, n. 1, p. 101-112, 2007.

CHUAN, H; LAI, J; SHOFF, S. M. Classification of malnutrition in cystic fibrosis: implications for evaluating and benchmarking clinical practice performance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p.161-166, 2008.

CIENCEWICKI, J.; TRIVEDI, S.; KLEEBERGER, S. R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 3, p. 456-470, 2009.

COELHO, C. C.; AQUINO, E. S.; ALMEIDA; D. C.; OLIVEIRA; G. C.; PINTO, R. C.; REZENDE, I. M. O; PASSOS, C. Análise comparativa e reprodutibilidade do teste de caminhada com carga progressiva (modificado) em crianças normais e em portadoras de fibrose cística. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 2, p. 168-174, 2007.

COLLINS, F. C. Cystic Fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. **Science**, v. 256, n. 5058, p. 774-779, 1992.

COWLEY, E. A.; LINSDELL, P. Oxidant stress stimulates anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu-3: implications for cystic fibrosis lung disease. **Journal of Physiology**, v. 543, n. 1, p. 201-209, 2002.

CREVELING, R. D. S.; LIGHT, M. D. S.; GARDNER, L. C. S. W. P.; GREENE, M. S. N. Cystic Fibrosis, Nutrition, and the Health Care Team. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 97, n.10, p. 186-191, 1997.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. About Cystic Fibrosis, 2006. Disponível em: <http://www.cff.org/AboutCF/>. Acessado em 21 set. 2009.

DAULETBAEV, N.; RICKMANN, J.; VIEL, K. Antioxidant properties of cystic fibrosis sputum. **American Journal of Physiology Lung Cell and Molecular Physiology**, v. 288, p. 903-909, 2005.

DAVIDSON, A. G. F. Gastrointestinal disease in cystic fibrosis. In **Cystic Fibrosis**, ed. M.E HODSON, D. M.; GEDDESON, London: Arnold, 2000, p. 261-288.

DAVIS, P. M. Cystic Fibrosis since 1938. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v. 173, p. 475-482, 2006.

DEAN, M.; RZHETSKY, A.; ALLIKMETS, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Genome Research**, v. 11, p. 1156-1166, 2001.

DHSS - Department of Health and Social Security. Recommended daily amounts of food energy and nutrients for groups of people in the U.K. (revision). Report No. 15. London: HMSO, 1985.

DODGE, J. A, TURCK, D. Cystic fibrosis: nutritional consequences and management. **Best Practices of Research in Clinical Gastroenterology**, v. 20, p. 531-546, 2006.

DOGAN, Y.; ERKAN, T.; YALVAÇ, S.; ALTAY, S.; COKUGRAS, F. C.; AYDIN, A.; KUTLU, T. Nutritional status of patients hospitalized in pediatric clinic. **Turkey Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 4, p. 212-216, 2005.

DOMINGUEZ, C. Enhanced oxidative damage in cystic fibrosis patients. **Bio Factors**, v. 8, p. 149-153, 1998.

DOULL, I. J.; RYLEY, H. C.; WELLER, P.; GOODCHILD, M. C. Cystic fibrosis-related deaths in infancy and the effect of newborn screening. **Pediatric Pulmonology**, v.31, n. 5, p. 363-366, 2001.

DOUROS, K.; LOUKOU, I.; NICOLAIDOU, P.; DOUDOUNAKIS, S. Bone mass density and associated factors in cystic fibrosis patients of young age. **Journal of Paediatric Child Health**, v. 44, p. 681-685, 2008.

DUFF, A. J. A.; WOLLFE, S. P.; DICKSON, C., CONWAY, S. P.; BROWNLEE, K. G. Feeding Behavior Problems in Children With Cystic Fibrosis in the UK: Prevalence and Comparison With Healthy

Controls. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**, v. 36, n. 4, p. 443-447, 2003.

ELIZUR, A.; CANNON, C. L.; FERKOL, T. W. Airway inflammation in cystic fibrosis. **Chest**, v. 133, p.489-495, 2008.

FARRELL, P. M. Malnutrition and Improves Long-Term Growth. **Pediatrics**, v. 107, p. 1-13, 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p.61-68, 1997.

FIATES, G. M. R.; BARBOSA, E.; AULER, F.; FEITEN, S. F.; MIRANDA, F. Estado nutricional e ingestão alimentar de pessoas com fibrose cística. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 95-101, 2001.

FLINK, P. O. On Norman's the psychoanalyst and the baby: a new look at work with infants. **International Journal of Psychoanalysis**, v. 82, n. 6, p. 787-796, 2001.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzimology**, v. 105, p.114-121, 1984.

FORMAN, H.; HONGQIAO, Z.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 1-12, 2009.

FRISANCHO, A. R. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34 n. 11, p. 2540-2545, 1981.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators of Inflammation**, v. 10, p. 223-227, 2001.

GARDNER, P. R. Superoxide production by the mycobacterial and pseudomonad quinoid pigments phtiocol and pyocyanine in human

lung cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, p. 267-274, 1996.

GASPAR, M. A.; CHIBA, S. M.; GOMES, C. E. T.; JULIANO, Y.; NOVO, N. F.; LOPEZ, F. A. Resultado de intervenção nutricional em crianças e adolescentes com fibrose cística. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 568-572, 2002.

GELLER, D. E.; RUBIN, B. K. Respiratory Care and Cystic Fibrosis. **Respiratory Care**, v. 54, n. 6, 347-356, 2009.

GHAFOURIFAR, P.; CADENAS, E. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, p.190-195, 2005.

GHOSAL, S.; TAYLOR, C. J.; PICKERING, M.; MCGAW, J., BECKLESS-WILSON, N.; WALES, J. K. Disproportionate head growth retardation in cystic fibrosis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 72, p. 150-152, 1994.

GILLIGAN, P. H.; KISKA, D. L.; APPLEMAN, M. D. Cumitech 43, Cystic Fibrosis Microbiology. **Coordinating edition of ASM Press**, Washington, D.C, 2006, 72p.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GOZDZIK, J.; COFTA, S.; PIORUNEK, T.; BATURA, G. H.; KOZICKY, J. Relationship between nutritional status and pulmonary function in adult cystic fibrosis patients. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, n. 6, p. 253-260, 2008.

GRASEMANN, H.; KNAUER, N.; BÜSCHER, R.; HÜBNER, K.; DRAZEN, J. M.; RATJEN, F. Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, p. 2172-2176, 2000.

GRASSMÉ, H.; BECKER, K. A.; ZHANG, Y.; GULBINS, E. CFTR-dependent susceptibility of the cystic fibrosis host to *Pseudomonas*

aeruginosa. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 8, p. 578-583, 2010.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A. J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n.1, p.: 131-138, 1982.

GRIESE, M.; RAMAKERS, J.; KRASSELT, A.; STAROSTA, V.; VAN KONINGSBRUGGEN, S.; FISCHER, R.; RATJEN, F.; MULLINGER, B.; HUBER, R. M.; MAIER, K.; RIETSCHHEL, E.; SCHEUCH, G. Improvement of alveolar glutathione and lung function but not oxidative state in cystic fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care of Medicine**, v. 169, p. 822-828, 2004.

GRIMBLE, R. F.; TAPPIA, P. S. Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, v. 37, n. 1, p. 57-65, 1998.

GROENWEG, G. Assessment of nutritional status in children with cystic fibrosis: conventional anthropometry and bioelectrical impedance analysis. A cross-sectional study in Dutch patients. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 1, n. 2, p. 276-280, 2002.

HALLIWELL, B. **Antioxidantes**. In: ZIEGLER, E. E; FILER, J. R, L. J. Conocimientos actuales sobre nutrición. 7. ed . Washington: OMS, 1997, p.636-644.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 531-542, 2009.

HALLIWELL, B.; LONG, L. H.; YEE, T. P.; LIM, S.; KELLY, S. Establishing Biomarkers of Oxidative Stress: The Measurement of Hydrogen Peroxide in Human Urine. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, p. 1085-1092, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen is a toxic gas – an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: University Press, 2007, p.1-35.

HAMILL, P. V.; DRIZD, T. M. D.; CLIFFORD, J.; REED, R.; ROCHE, A. Physical growth: National Center for Health Statistics percentiles. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 607-629, 1979.

HENRICHFREISE, B.; WIEGAND, I.; PFISTER, W.; WIEDEMAN, B. Resistance Mechanisms of Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Germany and Correlation with Hypermutation. **Antimicrobials Agents Chemother**, v. 51, p. 4062-4070, 2007.

HOFFMAN, L.R.; RICHARDSON, A.R.; HOUSTON, L.S.; KULASEKARA, H.D.; MARTENS-HABBENA, W.; KLAUSEN, M.; BURNS, J. L.; STAHL, D. A.; HASSETT, D. J.; FANG, F. C.; MILLER, S.I. Nutrient Availability as a Mechanism for Selection of Antibiotic Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF Airway. **PLoS Pathogenes**, v. 6, n. 1, p. 100-107 2010.

HUDSON, V. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. **Free Radicals Biology & Medicine**, v. 30, p. 1440-1461, 2001.

INNIS, S. M.; DAVIDSON, A. G. F. Cystic Fibrosis and Nutrition: Linking Phospholipids and Essential Fatty Acids with Thiol Metabolism, **Annual Revision of Nutrition**, v. 28, p. 55-72, 2008.

JONES, K. L.; HEGAB, A. H.; HILLMAN, B. C.; SIMPSON, K. L.; JINKINS, P. A.; GRISHAM, M. B.; OWENS, M. W.; SATO, E.; ROBBINS, R. A. Elevation of nitrotyrosine and nitrate concentrations in cystic fibrosis sputum. **Pediatric Pulmonology**, v. 30, n. 2, p.79-85, 2000.

JUNGAS, T. Glutathione Levels and BAX Activation during Apoptosis Due to Oxidative Stress in Cells Expressing Wild-type and Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 31, p. 27912-27918, 2002.

KALIVIANAKIS, M.; MINICH, D. M.; BIJLEVELD, C. M. A.; van AALDEREN, W. M. C.; STELLAARD, F.; LASEUR, M.; VONK, R. J.; VERKADE, H. J. Fat malabsorption in cystic fibrosis receiving enzyme replacement therapy is due to impaired intestinal uptake of long chain fatty acids. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 1, p:127-134, 1999.

KAWCHAK, D. A. Longitudinal, prospective analysis of dietary intake in children with cystic fibrosis. **Journal of Pediatrics**, v.129, p.119-29, 1996.

KEEN, C.; OLIN, A. C.; ERIKSSON, S.; EKMAN, A.; LINDBLAD, A.; BASU, S.; BEERMANN, C.; STRANDVIK, B. Supplementation With Fatty Acids Influences the Airway Nitric Oxide and Inflammatory Markers in Patients With Cystic Fibrosis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 50, n. 5, p. 537-544, 2010.

KELLY, F. J. Gluthathione: in defence of the lung. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 963-966, 1999.

KEREM, E.; CONWAY, S.; ELBORN, S.; HEYERMAN, H. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 4, p. 7-26, 2005.

KETTLE, A.; CHAN, T.; OSBERG, I. Myeloperoxidase and Protein Oxidation in the Airways of Young Children with Cystic Fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care of Medicine**, v. 170, p. 1317–1323, 2004.

KIDD, P.M. Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Alternative Medicine Review**, v. 2, n. 3, p.155-176, 1997.

KONSTAN, M. W.; BUTLER, S. M.; WOHL, M. E.; STODDARD, M.; MATOUSEK, R.; WAGENER, J. S.; JOHNSON, C. A.; MORGAN, W. J. Growth and nutritional indexes in early life predict pulmonary function in cystic fibrosis. **Journal of Pediatrics**, v. 1, n. 42, p. 624-630, 2003.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, n. 47, p. 333-343, 2009.

KREINDLER, J. L.; JACKSON, A. D.; KEMP, P. A.; BRIDGES, R. J.; DANAHAY, H. Inhibition of chloride secretion in human bronchial epithelial cells by cigarette smoke extract. **American Journal of Physiology.Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 288, p. 894-902, 2005.

LAGRANGE-PUGET, M.; DURIEU, I.; ECOCHARD, R. M. Longitudinal Study of Oxidative Status in 312 Cystic Fibrosis Patients in Stable State and During Bronchial Exacerbation. **Pediatric Pulmonology**, v. 38, p.43-49, 2004.

LAGUERRE, M. LOPEZ-GIRALDO, L. J.; LECOMBTE, J.; VILLENEUVE P.. Widespread methods and new analytical approaches in antioxidant evaluation, **Biomedical Informatics Insights**, v. 20, n. 5, p. 328-332, 2009.

LANDS, L. C.; GREY, V.; SMOUNTAS, A. A. Lymphocyte glutathione levels in children with cystic fibrosis. **Chest**, v.116, p. 201-205, 1999.

LANG, J. D.; MCARDLE, P. J.; O'REILLY, P. J.; MATALON, S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. **Chest**, v. 122, p. 314-320, 2002.

LEAL, T.; FAJAC, I.; WALLACE, H. L.; LEBECQUE, P.; LEBACQ, J.; HUBERT, D.; DALL'AVA, J.; DUSSER, D.; GANESAN, A. P.; KNOOP, C.; CUMPS, J.; WALLEMACQ, P.; SOUTHERN, K.W. Airway ion transport impacts on disease presentation and severity in cystic fibrosis. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 764-772, 2008.

LEE, D. S.; ROSENBERG, M. A.; PETERSON, A.; MAKHOLM, L.; HOFFMAN, G.; LAESSIG, R. H.; FARRELL, P. M. Analysis of the costs of diagnosing cystic fibrosis with a newborn screening program. **Journal of Pediatrics**, v.142, n. 6, p. 617-623, 2003.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D., OLIVER, C.N., AMICI A, CLIMENT I, LENZ AG, AHN BW, SHALTIEL S, STADTMAN E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LINNANE, S. J.; KEATINGS, V. M.; COSTELLO, C. M.; MOYNIHAN, J. B.; O'CONNOR, C. M.; FITZGERALD, M. X.; MCLOUGHLIN, P. Total sputum nitrate plus nitrite is raised during acute pulmonary infection in cystic fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 158, n. 1, p.207-212, 1998.

LITTLEWOOD, J.; MAC DONALD, A. Rationale of modern dietary recommendations in cystic fibrosis. **Journal Research of Society Medical**, v. 80, n. 15, p.16-24, 1987.

LITTLEWOOD, J.; WOLFE, S.; CONWAY, S. Diagnosis and treatment of intestinal malabsorption in cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, v. 41, p. 35-49, 2006.

LIU, R. M.; PRAVIA, K. A. G. Oxidative stress and glutathione in TGF- β - mediated fibrogenesis, **Free Radicals in Bioogy and. Medicine**, v.48, p:1-15; 2010.

MAC DONALD, A. The diet in cystic fibrosis: why is it important? **Current Paediatrics**, v. 10, n. 3, p:155-61, 2000.

MARCUS, M. S.; SONDEL, S. A.; FARRELL, P. M.; LAXOVA, A.; CAREY, P. M.; LANGHOUGH, R.; MISCHLER, E. H. Nutritional status of infants with cystic fibrosis associated with early diagnosis and intervention. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p.578-585, 1998.

MARTIN, S.L.; MOFFITT, K.L.; MCDOWELL, A.; GREENAN, C.; BRIGHT-THOMAS, R. J.; JONES, A. M.; WEBB, A. K.; ELBORN, J. S. Association of airway cathepsin b and s with inflammation in cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, v. 45, p. 860-868, 2010.

MARTÍNEZ-COSTA, C.; ESCRIBANO, A.; NÚÑEZ GÓMEZ, F.; GARCÍA-MASET, L.; LUJÁN, J.; MARTÍNEZ-RODRÍGUES, Y. L. Intervención nutricional en niños y adolescentes com fibrosis quística. Relación con la función pulmonar. **Nutricion Hospitalaria**, v. 20, n. 3, p. 182-88, 2005.

MATTOSCIO, D.; EVANGELISTA, V.; DE CRISTOFAR, R. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in human platelets: impact on mediators and mechanisms of the inflammatory response. **FASEB Journal**, v. 24, n. 10, p. 3970-3980, 2010.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. **Current Procedural Terminology**, Standard Edition, American Medical Association, Chicago, 2006, 628p.

MELO, E. D.; SILVEIRA, T.R. Esteatócrito: um método semiquantitativo de avaliação de gordura fecal padronizada do teste. **Jornal de Pediatria de Porto Alegre**, v. 71 n. 5, p. 273-278, 1995.

MERELLE, M. E. Newborn Screening for cystic fibrosis. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 58, n. 3, p. 897-912, 2001.

MIAO, L.; DARET, K.; CLAIR, ST. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 344-356, 2009.

MORICEAU, S.; LENOIR, G.; WITKO-SARSAT, V. In Cystic Fibrosis Homozygotes and Heterozygotes, Neutrophil Apoptosis Is Delayed and Modulated by Diamide or Roscovitine: Evidence for an Innate Neutrophil Disturbance. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 3, p. 260-266, 2010.

MORTON, A. M. Conference on 'Malnutrition matters': The nutritional challenges of the young adult with cystic fibrosis: transition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, p. 430-440, 2009.

NASR, S. Z.; DRURY, R. D. Appetite stimulants use in cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, v. 43, p. 209-219, 2008.

NCHS/CDC NATIONAL CENTER HEALTH STATISTICS/CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **2000 CDC Growth Charts for the United States**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/growthcharts.html>>. Acesso em 21 fev. 2009.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 4, p. 469-484, 2009.

NTIMBANE, T.; KRISHNAMOORTHY, P.; HUOT, C.; LEGAULT, L.; JACOB, S. V.; BRUNET, S.; LEVY, E. Oxidative stress and cystic fibrosis-related diabetes: A pilot study in children, **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 7, n. 5, p. 373-384, 2008.

OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

O'MALLEY, Y. Q. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. **American Journal of Physiological Lung and Cell Molecular Physiology**, v. 287, p. 94-103, 2004.

PAPAS, K. A. A pilot study on the safety and efficacy of a novel antioxidant rich formulation in patients with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 59, n.1, p. 328-337, 2007.

PELLEGRINO, R.; VIEGI, G.; BRUSASCO, V.; CRAPO, R. O.; BURGOS, F.; CASABURI, R.; COATES, A.; VAN DER GRINTEN, C. P. M.; GUSTAFSSON, P.; HANKINSON, J.; JENSEN, R.; JOHNSON, D. C.; MACINTYRE, N.; MCKAY, R.; MILLER, M. R.; NAVAJAS, D.; PEDERSEN, O. F.; J. WANGER.. Interpretative strategies for lung function tests. **European Respiratory Journal**, v. 26, p. 948-968, 2005.

PENCHARZ, P. B.; DURIE, P. R. Pathogenesis of malnutrition in cystic fibrosis, and its treatment. **Clinical Nutrition**, v. 19, n. 6, p. 387-394, 2000.

PINTO, I. C. S.; SILVA, C. P.; BRITTO, M. C. A. Nutritional, clinical and socioeconomic profile of patients with cystic fibrosis treated at a referral center in northeastern Brazil. **Brasilian Journal of Pneumology**, v. 35, n. 2, p. 137-143, 2009.

PLANELLAS-CASES, P.; JENTSCH, T. J. Chloride channelopathies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, p. 173-189, 2009.

PLATT, M. D.; SCHURR, M. J.; SAUER, K.; VAZQUEZ, G.; KUKAVICA-IBRULJ, I.; POTVIN, E.; LEVESQUE, R. C.; FEDYNAK, A.; BRINKMAN, F. S. L.; SCHURR, J.; HWANG, S. H.; LAU, G. W.; LIMBACH, P. A.; ROWE, J. J.; LIEBERMAN, M. A.; BARRAUD, N.; WEBB, J.; KJELLEBERG, S.; HUNT, D. F.; HASSETT, D. J. Proteomic, microarray, and signature-tagged mutagenesis analyses of anaerobic *Pseudomonas aeruginosa* at pH 6.5, likely representing chronic, late-stage cystic fibrosis airway conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 2739-2758, 2008.

PORTAL, B. C., RICHARD, M. J.; FAURE, H. S.; HADJIAN, A. J.; FAVIER, A. E. Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 843-847, 1995.

POWERS, S. W.; JONES, J. S.; FERGUSON, K. S., PIAZZA, W. C.; DAINES, C.; ACTON, J. D. Randomized Clinical Trial of Behavioral and Nutrition Treatment to Improve Energy Intake and Growth in Toddlers and Preschoolers With Cystic Fibrosis. **Pediatrics**, v. 116, n. 6, p. 1442-1450, 2005.

PULLAN, S.T. Microbial responses to nitric oxide, and nitrosative stress: growth, “omic” and physiological methods. **Methods in Enzymology**, v. 437, p. 499-519, 2008.

QU, F.; QIN, X. Q.; CUI, Y. R.; XIANG, Y. Ozone stress downregulates the expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bronchial epithelial cells. **Chemical Biological Interactions**, v. 74, p. 378-382, 2008.

RAHMAN, I.; MAC NEEW, J. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. **European Respiratory Journal**, v. 16, p. 534-554, 2000.

RAMSEY, B. W.; FARRELL, P. M., PENCHARZ. P. Nutritional assessment and management in cystic fibrosis: a consensus report. **American Journal of Clinical Nutrition**, n. 55, p.108-116, 1992.

RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. L.; ISAKON, P. C. Comparative evaluation of arachidonic acid (aa) and

tetradecanoylphorbol acetate (tpa)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v.17, n.6, p. 723-741, 1993.

RASKIN, S. **Estudo multicêntrico das bases da genética molecular e da epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras**. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 2001. p. 56-67.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico – aplicações clínicas dos achados laboratoriais**, 4ª edição, 1988, 429p.

REID, D.; MISSO, N.; AGGARWAL, S. Oxidative stress and lipid-derived inflammatory mediators during acute exacerbations of cystic fibrosis. **Respirology**, v. 12, n. 1, p. 63-69, 2007.

REIS, A. J. C.; DAMACENO, N. Fibrose cística – artigo de revisão. **Jornal da Sociedade Brasileira de Pediatria**, v. 74, n. 1, p. 76-94, 1998.

RENÉ, C.; LOPEZ, E.; CLAUSTRES, M. NF-E2-related factor 2, a key inducer of antioxidant defenses, negatively regulates the CFTR transcription. **Cell Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 2297-2309, 2010.

RENNOLDS, J.; BUTLER, S.; MALONEY, K.; BOYAKA, P. N.; DAVIS, I. C.; KNOEL, D. L.; PARINANDI, M. L.; BOYAKA, E. C. Cadmium Regulates the Expression of the CFTR Chloride Channel in Human Airway Epithelial Cells. **Toxicological sciences**, v.116, p. 349-358, 2010.

RIBEIRO, J. D. Controversies in cystic fibrosis-from pediatrician to specialist. **Jornal de Pediatria do Rio de Janeiro**, v. 78, n. 2, p. 171-186, 2002.

ROBROKS, C. M.; ROSIAS, P. P.; van VLIET, D. Biomarkers in exhaled breath condensate indicate presence and severity of cystic fibrosis in children. **Pediatric Allergy Immunology**, v. 19, p. 652-659, 2008.

RONSEIN, G. E. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, 563-568, 2006.

ROSA, F. R.; DIAS, F. G.; NOBRE, LUCIANA N.; MORAIS, H. A. Cystic fibrosis: a clinical and nutritional approach. **Revista de Nutrição Campinas**, v. 21, n. 6, p. 725-737, 2008.

ROSENFELD, M.; GIBSON, R. L.; MCNAMARA, S. Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, v. 32, p. 356-366, 2001.

ROVER-JUNIOR, L. Sistema Antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SADIKOT, R. T.; BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W.; PRINCE, A. S. Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, p.1209-1223, 2005.

SCHECHTER, M. S.; MARGOLIS, P. Improving subspecialty healthcare: lessons from cystic fibrosis. **Journal of Pediatrics**, v.147,p. 295-301, 2005.

SCHILLER, K. R.; MANIAK, P. J.; O'GRADY, S. M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair, **American Journal of Physiology- Cellular Physiology**. v. 299, n. 5, p. 912-921; 2010.

SCHOBERT, M.; JAHN, D. Anaerobic physiology of *pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 8, p. 549-556, 2010.

SCHONHAUT, L.; RODRÍGUEZ, L.; LIZAMA, C.; LUCERO, Y.; MALDONADO, F.; GONZÁLEZ, C.; AZÓCAR, P. Adecuado uso del perímetro cefálico de lactantes en sus controles de salud. **Review of Children and Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 189-210, 2004.

SCHWARZER, C.; FISCHER, H.; KIM, E. J.; BARBER, K. J.; MILLS, A. D.; KURTH, M. K.; GRUENERT, D. C.; SUH, J. H.; E. MACHEN, T. E.; ILLEK, B. Oxidative stress caused by pyocyanin

impairs CFTR chloride transport in human bronchial epithelial cells. **Free Radicals and Biology Medicine**, v. 45, p. 1653-1662, 2008.

SERMET-GAUDELUS, J.; SOUBERBIELLE, H.; RUIZ. Low bone mineral density in young children with cystic fibrosis. **American Journal of Critical Care and Medicine**, v. 175, p. 951-957, 2007.

SHAMSEER, L.; ADAMS, D.; BROWN, N.; JOHNSON, J. A.; VOHRA, S. ANTIOXIDANT MICRONUTRIENTS FOR LUNG DISEASE IN CYSTIC FIBROSIS. Antioxidant micronutrients for lung disease in cystic fibrosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 12, p. 734-738, 2010.

SHMARINA, G.; PUKHALSKY, A. L.; KOKAROVTSOVA, S. N. Improvement of nutrient absorption may enhance systemic oxidative stress in cystic fibrosis patients. **Mediators of Inflammation**, v. 10, p. 61-67, 2001.

SHWACHMAN, H.; KULCZYCKI, L. L. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis; studies made over a five-to fourteen-year period. **American Journal of Diseases of Children**, v. 96, n.1, p. 6-15, 1958.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 315S-321S, 1995.

SILVEIRA-JÚNIOR, A. D. **O exame coprológico e as funções digestivas**. Santos: São Paulo, 1988, 64p.

SINAASAPPEL, M.; STERN, M.; LITTLEWOOD, J.; WOLFE, S.; STEINKAMP, G.; HIEJERMAN, H.G.M.; ROBERECHT, E.; DÖRING, G. Consensus Report Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. **Journal of Cystic Fibrosis**, v.1, p. 51-75, 2002.

SLOBODIANIK, N. H.; FELIU, M. S.; PERRIS, P.; BARBEITO, S.; STRASNOY, I.; FRANCELLO, A.; FERRARO, M. Biomarker profile in children with cystic fibrosis: preliminary study. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 3, p. 354-356, 2010.

SOUTHERN, K. W. Cystic Fibrosis and Formes Frustes of CFTR-Related Disease. **Respiration**, v. 74, p. 241-251, 2007.

SPIRO, S. Regulators of bacterial responses to nitric oxide. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 193-211, 2007.

STACCHIOTTI, A. Stress proteins and oxidative damage in a renal derived cell line exposed to inorganic mercury and lead. **Toxicology**, v. 264, p. 215-224, 2009.

STALLINGS, V. A.; ROBINSON, K. A.; FERANCHAK, A.P.; QUINTON, H. Evidence-based practice recommendations for nutrition-related management of children and adults with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency: results of a systematic review. **Journal of American Dietetic Association**, v.108, p. 832-839, 2008.

STALVEY, M. S.; FLOTTE, T. R. Endocrine Parameters of Cystic Fibrosis: Back to Basics. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 108, p. 353-361, 2009.

STEINRATHS, M.; VALLANCE, H. D.; DAVIDSON, A. G. F. Delays in diagnosing cystic fibrosis - Can we find ways to diagnose it earlier? **Le Médecin de famille canadien**, v. 54, p. 589-595, 2008.

STETTLER, N.; KAWCHAK, D. A.; BOYLE, L. L.; PROPERT, K. J.; SCANLIN, T. F.; STALLINGS, V. A.; ZEMEL, B. S. Prospective evaluation of growth, nutritional status, and body composition in children with cystic fibrosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 407-413, 1997.

STEWART, L.; KATIAL, R. Exhaled nitric oxide, immunology and allergy clinics of North America. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 27, n. 4, p. 571-586, 2007.

THOMSON, E.; BRENNAN, S.; SENTHILMOHAN, R. Identifying peroxidases and their oxidants in the early pathology of cystic fibrosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v.15, n. 49, p. 1354-1360, 2010.

TRABULSI, J.; SCHALL, J.; FITTENBACH, R.; OLSEN, I. E. Energy balance and the accuracy of reported energy intake in preadolescent

children with cystic fibrosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.84, n.4, p. 523-530, 2006.

TRUDEL, S.; KELLY, M.; FRITSCH, J.; NGUYEN-KHOA, T.; THEROND, P.; COUTURIER, M.; DADLEZ, M.; DEBSKI, J.; TOUQUI, L.; VALLEE, B.; OLLERO, M.; EDELMAN, A.; BROUILLARD, F. Peroxiredoxin 6 Fails to Limit Phospholipid Peroxidation in Lung from Cfr-Knockout Mice Subjected to Oxidative Challenge. **Plos One**, v. 4, n. 6, p. 607-618, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n.1, p. 44-84, 2007.

VALLADA, E. P. Manual de exame de fezes: coprologia e parasitologia. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998, 60p.

van DER VLIET, A. Oxidative stress in cystic fibrosis: does it occur and does it matter? **Advances in Pharmacology**, v. 38, p. 491-513, 1997.

van DER VLIET, E. A.; CROSS, C. E. Phagocytosis oxidants and nitric oxide in cystic fibrosis: new therapeutic targets? **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 6, n. 6, p. 533-539, 2000.

van DER VLIET, A. NGUYEN, M. N.; SHIGENAGA, M. K.; EISERICH, J. P.; MARELICH, G.P.; CROSS, C. E. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p. 537-546, 2000.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F., MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p.1323-1338, 2007.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International Journal of Obesity**, v. 30, n. 3, p. 400-418, 2006.

VIVES, J. L.; AGUILAR, J. L. **Manual de técnicas laboratoriais em hematologia**. Editora Salvat, 1987. 67p.

von RUECKER, A. A.; BERTELE, R.; HARMS, H. K. Calcium metabolism and cystic fibrosis: mitochondrial abnormalities the glutathione in the epithelial lining fluid suggest a modification of the mitochondrial membrane. **Pediatric Research**, v. 18, p. 594-599, 1984.

VISIOLI, F.; KEANEY-JÚNIOR, R.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep?. **Cardiovascular Respiratory**, v. 47, p.409-419, 2000.

WALLACH, J. **Interpretação de exames laboratoriais**. 7ª ed., Medsi: Rio de Janeiro, 2003, 1068 p.

WEINSIER, R.L.; SCHUTZ, Y.; BRACCO, D. Reexamination of the relationship of resting metabolic rate to fat-free mass and to the metabolically active components of fat-free mass in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, p. 790-794, 1992.

WESTSTRATE, J.; DEURENBERG, P. Body composition in children: proposal for a method to calculate body fat percentage from total body density or skinfold thickness measurements. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 50, n. 110, p. 1115-1129, 1988.

WESTWOOD, A. T. R.; SAITOWITZ, R. Growth and nutrition in South African children with cystic fibrosis. **South Africa Medicine**, v. 89, p. 1276-1278, 1999.

WHITE, H.; WOLFE, S. P.; FOY, J.; MORTON, A.; CONWAY, S. P.; BROWNLEE, K. B. Nutritional intake and status in children with cystic fibrosis: does age matter? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 44, p.116-123, 2007.

WHITE, H.; POLLARD, K.; ETHERINGTON, C.; CLIFTON, I.; MORTON, A. M.; OWEN, D.; CONWAY, S. P.; PECKHAM, D. G. Nutritional decline in cystic fibrosis related diabetes: The effect of intensive nutritional intervention. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 8, n. 3, p. 179-185, 2009.

WIEDEMANN, P.; PAUL, K. D.; STERN, M. Evaluation of body mass index percentiles for assessment of malnutrition in children with cystic fibrosis, **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 759-768, 2007.

WITKO-SARSAT, V.; DELACOURT, C.; RABIER, D.; BARDET, J.; NGUYEN, A. T.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Neutrophil-derived long-lived oxidants in cystic fibrosis sputum. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 152, p. 1910-1916, 1995.

WOLFENDEN, L. L. Vitamin D and bone health in adults with cystic fibrosis. **Clinical Endocrinology**, v. 69, p. 374-381, 2008.

WOOD, L. G.; FITZGERALD, D. A.; GARG, M. L. Hypothesis: vitamin E complements polyunsaturated fatty acids in essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. **Journal of American College of Nutrition**, v. 22, p. 253-257, 2002.

WOOD, L. G.; GIBSON, P. G.; GARG, M. L. Circulating markers to assess nutritional therapy in cystic fibrosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 353, n. 1-2, p. 13-29, 2005.

WOOD, L. G.; DOMINIC A. FITZGERALD, GIBSON, P. G.; COOPER, D. M.; COLLINS, C. E.; GARG, M. L. Oxidative Stress in Cystic Fibrosis: Dietary and Metabolic Factors. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n. 2, 157-165, 2001.

WOOD, L. G.; GARG, M. L., SIMPSON, J. L., MORI, T. A.; CROFT, K. D.; WARK, P. A. B.; GIBSON, P. G. Induced sputum 8-isoprostane concentrations in inflammatory airway diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, p. 426-430, 2005.

WOOTON, S. A. Energy balance and growth in cystic fibrosis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 84, n. 18, p. 22-27, 1991.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION. Declaration of Helsinki, Seoul, 59nd General Assembly-WMA. 2008. Disponível em: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>. Acessado em: 12 Set. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Physical Status: The use and interpretation of anthropometry.** WHO technical report series, n. 854. Geneva: WHO, 1995. 453p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development.** Geneva: WHO, 2006. 312 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multicentre Growth Reference Study Group. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 85, p. 660-667, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Anthro Plus, Global Database on Child Growth and Malnutrition. **Department of Nutrition for Health and Development**, 2008.

ZEIDLER, P. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 67, p. 1001-1026, 2004.

ZEMANICK, E. T.; HARRISA, J. K.; CONWAYB, S.; KONSTANC, M. W.; MARSHALLD, B.; QUITTNERE, A. L. BOGARTF, G. R.; SAIMANG, L.; ACCURSOA, F. J. Measuring and improving respiratory outcomes in cystic fibrosis lung disease: Opportunities and challenges to therapy, **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2009.

ZHANG, Z.; LAI, H. J. Comparison of the use of body mass index percentiles and percentage of ideal body weight to screen for malnutrition in children with cystic fibrosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 982-991, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Marcadores pró-inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfgia em fibrocísticos”

Senhores Pais:

Por Favor, leiam atentamente as instruções abaixo antes de decidir com seu (sua) filho (a) se ele (a) deseja participar do estudo e se o Senhor (a) concorda com que ele (a) participe do presente estudo. Se possível, discuta esse assunto com seu (sua) filho (a) para que seja uma decisão em conjunto.

Eu, _____ confirmo que Diane de Lima Oliveira e Gabriela Datsch Bennemann discutiram comigo este estudo.

1. O presente estudo é parte do trabalho de dissertação de Mestrado das pesquisadoras Diane e Gabriela.
2. O objetivo deste estudo é avaliar a deglutição, a respiração, o estado nutricional, os níveis de estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios dos pacientes com Fibrose Cística
3. Minha participação e do meu filho colaborando neste trabalho é muito importante porque permitirá observar se existem ou não alterações na deglutição associadas ao comprometimento respiratório e quais marcadores de inflamação e estresse oxidativo (processo que ocorre nas células onde ocorre o acúmulo de substâncias que aceleram o envelhecimento destas células, e o aparecimento de doenças) apresentam alterações significativas nos níveis séricos, encontrando-se relacionados à Fibrose Cística. A participação do meu filho na pesquisa implica em eu responder a algumas perguntas sobre a Fibrose Cística e o pesquisador irá examinar dados do prontuário, avaliar a deglutição com exame de imagem, avaliar estado nutricional, analisar exames de sangue e exame da função respiratória.

Fui esclarecido de que os riscos e desconfortos relacionados à pesquisa são os seguintes:

- a) será realizada coleta de sangue,
- b) o exame de imagem será utilizado com RX e contraste. Esse contraste será misturado ao alimento que será oferecido ao paciente, o qual deverá engolir.
4. Eu autorizo os pesquisadores desta pesquisa a utilizar fotos e imagens das avaliações, desde que em nenhum momento apareça a imagem de forma que a criança possa ser identificada. Fui esclarecido também de que estas imagens serão utilizadas somente para esta pesquisa e serão guardadas em local seguro, sob a responsabilidade do pesquisador, durante cinco anos e que, somente as pessoas envolvidas diretamente com a pesquisa terão acesso a elas.
5. O Hospital Infantil Joana de Gusmão também está interessado no presente estudo e já deu a permissão por escrito para que esta pesquisa seja realizada. Porém minha participação e de meu filho (a), ou não, no estudo não implicará em nenhum benefício ou restrição de qualquer ordem para meu (sua) filho (a) ou para mim.
6. Eu também sou livre para não participar desta pesquisa se não quiser. Isto não implicará em quaisquer prejuízos pessoais ou no atendimento de meu filho (a). Além disto, estou ciente de que em qualquer momento, ou por qualquer motivo, eu ou minha família podemos desistir de participar da pesquisa.
7. Estou ciente de que o meu nome e o do meu filho não serão divulgados e que somente as pessoas diretamente relacionadas à pesquisa terão acesso aos dados e que todas as informações serão mantidas em segredo e somente serão utilizados para este estudo.
8. Se eu tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa, eu posso entrar em contato com Diane pelo telefone (48) 88343012 e Gabriela pelo telefone (48) 9113 0043.

9. Eu concordo em participar deste estudo.

Nome e assinatura de participante maior de 14 anos: _____

Nome e assinatura do responsável legal pela criança: _____

Entrevistador: _____ Data: _____

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do comitê de ética e pesquisa do Hospital Infantil Joana de Gusmão



Hospital Infantil Joana de Gusmão
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER 004/2009

NOME DO PROJETO: Fibrose cística: interferência da disfagia na função respiratória e estado nutricional	
PESQUISADORA: Diane de Lima Oliveira	
ORIENTADORA: Emília Addison Machado Moreira	
INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL: HIJG	
DATA DO PARECER: 02/09/2008	REGISTRO NO CEP: 048/2008
GRUPO E ÁREA TEMÁTICA: Grupo III – 4.05	

DOCUMENTOS SOLICITADOS	SITUAÇÃO
1.FOLHA DE ROSTO	OK
2.PROJETO DE PESQUISA	OK
3.CURRÍCULO DO PESQUISADOR	OK
4.CARTA DE ENCAMINHAMENTO AO CEP	OK
5.TERMO DE COMPROMISSO ÉTICO	OK
6.CONCORDÂNCIA DO SERVIÇO	OK
7.DECLARAÇÃO ASSINADA PELA DIREÇÃO DO HIJG	OK
8. SUMÁRIO DO PROJETO	OK
9. FÓRMULÁRIO DE AVALIAÇÃO ECONÔMICO FINANCEIRA	OK
10. DECLARAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO E RELATÓRIO FINAL	OK

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152
Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina
Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.
e-mail: cephiig@saude.sc.gov.br

OBJETIVOS

Geral: Identificar marcadores inflamatórios, estresse oxidativo e de disfagia em portadores de fibrose cística (FC).

Específicos:

- Avaliar o estado nutricional determinando o índice de massa corporal e os percentis de peso/estatura e peso/idade;
- Avaliar a resposta inflamatória, medindo-se enzimas mielo-oxidase (MPO), adenosinadeaminase (ADA) e citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1beta), proteína C reativa, e dos metabólitos do óxido nítrico (NOx);
- Avaliar o estresse oxidativo medindo-se os níveis de glutatona reduzida (GCH), as atividades enzimáticas da catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) e níveis de peroxidação lipídica (TBAR s) e proteína carbolinada;
- Correlacionar estresse oxidativo e resposta inflamatória;
- Avaliar a presença de disfagia através da deglutição, função pulmonar, fluxo e pH salivar;
- Correlacionar IMC com os marcadores inflamatórios, estresse oxidativo e de disfagia;
- Correlacionar a resposta inflamatória com a função pulmonar, deglutição, fluxo e pH salivar;
- Correlacionar o estado nutricional com função pulmonar.

SUMÁRIO DO PROJETO

Estudo tipo caso-controle, a ser realizado no ambulatório interdisciplinar de FC do HIJG, durante um período de 24 meses. Serão avaliados 30 pacientes com FC, atendidos neste hospital, com idade entre 6 e 16 anos, pareados com indivíduos saudáveis, eutróficos, de acordo com idade e sexo. Para inclusão no estudo, os pacientes e/ou responsáveis deverão ter concordado com a realização da pesquisa, por meio do TCLE. Para o grupo controle serão excluídos os portadores de doenças inflamatórias, neurológicas, degenerativas, com insuficiência renal e/ou diabetes, uso de antibióticos e/ou hormônios, drogas anti-inflamatórias não hormonais, seis meses antes da coleta do estudo. Os pacientes com FC serão divididos em três grupos (sem inflamação, com inflamação e sem refluxo e, com inflamação e com refluxo gastroesofageano (RGE)). Caso a proposta de financiamento não seja aprovada, os pacientes com FC serão divididos em dois grupos (com e sem RGE).

Avaliação nutricional: antropométrica por meio dos percentis e escore z dos indicadores

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152
Bairro Agrônômica, Florianópolis, Santa Catarina
Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.

e-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

peso/estatura, peso/idade e estatura/idade, IMC; utilizando-se as referências da OMS 206 e CDC 2000. A composição corporal será avaliada por meio da impedância bioelétrica (não citada nos objetivos específicos), por meio da balança bipolar modelo BF-698. Avaliação bioquímica: hemograma, proteína total, albumina, ferritina, sudam III, esteatócrito.

Avaliação de anti-oxidantes e estresse oxidativo: dosagem sérica de GCH, catalase, GPx, substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARs), proteína carbonilada.

Avaliação da resposta inflamatória: dosagem sérica de proteína C reativa, metabólitos do ácido nítrico, atividade da mieloperoxidase, TNF-alfa, interleucina 1-beta, adenosina deaminase.

Avaliação da função respiratória: espirometria e escore de Schwachman-Hulczyccki.

Avaliação do RGE: pHmetria esofágica de 24 horas (será aceito exame realizado em até 3 meses antes da inclusão no estudo).

Avaliação da deglutição: por meio de avaliação clínica fonoaudiológica, observando-se a deglutição de 3 consistências alimentares (sólido, pastoso e líquido). Será avaliado também o fluxo salivar e a capacidade de tampão pH salivar.

JUSTIFICATIVA

A partir do conhecimento gerado pela pesquisa será possível avaliar mecanismos inflamatórios e mecânicos envolvidos na patogênese da Fibrose Cística. Seu entendimento conduzirá a formas a melhorias nas orientações e tratamento destes pacientes.

METODOLOGIA

1. DELINEAMENTO – Estudo observacional, analítico, tipo caso-controle.
2. CÁLCULO E TAMANHO DA AMOSTRA – Amostra de conveniência, com aproximadamente 60 indivíduos.
3. PARTICIPANTES DE GRUPOS ESPECIAIS – crianças e adolescentes portadores de enfermidade crônica.
4. RECRUTAMENTO – voluntário, por meio do ambulatório de atendimento interdisciplinar à FC e encaminhamentos ao HIJG para realização de pHmetria.
5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO / EXCLUSÃO – Descritos no projeto de pesquisa
6. PONDERAÇÃO ENTRE RISCOS – BENEFÍCIOS – Adequada

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152
Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina

Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.

e-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

- 7.USO DE PLACEBO OU WASH-OUT - Não se aplica
- 8.MONITORAMENTO E SEGURANÇA DOS DADOS – OK
- 11.AVALIAÇÃO DOS DADOS - adequados
- 12.PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE – OK
- 13.PREOCUPAÇÃO COM OS ASPECTOS ÉTICOS – Sim
- 14.CRONOGRAMA - adequado
15. PROTOCOLO DE PESQUISA - OK
- 16.ORÇAMENTO – OK

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE) - Adequado

PARECER FINAL

APROVADO

- Informamos que o presente parecer foi analisado e aprovado em reunião deste comitê, na data de 17/02/2009.
- Conforme Resolução 196/92, capítulo III.2.h, o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios periódicos sobre o andamento da pesquisa e relatório final. No site: www.saude.sc.gov.br/hijg/CEP.htm, está disponibilizado modelo. Seu primeiro relatório está previsto para AGOSTO DE 2009.

Jucélia Maria Guedert
Coordenadora do CEP-HIJG
Jucélia Maria Guedert
JUCÉLIA MARIA GUEDERT

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - HIJG.

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152
Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina

Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.

e-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

ANEXO B - Critérios da World Health Organization (2006 e 2007) para classificação do Estado Nutricional de crianças e adolescents

Tabela 1 - Peso-para-idade (P/I) - crianças de 0 a menores de 5 anos de idade

Valores Críticos		Diagnóstico Nutricional
$< \text{Percentil } 0,1^{\circ}$	$< \text{Escore-z } 3$	Muito baixo peso para a idade
$\geq \text{Percentil } 0,1^{\circ} \text{ e } < 3^{\circ}$	$\geq \text{Escore-z } -3 \text{ e } < \text{Escore-z } -2$	Baixo peso para a idade
$\geq \text{Percentil } 3^{\circ} \text{ e } \leq 97^{\circ}$	$\geq \text{Escore-z } -2 \text{ e } \leq \text{Escore-z } +2$	Peso adequado para idade
$> \text{Percentil } 97^{\circ}$	$> \text{Escore-z } +2$	Peso elevado para a idade

Fonte: WHO, 2006

Tabela 2 - Estatura-para-idade (E/I) - crianças de 0 a menores de 5 anos de idade

Valores Críticos		Diagnóstico Nutricional
$< \text{Percentil } 0,1^{\circ}$	$< \text{Escore-z } -3$	Muita baixa estatura para idade
$\geq \text{Percentil } 0,1^{\circ} \text{ e } < 3^{\circ}$	$\geq \text{Escore-z } -3 \text{ e } < \text{Escore-z } -2$	Baixa Estatura para a idade
$\geq \text{Percentil } 3^{\circ}$	$\geq \text{Escore-z } -2$	Estatura Adequada para a idade

Fonte: WHO, 2006

Tabela 3 - Peso-para-estatura (P/E) – crianças menores de cinco anos de idade

Valores Críticos		Diagnóstico Nutricional
$< \text{Percentil } 0,1^{\circ}$	$< \text{Escore-z } -3$	Magreza Acentuada
$\geq \text{Percentil } 0,1^{\circ} \text{ e } < \text{Percentil } 3^{\circ}$	$\geq \text{Escore-z } -3 \text{ e } < \text{Escore-z } -2$	Magreza
$\geq \text{Percentil } 3^{\circ} \text{ e } \leq \text{Percentil } 85^{\circ}$	$\geq \text{Escore-z } -2 \text{ e } \leq \text{Escore-z } + 1$	Eutrofia
$> \text{Percentil } 85^{\circ} \leq \text{Percentil } 97^{\circ}$	$> \text{Escore-z } + 1 \text{ e } \leq \text{Escore-z } + 2$	Risco de sobrepeso
$> \text{Percentil } 97^{\circ} \text{ e } \leq \text{Percentil } 99,9^{\circ}$	$> \text{Escore-z } + 2 \text{ e } \leq \text{Escore-z } + 3$	Sobrepeso
$> \text{Percentil } 99,9^{\circ}$	$\geq \text{Escore-z } + 3$	Obesidade

Fonte: WHO, 2006

Tabela 4 - IMC para a idade (IMC/I) - crianças de 0 a menores de 5 anos de idade

Valores Críticos		Diagnóstico Nutricional
$< \text{Percentil } 0,1^{\circ}$	$< \text{Escore-z } -3$	Magreza Acentuada
$\geq \text{Percentil } 0,1^{\circ} \text{ e } < \text{Percentil } 3^{\circ}$	$\geq \text{Escore-z } -3 \text{ e } < \text{Escore-z } -2$	Magreza
$\geq \text{Percentil } 3^{\circ} \text{ e } \leq \text{Percentil } 85^{\circ}$	$\geq \text{Escore-z } -2 \text{ e } \leq \text{Escore-z } + 1$	Eutrofia
$> \text{Percentil } 85^{\circ} \leq \text{Percentil } 97^{\circ}$	$> \text{Escore-z } + 1 \text{ e } \leq \text{Escore-z } + 2$	Risco de sobrepeso
$> \text{Percentil } 97^{\circ} \text{ e } \leq \text{Percentil } 99,9^{\circ}$	$> \text{Escore-z } + 2 \text{ e } \leq \text{Escore-z } + 3$	Sobrepeso
$> \text{Percentil } 99,9^{\circ}$	$\geq \text{Escore-z } + 3$	Obesidade

Fonte: WHO, 2006

Tabela 5 – Estatura-para-idade (E/I) - crianças de 5 a 10 anos de idade

Valores Críticos		Diagnóstico Nutricional
< Percentil 0,1 ^o	< Escore-z -3	Muita baixa estatura para idade
≥ Percentil 0,1 ^o e < 3 ^o	≥ Escore-z -3 e < Escore-z -2	Baixa Estatura para a idade
≥ Percentil 3 ^o	≥ Escore-z -2	Estatura Adequada para a idade

Fonte: WHO, 2006

Tabela 6 – Peso-para-idade (P/I) - para crianças de 5 a 10 anos de idade

Valores Críticos		Diagnóstico Nutricional
< Percentil 0,1 ^o	< Escore-z -3	Muito baixo peso para a idade
≥ Percentil 0,1 ^o e < 3 ^o	≥ Escore-z -3 e < Escore-z -2	Baixo peso para a idade
≥ Percentil 3 ^o e ≤ 97 ^o	≥ Escore-z -2 e ≤ Escore-z +2	Peso adequado para idade
> Percentil 97 ^o	> Escore-z +2	Peso elevado para a idade

Fonte: WHO, 2006

Tabela 7 - IMC para a idade (IMC/I) para crianças de 5 a 10 anos de idade

Valores Críticos		Diagnóstico Nutricional
< Percentil 0,1 ^o	< Escore-z -3	Magreza Acentuada
≥ Percentil 0,1 ^o e < 3 ^o	≥ Escore-z -3 e < Escore-z -2	Magreza
≥ Percentil 3 ^o e ≤ 85 ^o	≥ Escore-z -2 e ≤ Escore-z + 1	Eutrofia
> Percentil 85 ^o ≤ 97 ^o	≥ Escore-z +1 e ≤ Escore-z +2	Sobrepeso
> Percentil 97 ^o e ≤ 99,9 ^o	≥ Escore-z +2 e ≤ Escore-z +3	Obesidade
> Percentil 99,9 ^o	> Escore-z +3	Obesidade grave

Fonte: WHO, 2007

Tabela 8 - Estatura para - idade (E/I) - adolescentes de 10 a 15 anos de idade

Valores Críticos		Diagnóstico Nutricional
< Percentil 0,1 ^o	< Escore-z -3	Muita baixa estatura para idade
≥ Percentil 0,1 ^o e < 3 ^o	≥ Escore-z -3 e < -2	Baixa Estatura para a idade
≥ Percentil 3 ^o	≥ Escore-z -2	Estatura Adequada para a idade

Fonte: WHO, 2007

Tabela 9 - IMC para a idade (IMC/I) para adolescentes de 10 a 15 anos de idade

Valores Críticos		Diagnóstico Nutricional
< Percentil 0,1 ^o	< Escore-z -3	Magreza Acentuada
≥ Percentil 0,1 ^o e < 3 ^o	≥ Escore-z -3 e < -2	Magreza
≥ Percentil 3 ^o e ≤ 85 ^o	≥ Escore-z -2 e ≤ Escore-z + 1	Eutrofia
> Percentil 85 ^o ≤ 97 ^o	≥ Escore-z +1 e ≤ Escore-z +2	Sobrepeso
> Percentil 97 ^o e ≤ 99,9 ^o	≥ Escore-z +2 e ≤ Escore-z +3	Obesidade
> Percentil 99,9 ^o	> Escore-z +3	Obesidade grave

Fonte: WHO, 2007

ANEXO C - Fórmulas para cálculo da circunferência muscular do braço pela área muscular do braço

Cálculo da circunferência muscular do braço (CMB)
$CMB (cm) = CB (cm) - (DCT (mm) \times \pi)$
Estimativa da área muscular do braço
$AMB = CB - \frac{(DCT \times 3,1416)^2}{4 \times 3,1416}$
Estimativa da estimativa da área gordurosa do braço
$AGB = \frac{CB \times (DCT/10)^2}{2} - \frac{0,314 \times DCT/10}{4}$

Fonte: FRISANCHO, 1988

ANEXO D - Equações para o cálculo da densidade corporal e percentual de gordura corporal

DENSIDADE CORPORAL (D)
Meninos e meninas de 0 a 1,99 anos $D = \{1.1235 + (0.0016 [\text{ID em meses}]^{0.5}) - 0.0719 \cdot \log (\Sigma 4 \text{ dobras})\}$
Meninos de 2 a 18 anos $D = (1.1315 + \{0.0018[\text{ID em anos} - 2]\}) - (\{0.0719 - (0.0006 [\text{ID em anos} - 2]\}) - \log (\Sigma 4 \text{ dobras}))$
Meninas de 2 a 10 anos $D = (1.1315 + \{0.0004 [\text{ID em anos} - 2]\}) - (\{0.0719 - (0.0003[\text{ID em anos} - 2]\}) - \log (\Sigma 4 \text{ dobras}))$
Meninas de 2 a 18 anos $D = (1.1315 + \{0.0018[\text{ID em anos} - 2]\}) - (\{0.0719 - 0.0006 [\text{ID em anos} - 2]\}) - \log (\Sigma 4 \text{ dobras})$
Meninas de 11 a 18 anos $D = (1.1350 + \{0.0031[\text{ID em anos} - 10]\}) - (\{0.0719 - 0.0003 [\text{ID em anos} - 2]\}) - \log (\Sigma 4 \text{ dobras})$
PERCENTUAL DE GORDURA CORPORAL (%G)
Meninos de 0 a 1,99 anos $\%G = \{[585 - 4,7 [\text{ID em meses}]^{0.5}] / D - \{550 - 5,1[\text{ID em meses}]^{0.5}\}\}$
Meninos de 2 a 18 anos $\%G = (\{562 - 4,2 [\text{ID em anos} - 2]\} / D) - \{525 - 4,7[\text{ID em anos} - 2]\}$
Meninos de 0 a 1,99 anos $\%G = (\{562 - 4,7 [\text{ID em meses}]^{0.5}\} / D) - \{525 - 5,1[\text{ID em meses}]^{0.5}\}$
Meninas de 2 a 18 anos $\%G = (\{553 - 4,2 [\text{ID em anos} - 2]\} / D) - \{514 - 4,7[\text{ID em anos} - 2]\}$

D= densidade corporal; ID = idade; Σ 4 dobras = somatório das dobras cutâneas bicipital, tricípital, subescapular e supra-íliaca

Fonte: WESTSRATE; DEURENBERG, 1988

ANEXO E - Escore de Shwachman – Kulczycky

Gradação	Pontos	Atividade Geral	Exame Físico	Estado Nutricional	Achados Radiológicos
Excelente (86-100)	25	Atividade íntegra. Brinca, joga bola, vai à escola regularmente, etc.	Normal, não tosse. FC e FR normais. Pulmões livres, boa postura.	Mantém peso e altura acima do perc. 25. Fezes bem formadas, boa musculatura e tônus.	Campos pulmonares limpos.
Bom (71-85)	20	Irritabilidade e cansaço no fim do dia. Boa frequência na escola.	FC e FR normais em repouso. Tosse rara, pulmões livres. Pouco enfisema.	Peso e altura entre perc. 15 e 20. Fezes discretamente alteradas	Pequena acentuação da trama vasobrônquica, enfisema discreto.
Médio (56-70)	15	Necessita repousar durante o dia, cansaço fácil após exercícios, diminui frequência na escola.	Tosse ocasional, à vezes de manhã. FR levemente aumentada. Médio enfisema. Discreto baqueteamento nos dedos.	Peso e altura acima do 3º percentil. Fezes anormais, pouco formadas distensão abdominal, hipotrofia muscular.	Enfisema de média intensidade, aumento da trama vasobrônquica
Moderado (41-55)	10	Dispnéia após pequenas caminhadas, repouso em grande parte	Tosse freqüente e produtiva, retração torácica. Enfisema moderado, pode ter deformidade no tórax. Baqueteamento 2- 3+.	Peso e altura abaixo do 3ºpercentill. Fezes anormais, volumosa diminuição da massa muscular.	Moderado enfisema, áreas de atelectasia. Áreas de infecção discreta, bronquiectasias
Grave (≤ 40)		Ortopnéia. Confinado ao leito.	Tosse intensa. Períodos de taquipnéia e taquicardia e extensas alterações pulmonares. Falência cardíaca direita. Baqueteamento 3-4+.	Desnutrição intensa Distensão abdominal Prolapso retal	Extensas alterações, fenômenos obstrutivos. Infecção, atelectasia e bronquiectasia

Fonte: SHWACHMAN; KULCZYCKI, 1958