

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS - FEA**

DANIELA MIOTTO BERNARDI

**“ASPECTOS NUTRICIONAIS E BIOQUÍMICOS DA FIBROSE CÍSTICA EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS: SUPLEMENTAÇÃO COM UM CONCENTRADO
PROTÉICO DO SORO DO LEITE BOVINO ENRIQUECIDO COM TGF- β E
LACTOFERRINA”**

**Campinas
2010**

DANIELA MIOTTO BERNARDI

**“ASPECTOS NUTRICIONAIS E BIOQUÍMICOS DA FIBROSE CÍSTICA EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS: SUPLEMENTAÇÃO COM UM CONCENTRADO
PROTÉICO DO SORO DO LEITE BOVINO ENRIQUECIDO COM TGF- β E
LACTOFERRINA ”**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri

Co-orientador: Antônio Fernando Ribeiro

Campinas

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B456a Bernardi, Daniela Miotto
Aspectos nutricionais e bioquímicos da fibrose cística em pacientes pediátricos: suplementação com um concentrado protéico do soro do leite bovino enriquecido com TGF- β e lactoferrina / Daniela Miotto Bernardi . -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri
Co-orientador: Antônio Fernando Ribeiro
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Concentrado protéico de soro de leite. 2. Fibrose cística. 3. Suplementação. 4. Inflamação. 5. Estado nutricional. I. Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Nutritional and biochemical aspects of cystic fibrosis in pediatric patients: supplementation with whey protein concentrate enriched with TGF- β and lactoferrin

Palavras-chave em inglês (Keywords): Whey protein concentrate, Cystic fibrosis, Supplementation, Inflammation, Nutritional status

Área de Concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Valdemiro Carlos Sgarbieri

Mário Roberto Maróstica Junior

Maria Marluce dos Santos Vilela

Data da Defesa: 16/08/2010

Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em 16/08/2010 por **Daniela Miotto Bernardi** aprovada pela comissão julgadora em 16/08/2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Orientador)

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior
(Membro)

Prof. Dra. Yara Maria Franco Moreno
(Membro)

Prof. Dr. Gabriel Hessel
(Membro)

Prof. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela
(Membro)

Dedico aos meus queridos pais Gilso e Anelita, que sempre me amaram, apoiaram e se dedicaram incondicionalmente para que eu concretizasse esta etapa.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter permitido que este trabalho não fosse apenas uma dissertação, mas um meio para eu me tornar uma pessoa melhor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, por compartilhar a sabedoria e experiência, pela confiança, oportunidade e amizade.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Antônio Fernando Ribeiro, pelo incentivo, amizade e por ter sido um grande exemplo de respeito, atenção e cuidado para com os pacientes.

Ao Centro de investigação em pediatria – CIPED, Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo apoio e por toda estrutura oferecida para a realização do trabalho.

À Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, coordenadora do Laboratório de Imunologia do CIPED, por todo apoio, confiança e valoroso auxílio ao longo deste trabalho.

Ao Ambulatório de Fibrose Cística e a todos os seus profissionais, por toda a confiança depositada nesta pesquisa.

Às crianças e seus responsáveis por transformarem um desejo em realidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por conceder minha bolsa de mestrado.

À minha querida amiga Taís Nitsch Mazzola, por me ensinar tanto, por toda gentileza, carinho, amizade e compreensão. Por estar ao meu lado sempre, mesmo nos momentos mais difíceis.

À grande amiga Fabiane La Flor Ziegler, por todo companheirismo, amizade, ensinamentos e generosidade. Palavras não traduzem a imensa gratidão.

AGRADECIMENTOS

À minha eterna professora Janesca Alban Roman, pelo grande incentivo e amizade.

Ao meu pai Gilso, minha mãe Anelita e irmãos Gabriela e Gilso Júnior por todo incentivo, apoio e amor.

Ao meu noivo André, por todo amor, carinho, paciência, compreensão, espera e ajuda.

À Juliana Menegotto, minha amiga e companheira de casa e de cozinha, pela amizade e por sempre estar pronta a ouvir e me defender.

À minha amiga Elisa Bernardes pela amizade e importante ajuda no início do trabalho.

À querida Vanessa Oya, pela ajuda e companheirismo especialmente nos dias de ELISA.

À enfermeira Silvana por todas as coletas e pelo empenho em ajudar.

Às enfermeiras do Ambulatório de Pediatria, pela ajuda e disponibilidade.

À todos os professores e professoras que de alguma forma contribuíram para a realização da pesquisa.

Aos amigos do CIPED e da FEA.

Aos colegas de Laboratório.

Às técnicas de laboratório e secretárias.

Muito obrigada!

“Faca na bota”

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	19
LISTA DE TABELAS	25
LISTA DE FIGURAS	29
RESUMO	39
ABSTRACT	43
1 INTRODUÇÃO	47
2 REVISÃO DE LITERATURA	51
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS E IMUNONUTRIÇÃO.....	53
2.2 PROTEÍNAS DO LEITE.....	54
2.2.1 Efeitos Funcionais Fisiológicos das Proteínas e Peptídeos do Soro de Leite Bovino	56
2.3 FIBROSE CÍSTICA.....	61
2.3.1 Sintomas gastrointestinais	64
2.3.2 Desordens endócrinas	65
2.3.3 Doença Pulmonar	66
2.3.4 Nutrição	74
2.3.5 Pilares do tratamento	76
3 OBJETIVOS	81
3.1 OBJETIVO GERAL.....	83
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	83
4 MÉTODOS	85
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	87
4.2 POPULAÇÃO.....	87
4.2.1 Escore clínico	89
4.3 SUPLEMENTOS PROTÉICOS.....	89
4.4 SUPLEMENTAÇÃO.....	90
4.5 AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA.....	91
4.5.1 Coleta de Sangue	91
4.5.2 Hemograma	91
4.5.3 Glutaciona Eritrocitária	92

4.5.4 Liberação de Radicais Intermediários do Oxigênio por Granulócitos	92
4.5.5 Produção de Citocinas em sobrenadante de cultura	95
4.5.6 Concentração de Fator-β2 de Transformação de Crescimento (TGF-β) no soro	96
4.5.7 Imunoglobulinas séricas	97
4.5.8 IgA na saliva	97
4.6 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL	97
4.6.1 Antropometria	97
4.6.2 Parâmetros bioquímicos: Albumina e pré-albumina	100
4.6.3 Avaliação da ingestão alimentar	100
4.7 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	101
4.7.1 Cultura Rotina Diagnóstico no escarro	101
4.8 ASPECTOS ÉTICOS	102
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	102
5 RESULTADOS	105
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUPLEMENTO	107
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES	108
5.3 AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA	109
5.3.1 Hemograma	109
5.3.2 Glutaciona eritrocitária	113
5.3.3 Liberação de Radicais Intermediários do Oxigênio por Granulócitos	115
5.3.4 Produção de Citocinas em sobrenadante de cultura	117
5.3.5 Concentração de Fator-β2 de Transformação de Crescimento (TGF-β2) em soro	124
5.3.6 Imunoglobulinas séricas	125
5.3.7 IgA na saliva	129
5.4 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL	130
5.4.1 Antropometria	130
5.4.2 Parâmetros bioquímicos: Albumina e pré-albumina	133
5.4.3 Avaliação da ingestão alimentar	135
5.5 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	141
5.5.1 Cultura Rotina Diagnóstico no Escarro	141

6 DISCUSSÃO	143
7 CONCLUSÃO	161
8 REFERÊNCIAS	165
9 APÊNDICES	189
10 ANEXOS	197



LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACHOC: ágar chocolate

AMAN: ágar manitol

AMC: ágar MacConkey

AMP-c: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

AP-1: proteína ativadora-1, do inglês: *activator protein-1*

AS: ágar sangue

ATP: adenosina trifosfato

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin

BCSA: Agar seletivo para *B. cepacia*, do inglês: *B. cepacia selective agar*

BSA: albumina bovina sérica, do inglês: *bovine serum albumin*;

Ca: cálcio

CB: circunferência de braço

CFRD: diabetes relacionada à fibrose cística

CFTR: Regulador da condutância Transmembrânica da Fibrose Cística, do inglês: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

CHO: carboidrato

CMB: circunferência muscular de braço

CMSP: células mononucleares de sangue periférico

DHR 123: dihidrorhodamina 123

DNA: ácido desoxirribonucléico, do inglês: *desoxirribonucleic acid*

DO1: densidade óptica da amostra antes da adição do DTNB.

DO2: densidade óptica da amostra após a adição do DTNB.

DRI: Ingestão Diária Recomendada, do inglês: *Dietary Reference Intakes*

DTNB: 5,5'-dithiobis (2-ácido nitrobenzóico)

E/I: estatura/idade

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico, do inglês: *Epidermal growth factor*

ELISA: teste imunoenzimático, do inglês: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FBGF: Fator de crescimento de Fibroblastos, do inglês: *fibroblast growth factor*

FC: fibrose cística

Fe: ferro

GMP: glicomacropéptido

GSH: glutationa reduzida

GSSG: glutationa oxidada

HCT: hematócrito

HGB: concentração de hemoglobina

IFN- γ : Interferon gama

IgA: imunoglobulina A

IgE: imunoglobulina E

IGF-1: fator do Crescimento do Tipo Insulina 1

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

I-kB: inibidor da ativação de NF-kB

IL-10: interleucina 10

IL-1RA: antagonista do receptor de interleucina-1, do inglês: *interleukin-1 receptor antagonist*

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

IMC/I: índice de massa corporal /idade

IMC: índice de massa corporal

IP: Insuficiência pancreática

LINF: linfócitos

LIP: lipídio

MCH: volume corpuscular médio de hemoglobina, do inglês: *Mean Corpuscular Hemoglobin*

MCHC: concentração corpuscular média de hemoglobina, do inglês: *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*

MCV: volume corpuscular médio, do inglês: *Mean Corpuscular Volume*.

MO: microorganismo

MONO: monócitos

NED: necessidades energéticas diárias

NEU: neutrófilos

NF-kB: fator Nuclear-kapa B, do inglês: Nuclear factor-kB

NK: natural killer

PA: *Pseudomonas aeruginosa*

PBS: Tampão fosfato-salino, do inglês: *phosphate-buffered saline*

PCT: prega cutânea triciptal

PHA: fitohemaglutinina, do inglês: *Phytohaemagglutinin*

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato, do inglês: *phorbol 12 myristate 13 acetate*

PTN: proteína

RBC: eritrócitos, do inglês: *red blood cells*

rhDNase: proteína recombinante humana desoxirribonuclease, do inglês: *Recombinant human DNase*

ROS: espécies reativas de oxigênio, do inglês: *reactive oxygen species*

Se: selênio

SOID: síndrome da obstrução intestinal distal

T0: tempo zero (início)

T1: tempo um (depois de dois meses)

T2: tempo dois (ao término do quarto mês)

TCL: triacilgliceróis de cadeia longa

TCM: triacilgliceróis de cadeia média

TGF- β : Fator-beta de Transformação de Crescimento, do inglês: *Transforming growth factor beta*

T_H: T auxiliaries, do inglês: *T helper*

TLR: receptore toll-like, do inglês: *toll-like receptor*

TMB: tetrametil-benzidina

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, do inglês: *Tumor necrosis factor alfa*

Vit A: vitamina A

Vit C: vitamina C

Vit D: vitamina D

Vit E: vitamina E

WBC: leucócitos, do inglês: *White blood cells*;

WHO: Organização Mundial da Saúde, do inglês: *World Health Organization*

WPC: concentrado protéico do soro do leite bovino, do inglês: *whey protein concentrate*

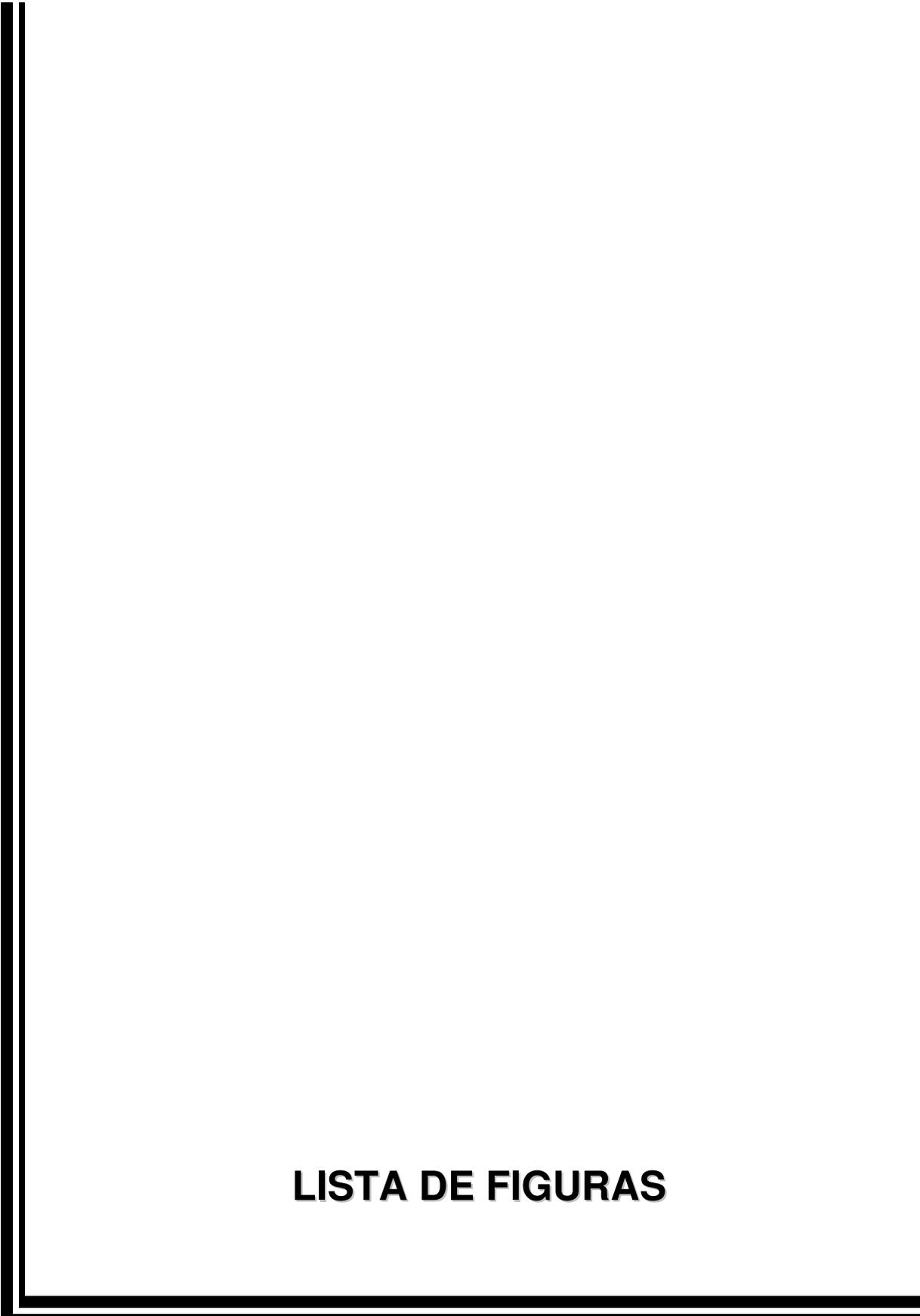
WPC-TGF β : concentrado protéico do soro do leite enriquecido com TGF β e lactoferrina

Zn: zinco

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais proteínas do soro do leite e suas características.....	57
Tabela 2: Recomendações de proteínas (g/dia) estabelecida pela <i>Dietary Reference Intake</i> (DRI, 2002) de acordo com as faixas etárias.....	90
Tabela 3: Pontos de corte, em escore-Z, para estatura para idade (E/I) de acordo com <i>World Health Organization</i> (WHO, 2006 e 2007).....	99
Tabela 4: Pontos de corte, em escore-Z, para índice de massa corporal para idade (IMC/I) para crianças menores 5 anos, de acordo com <i>World Health Organization</i> (WHO, 2006).....	99
Tabela 5: Pontos de corte, em escore-Z, para índice de massa corporal para idade (IMC/I) para crianças maiores de 5 anos, de acordo com <i>World Health Organization</i> (WHO, 2007).....	99
Tabela 6: Pontos de corte, em percentil, para circunferência de braço (CB) e para circunferência muscular de braço (CMB), segundo Frisancho, 1990.....	100
Tabela 7: Composição centesimal da caseína utilizada como placebo e do Concentrado protéico de soro de leite-TGF β (WPC-TGF β), suplemento teste	107
Tabela 8: Aminograma das fontes protéicas caseína, utilizada como placebo e concentrado protéico de soro de leite-TGF β (WPC-TGF β), suplemento teste	107
Tabela 9: Caracterização dos pacientes antes de iniciarem suplementação....	108
Tabela 10: Glóbulos brancos nos pacientes com FC e no grupo de indivíduos saudáveis	110
Tabela 11: Eritrócitos nos pacientes com FC e no grupo de indivíduos saudáveis	111
Tabela 12: Eritrócitos nos grupos placebo e WPC-TGF β em relação ao tempo (T0, T1, T2)	112

Tabela 13: Glóbulos brancos nos grupos placebo e WPC-TGF β em relação ao tempo (T0, T1, T2)	113
Tabela 14: Classificação nutricional da circunferência muscular de braço (CMB) dos pacientes ao longo do estudo	132
Tabela 15: Classificação nutricional da circunferência de braço (CB) dos pacientes durante o estudo.....	132
Tabela 16: Percentual (%) de adequação de ingestão energética relação ao Intervalo de adequação (120 a 150%) proposto pelo Consenso Europeu de Fibrose Cística, 2002.....	137
Tabela 17: Percentual (%) de adequação de ingestão alimentar de vitamina A em relação à <i>Dietary Reference Intake</i> (DRI, 2002) e ao Intervalo de adequação proposto pelo Consenso Europeu de Fibrose cística, 2002.....	138
Tabela 18: Percentual (%) de adequação de ingestão alimentar de vitamina E em relação à <i>Dietary Reference Intake</i> (DRI, 2000) e ao Intervalo de adequação proposto pelo Consenso Europeu de Fibrose cística, 2002.....	138
Tabela 19: Percentual (%) de adequação de ingestão alimentar de vitamina D em relação à <i>Dietary Reference Intake</i> (DRI, 1997) e ao Intervalo de adequação proposto pelo Consenso Europeu de Fibrose cística, 2002.....	139
Tabela 20: Percentual (%) de adequação de ingestão alimentar de Ca, Fe, Fibra em relação às <i>Dietary References Intake</i> (DRI`s 1997 e 2002).....	140
Tabela 21: Percentual (%) de adequação de ingestão alimentar de VitC, Se, Zn em relação às <i>Dietary References Intake</i> (DRI`s 2000 e 2002)...	140
Tabela 22: Cultura rotina diagnóstico (CRD) no escarro dos pacientes com fibrose cística, em relação ao tempo e aos suplementos.....	142



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Propriedades fisiológico-funcionais das proteínas do leite. Figura adaptada de Pacheco; Antunes; Sgarbieri, 2008	56
Figura 2: Classes das mutações na <i>cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR)</i> . Figura extraída de Ratjen, 2009	62
Figura 3: Relação entre o defeito na <i>cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR)</i> e a resposta inflamatória na Fibrose Cística.....	73
Figura 4: Dinâmica da desnutrição na Fibrose Cística. Figura adaptada Milla, 2007	76
Figura 5: Análise, por citometria de fluxo, da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos, onde 1 é o branco, 2 é a produção basal de ROS (sem estímulo) e 3 é a amostra estimulada, com o máximo de produção de ROS suportado pela célula. A é o <i>gate</i> para a separação de granulócitos dos demais tipos celulares, B é a porção de células não fuorescentes, C é a porção de células fuorescentes e D representa a mediana de fluorescência	94
Figura 6: Concentração de Glutathione nos eritrócitos (mg/dL) de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística	114
Figura 7: Concentração de Glutathione nos eritrócitos (mg/dL) de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplementos de caseína (▲) e WPC-TGFβ2 (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística	114
Figura 8: Percentual de estimulação basal para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p > 0,05$ sem diferença estatística	115

Figura 9: Capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística116

Figura 10: Percentual de estimulação basal para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos em pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com caseína (▲) e WPC-TGFβ2 (○). Diferença estatística entre os tempos do WPC-TGFβ2 (**: $p < 0,01$) pelo teste de Friedman. Pelo teste de comparações múltiplas diferença entre T0-T1, T1-T2, T0-T2..... 116

Figura 11: Capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos em pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplementos de caseína (▲) e WPC-TGFβ2 (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística 117

Figura 12: Concentração de TNF-α (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). Pelo teste de Mann-Whitney, diferença estatística para a cultura não estimulada (***: $p < 0,001$) e diferença para a estimulada por BCG (**: $p < 0,01$). Para a condição PHA, $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística..... 118

Figura 13: Concentração de INF-γ (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). Pelo teste de Mann-Whitney, diferença estatística para a produção espontânea (*: $p < 0,05$) , para as demais condições sem diferença estatística..... 118

Figura 14: Concentração de IL-8 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou

fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística..... 119

Figura 15: Concentração de IL-6 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). Pelo teste de Mann-Whitney, diferença estatística, para as condições: espontânea (***: $p < 0,001$) e PHA (**: $p < 0,01$), para BCG $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística..... 119

Figura 16: Concentração de IL-10 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). Pelo teste de Mann-Whitney diferença estatística apenas para a condição espontânea (***: $p < 0,001$). Sem diferença estatística ($p > 0,05$), para BCG e PHA..... 120

Figura 17: Concentração de TNF- α (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGF β (○). Diferença (*) entre os tempos do WPC-TGF β na PHA por teste de Friedman ($p < 0,05$)..... 121

Figura 18: Concentração de INF- γ (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGF β (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística 121

Figura 19: Concentração de IL-8 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística 122

Figura 20: Concentração de IL-6 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística 122

Figura 21: Concentração de IL-10 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). Diferença estatística (‡) entre os suplementos no T1 da condição PHA pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$)..... 123

Figura 22: Concentração de TGF-β2 (pg/mL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p < 0,05$, portanto com diferença estatística (*), pelo teste de Mann-Whitney..... 124

Figura 23: Concentração de TGF-β2 (pg/mL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). Diferença estatística (‡) entre os suplementos no T0 por teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$)..... 124

Figura 24: Concentração de IgA (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p < 0,05$, portanto com diferença estatística (*)..... 125

- Figura 25:** Concentração de IgG (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p>0,05$, portanto sem diferença estatística 126
- Figura 26:** Concentração de IgM (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $P<0,05$, portanto com diferença estatística (**), segundo teste de Mann-Whitey 126
- Figura 27:** Concentração de IgE (UL/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p>0,05$, portanto sem diferença estatística 127
- Figura 28:** Concentração de IgA (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGF β (○). $p>0,05$, portanto sem diferença estatística 127
- Figura 29:** Concentração de IgG (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGF β 2 (○). $p>0,05$, portanto sem diferença estatística 128
- Figura 30:** Concentração de IgM (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGF β 2 (○). $p>0,05$, portanto sem diferença estatística 128
- Figura 31:** Concentração de IgE (UL/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGF β 2 (○). $p>0,05$, portanto sem diferença estatística 129
- Figura 32:** Concentração de IgA (mg/dL) na saliva de pacientes fibrocísticos (■) e crianças saudáveis (+). $p>0,05$ sem diferença estatística..... 129

- Figura 33:** Concentração de IgA (mg/dL) na saliva de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ2 (○). $p>0,05$, portanto sem diferença estatística 130
- Figura 34:** Escore-Z do índice antropométrico índice de massa corporal para Idade (IMC/I) de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). $p>0,05$ 130
- Figura 35:** Escore-Z do índice antropométrico estatura para idade (E/I) de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). Sem diferença estatística 131
- Figura 36:** Concentração de albumina (g/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). Diferença estatística (***) entre os grupos, por teste de Mann-Whitney ($p<0,001$)..... 133
- Figura 37:** Concentração de pré-albumina (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p>0,05$ 133
- Figura 38:** Concentração de albumina (g/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) de suplementação alimentar com caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). Diferença estatística (**) entre os tempos do WPC-TGFβ ($p<0,01$) por teste de Mann-Whitney e diferença estatística (**) entre os suplementos no T1 ($p<0,01$) pelo teste de Friedman..... 134
- Figura 39:** Concentração de pré-albumina (g/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). Sem diferença estatística..... 135

- Figura 40:** % Distribuição dos macronutrientes na dieta dos pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1), no final do quarto mês (T2), no intervalo entre o início e o meio (T0-T1) e no intervalo entre o meio e o fim (T1-T2) da suplementação alimentar com caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). Os dados foram obtidos a partir do Recordatório Alimentar de 24h ^(a) e do Registro alimentar de 3 dias ^(b). Diferença estatística (*) no percentual de distribuição da proteína entre os suplementos no T0 ($p < 0,05$). Nos demais não houve diferença estatística..... 136
- Figura 41:** Representação esquemática da inflamação na fibrose cística associada aos resultados obtidos no trabalho. Sinalização dos locais onde o suplemento poderia ter atuado para modular positivamente a reação.....155

RESUMO

A fibrose cística (FC) é caracterizada por intenso processo inflamatório, doença pulmonar obstrutiva, infecção das vias aéreas e má digestão/ má absorção de nutrientes e micronutrientes, sendo a nutrição determinante no prognóstico do paciente. **Objetivo:** Avaliar os efeitos imunológicos e nutricionais da suplementação de um concentrado protéico do soro do leite bovino (whey protein concentrate - WPC), enriquecido com TGF- β e lactoferrina, em pacientes pediátricos com fibrose cística, bem como realizar perfil imunológico e nutricional destes pacientes. **Métodos:** O ensaio clínico de intervenção nutricional foi prospectivo, randomizado, duplo cego com placebo e teve duração de 4 meses. As crianças que participaram eram atendidas no Ambulatório Pediátrico de FC, do Hospital de Clínicas da UNICAMP, na faixa etária entre 3 e 12 anos e escore de Shwachman entre moderado e bom. Quarenta e cinco crianças iniciaram a suplementação e apenas 28 finalizaram, sendo 15 no grupo WPC-TGF β e 13 no grupo caseína (placebo). Foram incluídas 17 crianças saudáveis como grupo controle para as análises bioquímicas e imunológicas. Os suplementos (placebo e teste) foram submetidos às análises centesimais e microbiológicas. A avaliação dos pacientes ao longo da suplementação foi realizada em três tempos (T0=antes da suplementação, T1=depois de 2 meses e T2= no final do quarto mês). Determinaram-se os níveis de glutathione nos eritrócitos, a produção de radicais reativos de oxigênio (ROS) e de citocinas em sobrenadante de cultura de sangue periférico (TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-6, IL-10), concentração de TGF- β 2 no soro, imunoglobulinas séricas (IgA, IgG, IgM e IgE) e IgA na saliva, cultura do escarro, níveis de albumina e pré-albumina, avaliação antropométrica e de ingestão alimentar. Em relação à análise estatística, os dados paramétricos foram analisados com o teste-T e ANOVA para amostras pareadas e os dados não paramétricos foram testados por Mann-Whitney e Friedman. O nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** Em relação aos sistemas antioxidante e oxidante em sangue periférico, verificou-se que não houve diferença significativa entre fibrocísticos e indivíduos saudáveis. A produção espontânea de TNF- α , IL-6, IL-10 estava aumentada na FC assim como a produção de IL-6 em resposta à PHA, a concentração de TGF- β 2, IgA e IgM no soro e a concentração sanguínea de leucócitos. Por outro lado, os indivíduos

saudáveis tiveram maior produção de TNF- α em resposta ao estímulo pela BCG. Houve baixo índice de desnutrição nos participantes. A suplementação com WPC-TGF β não influenciou de forma significativa na concentração de GSH, imunoglobulinas, na infecção das vias aéreas e no estado nutricional. Em relação à GSH embora a mudança não tenha sido significativa, observou-se uma tendência de aumento gradual ao longo da suplementação. A suplementação também provocou um aumento significativo na produção basal de ROS pelos granulócitos, uma redução na produção de TNF- α em sobrenadante de cultura em resposta à PHA, além de reduzir momentaneamente (T1) a produção de IL-10 na presença de PHA. Observou-se atenuação da diferença estatística existente para TGF- β 2, antes da suplementação, nos dois grupos. Houve um aumento do número de eritrócitos e de hemoglobina, provavelmente pela ação da lactoferrina.

Conclusão: O presente trabalho mostrou que a criança clinicamente estável com FC consegue manter um balanço oxidante e antioxidante normal. As altas concentrações de TNF- α e de IL-6 demandaram uma maior produção de IL-10, que também pode ter sido a responsável pela resposta T_H1 eficiente para BCG, expresso pela produção normal de IFN- γ . A maior produção de IgA e IgM confirmam um sistema imune adaptativo normal frente ao estímulo freqüente da colonização bacteriana nesses indivíduos. Existem indícios nos resultados de que a suplementação à longo prazo em crianças ainda não colonizadas poderia ser mais eficiente, o que somente poderia ser elucidado por meio de novos estudos.



ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is characterized by an intense inflammatory process, pulmonary obstruction, airway infection and gastrointestinal symptoms resulting maldigestion/ malabsorption of nutrients, and as a consequence nutrition is a determinant on the patient's prognostic. The **aims** were to evaluate the effect of supplementation with a WPC enriched with TGF- β and lactoferrin, in pediatric patients with cystic fibrosis. **Methods:** The study was a randomized, double-blind, placebo controlled, prospective clinical trial of nutritional intervention with four months of duration. Children were recruited from the Pediatric Outpatient Unit, at UNICAMP Clinical Hospital, aged between 3 and 12 years and Shwachman score between moderate and good. The study group started with 45 children, nevertheless, it ended with 28 subjects: 15 of WPC-TGF β group and 13 of casein group (placebo). Seventeen healthy children were also used as a control group. The supplements (placebo and test) were submitted to centesimal and microbiological analysis. The supplementation was done during four months with three assessments (T0= before starting the supplementation, T1= with two months of supplementation and T2= at the end the 4th months of supplementation) with appraisal of: erythrocyte glutathione concentration, production of reactive oxygen species (ROS) by granulocytes, cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-6, IL-10) concentration in supernatants from cultures under spontaneous condition, PHA and Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-stimulated peripheral blood mononuclear cells, levels of serum TGF- β 2, immunoglobulins (IgA, IgG, IgM and IgE), albumin and prealbumin, salivary IgA, sputum culture, anthropometric measurements and food intake. For statistical analysis, the parametric data were analyzed with T-test and ANOVA and nonparametric data, with Mann-Whitney and Friedman tests. The level of significance was 5%. **Results:** There was no statistical difference between CF patients and healthy subjects in relation to oxidant and antioxidant system in peripheral blood. The spontaneous production of TNF- α , IL-6, and IL-10, production of IL-6 in response to PHA, TGF- β 2, IgA and IgM in serum and counting white blood cells was increased in CF patients. Furthermore, healthy individuals responded better to secretion of TNF- α in response to BCG stimulation. A low incidence of malnutrition was observed. Supplementation with WPC-TGF β did not have an influence on concentration of glutathione, immunoglobulins, infection of

airways and nutritional status. Regarding GSH although the change was not significant, there was a trend of gradual increase during the supplementation. Furthermore, increased basal stimulation of granulocytes for the production of ROS reduced the production of TNF- α in culture supernatants in response to PHA, slightly reduced the production of IL-10 (T1) in response to PHA and also attenuated the statistical difference existing for TGF- β 2, prior to supplementation, in both groups. The ability to increase the total number of erythrocytes and hemoglobin was attributed to lactoferrin present in the supplement. **Conclusion:** This study showed that clinically stable CF children could maintain a normal oxidant and antioxidant balance. The high concentrations of TNF- α and IL-6 require a higher production of IL-10, which may have also been responsible for the efficient TH1 response to BCG, expressed by IFN- γ . The higher production of IgA and IgM confirm a normal adaptive immune system against bacterial colonization in these patients. It is suggested that supplementation for longer period of children not yet colonized lead to better results than the ours obtained, however, only further study could elucidate such an hypothesis.

1 INTRODUÇÃO

A alimentação permite aos seres vivos transformar alimentos e nutrientes do meio exterior em constituintes de seu próprio corpo, porém, para isso é necessário uma dieta com alimentos adequados, variados e em quantidades suficientes. Atualmente, muito se comenta sobre alimentos funcionais, uma vez que possuem substâncias que vão além da capacidade de nutrir. Neste contexto, a dieta tem um papel cada vez mais importante na manutenção e promoção de saúde do indivíduo.

A ingestão de alimentos funcionais pode trazer inúmeros benefícios ao organismo e a literatura tem mostrado que vários tipos de dietas e suplementos podem modular inclusive funções do sistema imunológico, dessa forma, seus componentes bioativos têm sido propostos para constituir a base de produtos alimentares funcionais imunomoduladores.

O concentrado protéico do soro do leite bovino é um importante exemplo de alimento com componentes bioativos e com propriedades fisiológico-funcionais bem documentadas. Este produto lácteo possui atividades imunomoduladora, antimicrobiana, antiviral, anticâncer e antiúlcera, bem como benefícios no exercício físico e proteção cardiovascular. Além disso, o soro de leite possui algumas proteínas e fatores de crescimento com propriedades especiais, como a lactoferrina e o Fator- β de Transformação de Crescimento (TGF- β).

O enriquecimento da proteína de soro de leite com TGF- β e com lactoferrina pode potencializar ainda mais os efeitos imunomoduladores, anti-oxidantes e antimicrobianos do suplemento. Neste sentido, a fibrose cística é uma doença em que um suplemento com estas características, pode trazer benefícios.

A fibrose cística é caracterizada por intenso processo inflamatório, doença pulmonar obstrutiva, infecção das vias aéreas e má digestão/ má absorção de nutrientes e micronutrientes. É uma doença onde a nutrição é determinante no prognóstico do paciente.

Dessa forma, o presente trabalho buscou investigar os efeitos imunomoduladores de um concentrado protéico do soro de leite – enriquecido com TGF- β e lactoferrina – em pacientes pediátricos com fibrose cística.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS E IMUNONUTRIÇÃO

A ciência da nutrição tem importante papel na manutenção da saúde e tratamento de enfermidades (RAQIB & CRAVIOTO, 2009). Especialmente nos últimos vinte anos tem-se enfatizado a otimização e o balanço dietético, de forma a maximizar as funções fisiológicas, proporcionando o máximo de bem estar e saúde, diminuindo o risco de aparecimento de algumas doenças (ROBERFROID, 2002).

Para muitos autores a nutrição é o maior determinante de saúde em uma população. A ocorrência de doenças associadas ao estilo de vida e aos hábitos alimentares foram pontos determinantes para o desenvolvimento da ciência de alimentos funcionais (LAJOLO, 2002).

Os alimentos funcionais foram primeiramente descritos no Japão na década de 80 (ARAI, 2002) e hoje tomam conta do cenário mundial. Existem muitas definições para o termo, entretanto é consenso que alimentos funcionais possuem, além do caráter nutricional, substâncias em quantidades suficientes, potencialmente capazes de atuar nos processos metabólicos promovendo efeitos benéficos à saúde, bem como melhorando a qualidade e a expectativa de vida das pessoas (SGARBIERI & PACHECO, 1998).

Portanto, os alimentos e componentes funcionais são fatores “chave” no desenvolvimento e no futuro da ciência da nutrição, uma vez que resultam do conhecimento científico acumulado por décadas (ROBERFROID, 2002).

Para os chineses, medicina e nutrição são dependentes um do outro (ARAI, 2002) e desde muito cedo verificaram o quanto a nutrição poderia interferir nos diferentes órgãos e sistemas corporais. O conceito de que os alimentos podem afetar as funções fisiológicas pela interação e modulação de mecanismos moleculares revolucionou a área da nutrição (RAQIB & CRAVIOTO, 2009). Em 1959, surgiu a primeira publicação que documentava a inter-relação entre nutrição e infecção. Em 1968, a Organização Mundial da Saúde mostrou que a nutrição poderia ter um papel importante na imunidade mediada por células, secreção de imunoglobulinas, função das células T, sistema complemento, produção de citocinas, entre outros. Desde 1980, simpósios, conferências e cada vez mais

trabalhos vêm sendo feitos na área de nutrição, imunidade e infecção (SCRIMSHAW, 2002).

Estudos mostraram que alguns nutrientes, podem trazer vantagens e atuar na modulação do sistema imunológico, resposta inflamatória e vias metabólicas. O termo “imunonutrição” é usado para descrever esta inter-relação (LEVY, 1998; HEYS, *et al*, 2004). Muitos nutrientes podem atuar como imunomoduladores, entretanto os de maior destaque são: arginina, glutamina, resíduos de glutamil-cisteína, ácidos graxos, selênio, zinco, vitamina A, entre outros (GRIMBLE, 2005; LEVY, 1998; HEYS *et al*, 2004).

“A modulação do sistema imune através da ingestão de alimentos funcionais é uma estratégia atrativa e não invasiva de otimizar a imunidade e melhorar a saúde” (MORENO, 2007, 49p.).

2.2 PROTEÍNAS DO LEITE

Em 1838 o termo “proteína” foi utilizado pela primeira vez e desde então uma série de descobertas tem sido feitas mostrando cada vez mais a sua importância para o bom funcionamento das células, órgãos, tecidos e organismo como um todo. No passado acreditava-se que a função da proteína restringia-se à formação de tecidos, entretanto novos conceitos mostram que os aminoácidos e peptídeos, formados a partir da digestão natural de proteínas, são absorvidos e incorporados a vários tecidos e órgãos, podendo atuar também na modulação de funções em vários sistemas, contribuindo para a diminuição do risco de doenças crônicas, bem como aumentando a longevidade e qualidade de vida (PACHECO; ANTUNES; SGARBIERI, 2008).

Peptídeos bioativos tem sido definidos como fragmentos específicos de proteína que tem um impacto positivo nas funções corporais, podendo influenciar na saúde (KITTS & WEILER, 2005), entretanto, para isso é necessário que sejam resistentes à ação de proteínas digestivas (MULLALLY; MEISEL; FITZGERARD, 1997). Os aminoácidos que mostram uma atividade fisiológica especial são: arginina, glutamina, histidina, lisina, taurina, tirosina e triptofano (MARSHALL, 2004).

O leite bovino é o produto da secreção de suas glândulas mamárias. É componente comum na dieta de muitas pessoas em todos os períodos da vida. Possui alto valor nutritivo sendo composto por aproximadamente 5% de lactose, 3,2% de proteína, 4% de lipídios e 0,7% de sais minerais. É importante fonte de nutrientes essenciais e moléculas biologicamente ativas. (SGARBIERI, 1996; SÉVERIN & WENSHUI, 2005). Também, é uma importante fonte de proteína, sendo que as duas frações protéicas principais são as caseínas e as proteínas do soro do leite, que apresentam grande variedade de proteínas e peptídeos bioativos (PACHECO; ANTUNES; SGARBIERI, 2008).

Por décadas, a indústria de alimentos dispensou o soro do leite, muitas vezes descartando-o no meio ambiente, causando um sério problema ambiental (REGESTER *et al*, 1996; HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006). Entretanto, a partir da década de 70, começou-se estudar as propriedades fisiológico-funcionais das proteínas do leite e desde então a indústria vem desenvolvendo uma série de tecnologias para extrair, separar, concentrar e isolar essas proteínas (PACHECO; ANTUNES; SGARBIERI, 2008). Segundo Borges e colaboradores (2001), as caseínas podem ser separadas das proteínas do soro por três processos: a coagulação enzimática, precipitação ácida em pH isoelétrico e por meio da separação física por microfiltração. A utilização de cada processo será definida a partir de quais compostos bioativos serão priorizados (PACHECO; ANTUNES; SGARBIERI, 2008).

As principais proteínas do soro do leite são: β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas, lactoferrina e glicomacropéptídeos. A fração das caseínas é composta principalmente por: α -caseína, α_{S1} -caseína, β -caseína e k-caseína (SGARBIERI; ZIEGLER; CASTRO, 2009).

De uma forma geral, as propriedades funcionais das proteínas do leite, nos diversos sistemas, podem ser resumidas como ilustra a figura 1.

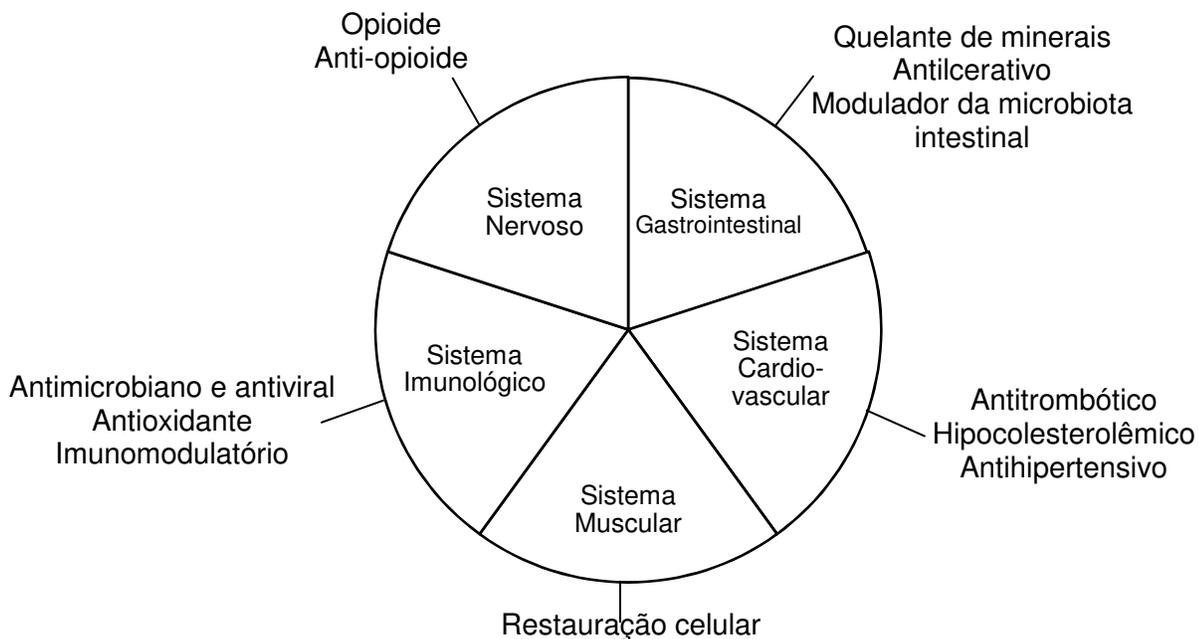


Figura 1: Propriedades fisiológico-funcionais das proteínas do leite. Figura adaptada de Pacheco; Antunes; Sgarbieri, 2008.

2.2.1 Efeitos Funcionais Fisiológicos das Proteínas e Peptídeos do Soro de Leite Bovino

As proteínas do soro compreendem aproximadamente 20% do total das proteínas do leite bovino e possuem diferentes tamanhos, peso molecular e função. Em relação às propriedades físico-químicas destas proteínas, sabe-se que não são coaguladas por ácido e são resistentes à ação da quimosina; são facilmente digeridas e rapidamente absorvidas pelo organismo onde estimulam a síntese de novas proteínas e devido a esta característica são denominadas “*fast metabolizing proteins*”; são também importantes fontes de aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 2004; McINTOSH *et al*, 1998, SÉVERIN & WENSHUI, 2005).

As principais propriedades funcionais das proteínas do soro são: regulação da função imune, atividades antimicrobiana e antiviral, fator de crescimento, atividade anticâncer e antiúlcera, benefícios no exercício físico, proteção cardiovascular, entre outros (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006; SGARBIERI, 2004; MARSHALL, 2004; HA & ZEMEL, 2003).

Na tabela 1 são apresentadas as principais proteínas e suas respectivas propriedades fisiológico/funcionais.

Tabela 1: Principais proteínas do soro do leite e suas características

Proteínas	MM (kDa)	Características
β -Lactoglobulina	18,3	Fonte de aminoácidos de cadeia ramificada – poupa glicogênio muscular durante o exercício; Liga-se a vitaminas lipossolúveis aumentando sua biodisponibilidade;
α -Lactoalbumina	14,1	Excelente fonte de aminoácidos de cadeia ramificada e triptofano; efeito <i>in vitro</i> sobre as funções de linfócitos B e T.
Imunoglobulinas	160 a 900	Modulação do sistema imune;
Lactoferrina	86,1	Antioxidante; Antibacteriana, antifúngica, antiviral; Promove crescimento de bactérias benéficas; Regula absorção e biodisponibilidade do ferro;
Lactoperoxidase	77	Inibe o crescimento de bactérias; cataliza reações como redução de peróxido de hidrogênio;
BSA*	66,2	Fonte de aminoácidos essenciais; liga-se à gorduras;
GMP**		Fonte de aminoácidos de cadeia ramificada; pobre em aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptofano e tirosina.

Fonte: Adaptado de Marschall, 2004. *BSA: albumina sérica bovina; **GMP: glicomacropéptideo

Atividade Imunomoduladora

Bounous e colaboradores foram um dos primeiros grupos de pesquisa a identificarem o poder imunoestimulante das proteínas do soro de leite bovino (BOUNOUS & KONGSHAVN, 1982; BOUNOUS; LETOURNEAU; KINGSHAVN, 1983) e posteriormente propuseram que este efeito devia-se à estrutura primária da proteína, à alta concentração de resíduos de glutamil-cistina e às proteínas isoladas e seus peptídeos tais como: imunoglobulinas, lactoferrina, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, glicomacropéptideo, soroalbumina e a fatores de crescimento presentes (BOUNOUS & GOLD, 1991). A propriedade antimicrobiana também está presente em algumas das proteínas citadas anteriormente.

As proteínas do soro de leite são uma excelente fonte de ácido glutâmico-cistina, que formam pontes dissulfeto, as quais não são hidrolisadas na digestão,

sendo absorvidas na forma peptídica de glutamil-cisteína, que é substrato ideal para a síntese de glutatona (SGARBIERI; ZIEGLER; CASTRO, 2009).

A glutatona é um tripeptídeo pleiotrópico encontrada em abundância em todas as células, sendo um componente celular do sistema antioxidante, uma vez que atua diretamente na eliminação e inativação de espécies reativas de oxigênio (ROS), (KELLY, 1999). A ação antioxidante da glutatona exerce um efeito positivo sobre a produção de citocinas inflamatórias, uma vez que o excesso de agentes oxidantes é um dos responsáveis pela ativação do NF- κ B (Fator Nuclear-kapa B) que atua na transcrição destas citocinas (TOWNSEND; KENNETH; TAPIERO, 2003). A glutatona também exerce importante função na estimulação de linfócitos para produzirem imunoglobulinas (SGARBIERI, 2004).

As imunoglobulinas constituem uma família de proteínas de elevado peso molecular que apresentam propriedades físicas, químicas e imunológicas diversas. São responsáveis pela imunidade passiva transmitida aos recém-nascidos. Além disso, são encontradas (IgG, IgA e IgM) no soro de leite bovino, as quais permanecem intactas após a digestão, podendo atuar ainda no sistema gastrointestinal por meio da neutralização de organismos patogênicos que tentam colonizar o intestino, bem como podem atuar sistemicamente na defesa contra microrganismos extracelulares e toxinas microbianas (MARSHALL, 2004; SGARBIERI, 2004). A produção de imunoglobulinas também pode ser influenciada pela presença de lactoferrina (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002).

A lactoferrina é uma glicoproteína multifuncional que tem sido extensivamente estudada nas últimas décadas. Representa cerca de 1 a 2 % da fração protéica do soro, sendo que a forma bovina é homologa à forma humana. (MARSHALL, 2004). É Um importante componente da imunidade inata (WAKABAYASHI; YAMAUCHI; TAKASE, 2006).

A lactoferrina possui atividade imunomoduladora e antioxidante. Além disso, também possui um amplo espectro antimicrobiano: bactérias gram-positivas, gram-negativas (*H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *B. cepacea*), vírus, fungos, leveduras e parasitas. Entre as formas de ação da lactoferrina para inibir o crescimento microbiano pode-se citar: seqüestro do ferro presente no meio; interação, dano e liberação da membrana de lipopolissacarídeo de gram-

negativas; ação proteolítica sobre alguns componentes protéicos microbianos (JENSSEN & HANCOCK 2009). Devido à alta capacidade de ligar-se ao ferro, além da atividade de antimicrobiana, tem sido proposto que a lactoferrina pode desempenhar importante papel na absorção de ferro (KAWAKAMI; HIRATSUKA; DOSAKO, 1988; PAESANO *et al.*, 2009; NAPPI *et al.*, 2009).

Baseado em estudos de administração oral da lactoferrina, observou-se que quando digerida (seus peptídeos) tem inicialmente uma ação no sistema imune associado à mucosa intestinal e posteriormente passa ter um efeito sistêmico, onde ocorre uma interação com moléculas alvo e células, levando à modulação da resposta imune (WAKABAYASHI; YAMAUCHI; TAKASE, 2006).

Os efeitos anti-inflamatórios da lactoferrina provém da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias; regulação das citocinas anti-inflamatórias; regulação da proliferação, diferenciação e ativação das células B e T; pode atuar no processo de fagocitose de neutrófilos; estímulo a produção de macrófagos peritonias e células *natural killer* no baço (WAKABAYASHI; YAMAUCHI; TAKASE, 2006).

A hidrólise da lactoferrina por pepsina libera a lactoferricina, um peptídeo com forte ação bactericida tanto para bactérias gram-negativas como gram-positivas, sendo que este efeito parece ser devido à perturbação da membrana celular (JENSSEN & HANCOCK 2009). A lactoferricina também demonstra uma ação apoptótica sobre células de leucemia humana (ROY *et al.*, 2002). Além disso, estudos de Miyauchi e colaboradores, demonstraram que o hidrolisado péptico de lactoferrina, contendo lactoferricina, aumentou a produção de IgM, IgG e IgA em culturas de esplenócitos de ratos e a produção de IgA pelas células da placa de Peyer (MIYAUCHI *et al.*, 1997).

A hidrólise enzimática também permitiu o isolamento e a identificação de peptídeos a partir de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, sugerindo que estas proteínas também possam exercer um efeito antibiótico no organismo após hidrólise (PELLEGRINI *et al.*, 1999; PELLEGRINI *et al.*, 2001). A β -lactoglobulina corresponde à aproximadamente 50% do conteúdo protéico do soro. Muito se conhece sobre a estrutura e a funcionalidade da β -lactoglobulina, porém pouco se sabe sobre seu papel fisiológico. Entretanto sabe-se que ela carrega pequenas

moléculas hidrofóbicas, como o retinol, podendo portanto, atuar na modulação da resposta linfática (MARCHALL, 2004). A α -lactoalbumina é a segunda proteína mais abundante no soro de leite e vem sendo demonstrado que possui um importante efeito na função de macrófagos e células B e T (RUSU *et al.*, 2009).

O GMP é encontrado apenas no soro doce, como produto da ação da enzima coagulante quimosina sobre a k-caseína (SGARBIERI, 2004). O GMP pode apresentar efeitos tanto imunossupressor como imunoestimulante. Em ratos ácido siálico-dependentes o GMP atuou como inibidor da proliferação de linfócitos (T e B), por outro lado atuou como fator estimulador de citocinas antiinflamatórias de monócitos (LI & MINE, 2004). Em estudos com linhagens de células humanas ácido siálico dependentes, o GMP atuou reforçando significativamente a proliferação e atividade fagocítica dos macrófagos (KRISSENSSEN, 2007).

Os fatores de crescimento presentes no soro de leite bovino estão cada vez sendo mais usados em produtos para a saúde, devido aos seus mais diversos efeitos e benefícios. Os fatores mais abundantes presentes no soro são: Fator do Crescimento do Tipo Insulina 1 (IGF-1); Fator- β de Transformação de Crescimento (TGF- β); alguns membros da família de Fatores de Crescimento Epidérmico (EGF) e Fator de crescimento de Fibroblastos (FBGF), (POULIOT & GAUTHIER, 2006).

O TGF- β 2 está presente em maior quantidade no leite, podendo variar entre 10-70ngmL⁻¹ o TGF- β 1 também está presente porém em baixas concentrações <5ngmL⁻¹. A família TGF- β tem inúmeras funções e dentre elas se destaca a atuação no sistema imunológico (POULIOT & GAUTHIER, 2006), onde, inibem respostas inflamatórias, por meio da inibição da proliferação e a função efetora de células T e macrófagos ativados; regulam a diferenciação de subconjuntos funcionalmente distintos de células T, podendo por exemplo bloquear o desenvolvimento dos subconjuntos T_H1 e T_H2; estimulam a produção de IgA e atuam na reparação tecidual depois que as reações imunológicas ou inflamatórias locais regridem (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008)

Portanto, o aumento da síntese de glutathione, a ação antimicrobiana e ação direta sobre as células do sistema imune são as principais propriedades imunomoduladoras das proteínas do soro de leite (SGARBIERI; ZIEGLER; CASTRO, 2009).

2.3 FIBROSE CÍSTICA

A fibrose cística (FC) é a mais comum das doenças mendelianas graves na infância, tem caráter autossômico recessivo e é mais freqüente em caucasianos (RATJEN, 2009; O`SULLIVAN & FREEDMAN, 2009; STRAUSBAUGH & DAVIS, 2007), a incidência nesta população pode variar entre 1/2000 a 1/5000 nascidos vivos (TEN KATE, 1977). No Brasil, sabe-se que cerca de 1/10000 nascidos vivos possuem a doença (RASKIN *et al.*, 1993). Nos Estados Unidos a média de vida desses pacientes é de 37 anos, já na Europa é de 50 anos (O`SULLIVAN & FREEDMAN, 2009).

Foi identificada primeiramente em 1938, pela patologista Andersen, que descreveu a doença como “fibrose cística do pâncreas” (ANDERSEN, 1938). Anos mais tarde a doença foi caracterizada por má absorção de gorduras e proteínas, falha de crescimento e doença pulmonar e devido a características da lâmina histológica foi denominada mucoviscidose (FARBER, 1944). Em 1953, verificou-se que pacientes com “fibrose cística do pâncreas” possuíam composição eletrolítica anormal no suor (DI SANT`AGNESE *et al.*, 1953). Somente na década de 80 é que o gene da FC foi descoberto (QUINTON, 1983; TSUI *et al.*, 1985; ROMMENS *et al.*, 1989; RIORDAN *et al.*, 1989; KEREM *et al.*, 1989).

O gene da FC, localizado no braço longo do cromossomo 7, codifica uma proteína com 1.480 resíduos de aminoácidos, denominada CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), (RIBEIRO; RIBEIRO; RIBEIRO, 2009). Esta proteína é expressa em grande parte das células epiteliais das vias aéreas, do trato gastrintestinal, glândulas sudoríparas e sistema genitourinário (DAVIS, 2006). A CFTR funciona como canal de cloro na membrana apical das células epiteliais, possuindo também outras importantes funções regulatórias como: regulação do canal epitelial de sódio e dos canais de ATP, regulação intracelular de vesículas de transporte, acidificação de organelas intracelulares, regulação do cálcio endógeno ativado, regulação do transporte de HCO^{3-} , de algumas proteínas e da glutathiona (O`SULLIVAN & FREEDMAN, 2009).

As mutações do gene podem levar à ausência ou mal funcionamento da CFTR, contribuindo para o desenvolvimento da FC. Mais de 1500 mutações foram

descritas, porém as conseqüências funcionais de muitas ainda não são bem conhecidas (RATJEN, 2009; O`SULLIVAN & FREEDMAN, 2009; RIBEIRO; RIBEIRO; RIBEIRO, 2002). Segundo Ratjen (2009), as mutações no gene CFTR podem ser agrupadas em 6 diferentes classes, baseadas nas conseqüências funcionais (Figura 2).

- **Classe I:** deficiência na síntese;
- **Classe II:** processamento inadequado no Complexo de Golgi;
- **Classe III:** regulação deficiente, ou seja, CFTR não é ativada pelo ATP ou AMP-c;
- **Classe IV:** condutância anormal;
- **Classe V:** defeito parcial na síntese;
- **Classe VI:** degradação acelerada;

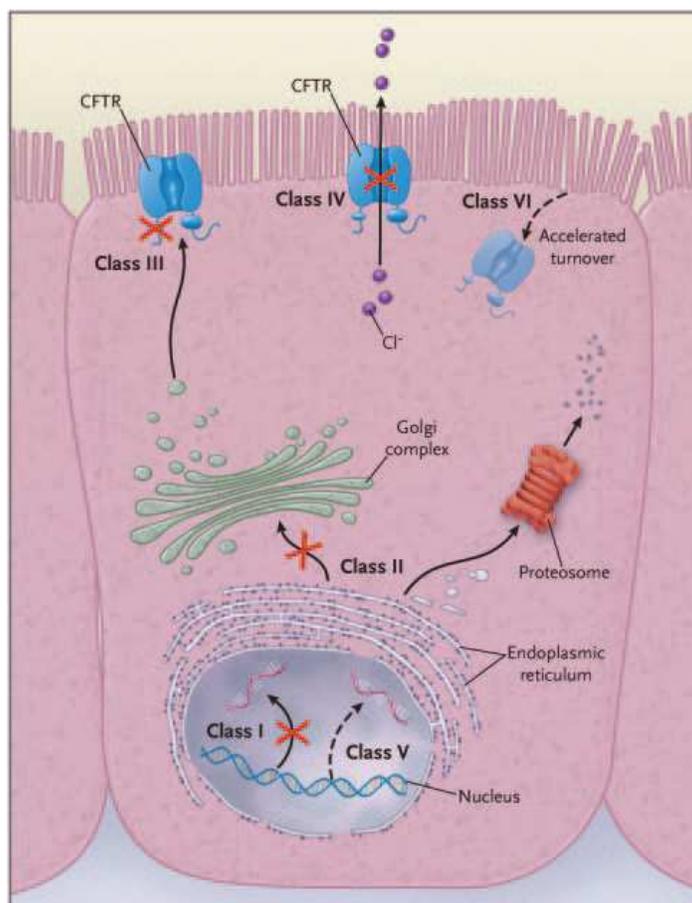


Figura 2: Classes das mutações na *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR). Figura extraída de Ratjen, 2009.

Cerca de 66% dos pacientes com FC possuem a mutação Δ F508, uma mutação de classe II. A N1303K também pertence a classe II. As mutações R1162X e G542X pertencem a classe I, sendo que o X representa *stop códon* (O`SULLIVAN & FREEDMAN, 2009).

Cabe ressaltar que polimorfismos em genes não-CFTR, ou mesmo interações gene-gene, podem interferir na gravidade da doença (O`SULLIVAN & FREEDMAN, 2009), por exemplo, muitos estudos mostram que polimorfismos no Fator- β 1 de Transformação de Crescimento (TGF- β 1) podem estar associados à doença pulmonar mais grave (BREMER *et al.*, 2008; BRAZOVA *et al.*, 2006).

A FC é uma doença que resulta principalmente da associação entre genótipo-fenótipo e segundo O`SULLIVAN & FREEDMAN (2009) os sinais e sintomas podem variar muito entre os pacientes nas diferentes fases da vida:

- **Características gerais:** história familiar de FC, suor “salgado”, tosse com produção de escarro, *Pseudomonas aeruginosa* mucóide nas secreções aéreas, alcalose metabólica hipoclorêmica;
- **Neonatal:** íleo meconial, icterícia prolongada, calcificação abdominal ou escrotal, atresia intestinal;
- **Primeira infância:** infiltrados persistentes na radiografia de tórax, déficit de crescimento, hipoproteinemia com anasarca, diarréia crônica, distensão abdominal, colestase, pneumonia por *Staphylococcus aureus*, hipertensão intracranial idiopática, anemia hemolítica;
- **Infância:** pansinusite crônica, polipose nasal, esteatorréia, prolapso retal, síndrome da obstrução intestinal retal, pancreatite idiopática recorrente ou crônica, doença hepática;
- **Adolescência e idade adulta:** aspergilose bronquipulmonar alérgica, pansinusite crônica, polipose nasal, bronquiectasias, hemoptise, pancreatite idiopática recorrente, hipertensão portal, atraso da puberdade e azospermia secundária à ausência de canais deferentes;

É importante que o diagnóstico desta doença seja feito o mais precocemente possível, pois isso pode assegurar uma melhor qualidade de vida

para o paciente, além de assegurar uma evolução mais controlada da doença. Em países desenvolvidos, a maioria dos pacientes tem diagnóstico confirmado antes dos dois anos de idade, entretanto, no Brasil esta realidade é bem diferente, a maioria dos casos tem diagnóstico a partir dos 3 anos de idade (RIBEIRO; RIBEIRO; RIBEIRO, 2002).

Segundo Ribeiro e colaboradores (2009), os critérios diagnóstico da FC são: evidência laboratorial de disfunção da CFTR, pela presença de concentrações elevadas de cloro (≥ 60 mEq/L) no suor em duas análises independentes, ou identificação genética de mutações de fibrose cística, associada(s) a uma ou mais manifestações fenotípicas (clínicas).

2.3.1 Sintomas gastrointestinais

Falhas na secreção de cloro e redução no conteúdo de água fecal podem conduzir o recém-nascido ao *íleo meconial*, sendo que a incidência é de 11 a 20% das crianças com FC. Após a fase neonatal, cerca de 15% dos pacientes fibrocísticos podem desenvolver a síndrome da obstrução intestinal distal (SOID) ou também conhecida como *equivalente meconial*, que pode produzir recorrentes episódios de obstrução parcial do intestino na região próxima ao ileocecal. Inicialmente a obstrução pode ser incompleta, porém, sem tratamento pode evoluir para uma obstrução completa seguida de vômitos e constante distensão abdominal (STRAUSBAUGH & DAVIS, 2007; KREMER *et al.*, 2008).

Refluxo gastroesofágico é comum em pacientes com FC, onde mais de 20% apresentam os sintomas, uma vez que muitos fatores associados à FC podem contribuir para o desenvolvimento desta condição (STRAUSBAUGH & DAVIS, 2007).

Um dos órgãos mais afetados pela FC é o pâncreas, em aproximadamente 91% dos pacientes ocorre obstrução exócrina, com posterior insuficiência pancreática (IP). Esta condição pode ocorrer já ao nascimento, ou nos primeiros anos de vida e resulta em má absorção de proteínas, lipídeos e vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), havendo necessidade de constante reposição enzimática. Uma das conseqüências mais freqüentes da IP é o baixo ganho de

peso, associado a retardo no crescimento. A IP tem forte associação genótipo/fenótipo, sendo presente em pacientes cuja mutação na CFTR é de classe I, II, ou III, ou seja, nos pacientes com mutação de classe IV, V e VI o pâncreas é “suficiente”. A suficiência pancreática está relacionada à pancreatite idiopática, sendo que cerca de 20% destes pacientes pancreático-suficientes desenvolvem pancreatite crônica (STRAUSBAUGH & DAVIS, 2007; KREMER *et al.*, 2008).

Doença hepática é a terceira causa mais comum de morte em FC, e muitos dos pacientes fibrocísticos desenvolvem algum nível de desordem hepática, que pode ser elevação de transaminases, esteatose hepática, doença no trato biliar, entre outras. A esteatose hepática é a mais comum (20 a 60%) seguida da colelitíase (15%). Um pequeno número de pacientes desenvolve cirrose, fibrose portal e hipertensão portal. O *íleo meconial* na infância e a insuficiência pancreática são fatores que predis põem o indivíduo à doença hepática (COLOMBO *et al.*, 2006; KREMER *et al.*, 2008).

2.3.2 Desordens endócrinas

Com o aumento da sobrevida dos pacientes com FC, a diabetes relacionada à FC (CFRD) tornou-se mais comum, uma vez que a prevalência da CFRD aumenta com a idade (STRAUSBAUGH & DAVIS, 2007). Moran e colaboradores (1998) mostraram uma prevalência de 9% entre 5 e 9 anos, de 26% entre 10 e 19 anos, 35% de 20 a 29 anos e de 43% para os maiores de 30 anos. A sobrevida é maior no gênero masculino. Pacientes com CFRD tem um acelerado declínio do estado clínico, além disso, o stress oxidativo aumenta com a piora no metabolismo da glicose (NTIMBANE *et al.*, 2008; O`SULLIVAN & FREEDMAN 2009).

A CFRD é multifatorial, esta disfunção endócrina do pâncreas pode ocorrer devido à diminuição na função das células- β com progressiva fibrose nas Ilhotas de Langherans, resultando em distorção, isquemia e morte celular. Outro fator que pode contribuir são os defeitos insulíntrópicos na secreção deste hormônio no intestino, mudanças na sensibilidade à insulina e taxa de clearance insulínica (NTIMBANE *et al.*, 2008).

Osteoporose, osteopenia e reabsorção óssea começam a ser um problema mais proeminente na FC, entretanto, a contribuição na sobrevida, a sintomatologia e as origens precisam ser mais estudadas. Os fatores que podem estar associados ao aparecimento destas complicações: retardo na maturação puberal, uso de esteróides, má absorção de vitaminas lipossolúveis, déficit nutricional, baixa ou nenhuma atividade física e doença pulmonar, a qual promove aumento de citocinas inflamatórias que aumentam a reabsorção e reduzem a formação óssea (ARIS *et al.*, 2005; HECKER & ARIS, 2004).

2.3.3 Doença Pulmonar

A doença pulmonar é a causa primária de morbidade e mortalidade de pacientes com FC. Ao nascerem indivíduos com FC tem pulmões aparentemente normais, entretanto, em pouco tempo a combinação entre obstrução, infecção e inflamação começa afetar negativamente o crescimento, estrutura e função pulmonar (STRAUSBAUGH & DAVIS, 2007; KREMER *et al.*, 2008).

A alteração na função da CFTR da membrana celular leva à redução na secreção de cloro e aumento na absorção de sódio e água no canal de sódio com conseqüente redução na quantidade de líquido na superfície das vias aéreas. Assim, as secreções são desidratadas e anormalmente viscosas, acarretando em colapso ciliar e reduzido “*clearance*” mucociliar (KREMER *et al.*, 2008, RATJEN, 2009), com prejuízo neste mecanismo do sistema imune inato que elimina partículas e patógenos do pulmão. Além disso, o muco desidratado obstrui pequenos ductos das vias aéreas, criando micro regiões com reduzida quantidade de oxigênio, resultando em elevado risco de infecção endobronquial, acompanhada por intensa resposta de agentes inflamatórios, que causam dano epitelial, tornando o local cada vez mais predisposto a infecção e exacerbações (NICHOLS; CHMIEL; BERGER, 2008).

Pacientes com alto grau de inflamação possuem intensa angiogênese no local, que predispõe à hemoptise, sendo que a continuação da inflamação pode predispor ao pneumotórax, que está associado à redução na sobrevida (STRAUSBAUGH & DAVIS, 2007).

Infecção

A microbiota que afeta os pacientes com FC é diversa e complexa. O microorganismo (MO) que afeta primeiramente o fibrocístico é o *Staphylococcus aureus* (O`SULLIVAN & FREEDMAN 2009; KREMER *et al.*, 2008) o qual torna-se multi resistente em 15 a 20% dos pacientes, sendo esta condição associada com piora da função pulmonar (DASENBROOK *et al.*, 2008). O *Haemophilus influenzae* é também bastante comum (KREMER *et al.*, 2008).

Pseudomonas aeruginosa (PA) é o patógeno crônico mais comum nas vias aéreas de FC, em qualquer idade. Até o final da adolescência 80% dos pacientes serão cronicamente infectados. A Infecção por PA afeta significativamente a longevidade de pacientes com FC (KREMER *et al.*, 2008). No início, a infecção ocorre em períodos variados e é do tipo não-mucóide. Ao longo do tempo, a PA torna-se mucóide e pode levar à formação de biofilmes, com alta resistência à ação de antibióticos e às respostas do sistema imune inato (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Os fatores de risco associados para a aquisição de PA incluem isolamento de *S. aureus* com terapia antiestafilocócica, gênero feminino e genótipo Δ F508 homocigoto (MASELLI *et al.*, 2003).

A *Burkholderia cepacia* possui um altíssimo poder destrutivo da função pulmonar nos FC. A infecção com esta bactéria gram-negativa é tipicamente crônica e aumenta as taxas de morbimortalidade. Muitos pacientes vivem por anos infectados por *B. cepacia* sem mudanças clínicas, outros entretanto são acompanhados de rápida deterioração (KALISH *et al.*, 2006; LIPUMA, 1998). A manifestação aguda da *B. cepacia* é conhecida como “síndrome cepacia”, é manifestada por pneumonia necrotizante, acompanhada por insuficiência respiratória e morte (ISLES *et al.*, 1984).

A *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* também podem estar presente na microbiota de FC, porém têm baixa virulência e um pequeno efeito no curso da doença (KREMER *et al.*, 2008).

A infecção/colonização pulmonar fúngica é comum em FC, sendo a mais freqüente é a infecção por *Candida sp*, em 50 a 70% do pacientes (BURNS *et al.*, 1998). Por outro lado o *Aspergillus* é isolado em aproximadamente 25% dos

pacientes, podendo estar significativamente relacionado com a doença. A aspergilose invasiva é rara, porém fatal. A aspergilose broncopulmonar alérgica é razoavelmente comum (3,2 a 5,2%), sendo caracterizada por uma exuberante resposta imunológica mediada pela IgE, sendo que a resposta do antígeno é chiado, infiltração pulmonar, aumento de bronquiectasias e fibrose (GREENBERGER, 2002).

Aproximadamente 13% dos pacientes adultos com FC são colonizados ou infectados por micobacterias não tuberculosas, sendo a mais comum o complexo *Mycobacterium avium* (72%) (OLIVER *et al.*, 2003).

Processo inflamatório

A infecção bacteriana crônica é sem dúvida uma importante causa da inflamação em pacientes com FC, sendo considerada por muitos autores como a causa inicial. Entretanto, outros trabalhos sugerem que o epitélio respiratório do fibrocístico pode ter características proinflamatórias inerentes e que a inflamação pode se manifestar independente da infecção (ELIZUR; CANNON; FERKOL, 2008). Observações de que nos primeiros anos de vida, mesmo na ausência de infecção, pode ser detectado um estado inflamatório, o que vem suportando a hipótese de que este é um processo autônomo e que começa em resposta à falha na proteína CFTR das células epiteliais (DIMANGO *et al.*, 1998). Modelos *in vitro* têm mostrado que o defeito na CFTR resulta em stress celular com conseqüente ativação do NF- κ B e transcrição de IL-8 que recruta grande quantidade de neutrófilos para o local, desencadeando o processo inflamatório (TIROUVAZIAM; KHAZAAL; PEULT, 2002). Há consenso de que a presença dos neutrófilos e a existência da mutação na CFTR são os responsáveis pela inflamação na FC (ROTTNER; FREYSSINET; MARTINEZ, 2009).

Em indivíduos normais, durante uma resposta inflamatória, os neutrófilos migram para o local e juntamente com outros componentes, combatem a infecção, sofrem apoptose e são removidos pelos macrófagos, resultando em um pequeno dano tecidual local. No epitélio respiratório do fibrocístico, este processo falha por algumas razões: (1) persistentes estímulos pró-inflamatórios; (2) falha na parada

de produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas; (3) quantidade excessiva de neutrófilos recrutados bem como sua sobrevivência celular anormalmente aumentada que pré-dispõem estas células à sofrerem necrose em vez de apoptose, prejudicando a habilidade de clearance dos macrófagos; (4) alta suscetibilidade à apoptose de células epiteliais em resposta ao defeito na CFTR e (5) macrófagos com maior produção de TNF- α que em indivíduos normais. Essa falha no epitélio respiratório do FC, resulta em liberação de DNA e fibrilas de actina, aumentando ainda mais a viscosidade e reduzindo ainda mais o clearance mucociliar (NICHOLS; CHMIEL; BERGER, 2008; ROTTNER; FREYSSINET; MARTINEZ, 2009).

Durante o processo inflamatório, os neutrófilos liberam agentes oxidantes e proteases, incluindo a elastase, que quando em excessivas quantidades podem contribuir para a injúria pulmonar. Entre os efeitos deletérios da atividade proteolítica da elastase no epitélio respiratório pode-se citar: aumento na reabsorção de sódio intracelular, aumento da persistência bacteriana no local pela clivagem de receptores dos opsonizadores e redução do clearance de neutrófilos pelos macrófagos por meio de clivagem do receptor de fosfoserina destas células. Além disso, a elastase pode promover a geração de quimioatrativos de neutrófilos, como a IL-8 e leucotrieno B4 (NICHOLS; CHMIEL; BERGER, 2008).

- Stress oxidativo

A condição fisiológica da célula exige equilíbrio entre as condições pró-oxidantes e antioxidantes; o rompimento do estado estacionário em favor da condição pró-oxidante favorece injúrias celulares e o stress oxidativo (RIBEIRO *et al.*, 2005). Portanto, ROS possuem efeito benéfico ou deletério, dependendo da concentração. O excesso de ROS celular vem sendo descrito por promover a transcrição de genes inflamatórios, além disso, pode causar a oxidação de macromoléculas, causando um dano molecular irreversível (GENESTRA, 2007; ROTTNER; FREYSSINET; MARTINEZ, 2009).

Na FC, o aumento na entrada de sódio para o interior das células epiteliais causa um aumento na produção de ATP e, conseqüentemente, de peróxido de hidrogênio intracelular e ROS mitocondrial. Assim, é possível que a produção de

ROS esteja implicada na iniciação e manutenção do processo inflamatório, sendo que a excessiva produção de ROS ativa o NF-kB e aumenta a transcrição de citocinas pró-inflamatórias que podem aumentar a produção de ROS, perpetuando o ciclo vicioso (TERRY, 2006; OZBEN, 2007).

O defeito na neutralização de ROS também pode ser o responsável pelo stress oxidativo na FC. A glutathiona tem propriedades antioxidantes bem conhecidas (TOWNSEND; KENNETH; TAPIERO, 2003; PASTORE *et al.*, 2003; BALLATORI *et al.*, 2009), entretanto, distúrbios na homeostase da glutathiona estão implicados na etiologia e progressão de uma serie de doenças, incluindo a FC (BALLATORI *et al.*, 2009). A glutathiona existe na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), podendo estar inter e intracelular. No meio extra-celular neutraliza os radicais livres produzidos pelos neutrófilos durante a inflamação. A CFTR está envolvida no transporte da GSH para o interior das células epiteliais, assim, é possível que o transporte de GSH esteja comprometido neste tipo celular na FC. A GSH também inibe a degradação de I-kB, inibidor da ativação de NF-kB; portanto, baixos níveis de GSH intracelular podem promover a ativação do NF-kB, aumentando ainda mais a expressão de citocinas pró-inflamatórias (ROTTNER; FREYSSINET; MARTINEZ, 2009).

Dessa forma, entende-se que defesa no sistema antioxidante está associado às mutações na CFTR, portanto, pacientes com FC possuem inadequadas defesas antioxidantes, as quais estão associadas ao elevado stress oxidativo, que contribui para a perda da função pulmonar.

- Citocinas

A resposta inflamatória também é resultado do complexo balanço entre agentes pró-inflamatórios e agentes anti-inflamatórios. Citocinas são proteínas regulatórias que ajudam iniciar e manter respostas imunológicas. As citocinas pulmonares são derivadas de múltiplas fontes: células do epitélio respiratório, macrófagos, neutrófilos, entre outras (SAGEL & ACCURSO, 2002).

Alguns trabalhos mostram que os níveis de citocinas pró-inflamatórias no sangue de pacientes com FC são semelhantes aos de indivíduos normais (WOLTER *et al.*, 1999). Entretanto, no epitélio pulmonar inflamado ocorre

desregulação na concentração de citocinas, onde são encontradas altas quantidades de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α) e reduzidas quantidades de anti-inflamatórias como a IL-10 (COURTNEY; ENNIS; ELBORN, 2004; SAGEL & ACCURSO, 2002; TERRY, 2006). Esta última consegue reduzir a degradação de I-kB, enquanto alta expressão das citocinas pró-inflamatórias aumenta a expressão e a atividade dos fatores pró-inflamatórios de transcrição NF-kB e AP-1, que aumenta ainda mais a produção de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo ainda mais as anti-inflamatórias, transformando a inflamação em um ciclo vicioso (ROTTNER; FREYSSINET; MARTINEZ, 2009).

Novos estudos vêm evidenciando que a inflamação possui um efeito sistêmico, a comprovação disso é a presença de caquexia, hiperglobulinemia e osteopenia em pacientes com FC (KRONBORG *et al.*, 1993; SUTER *et al.*, 1989). A homeostase do cálcio é alterada em células com mutação em CFTR, uma vez que mediadores inflamatórios, como IL-1 β e TNF- α , induzem à reabsorção óssea e ao aumento da liberação de Ca⁺² o qual é acompanhado pela ativação do NF-kB, contribuindo para a propagação do ciclo (ROTTNER; FREYSSINET; MARTINEZ, 2009). As principais citocinas envolvidas no processo inflamatório da FC são brevemente descritas abaixo:

- **Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α):** está envolvido em muitos aspectos da resposta inflamatória, incluindo a indução da produção de outras citocinas inflamatórias e ativação de monócitos e neutrófilos. Pode ser um mediador da degranulação neutrofílica (SAGEL & ACCURSO, 2002). Altas concentrações podem ser correlacionadas com níveis aumentados de proteína-C reativa e elastase neutrofílica (NORMAN *et al.*, 1991). Apesar de muitos estudos o TNF- α , ainda não pode ser considerado um marcador da doença.
- **Interleucina 1 (IL-1):** é pró-inflamatória e tem funções semelhantes ao TNF. Atua como mediadora da migração e ativação neutrofílica, promovendo secundariamente a liberação de outras citocinas, como a IL-8 e a IL-6. A concentração desta citocina, no soro e no lavado brônquico, parece estar aumentada na FC (SAGEL & ACCURSO, 2002).
- **Interleucina 6 (IL-6):** Pode se sobrepor aos efeitos do TNF- α e IL-1, bem como, estimular a produção de anticorpos e aumentar a atividade

hematopoiética de alguns fatores de crescimento. Também tem efeito anti-inflamatório, que inclui inibição do TNF- α e IL-1 β , por meio do estímulo à produção de seus antagonistas. IL-6 circulante pode ter correlação com baixo peso e doença óssea (IONESCU *et al.*, 2000; ARIS *et al.*, 2000).

- **Interleucina 8 (IL-8):** é a principal responsável pelo recrutamento de neutrófilos para o pulmão em pacientes com FC e outras doenças respiratórias crônicas (MIKAMI *et al.*, 1998). Nas vias respiratórias de fibrocísticos a IL-8 é produzida por células epiteliais, macrófagos e neutrófilos. Os níveis IL-8 nas vias aéreas têm uma alta relação com concentrações de elastase neutrofílica (McELVANEY *et al.*, 1998), estado clínico (DEAN *et al.*, 1993) e quantidade de neutrófilos. Karpati, Hjelte e Wretlind (2000) sugeriram que altas concentrações de IL-8 e TNF- α estão correlacionadas com estado de deterioração pulmonar. Esta pode ser futuramente um importante marcador clínico da FC.
- **Interleucina 10 (IL-10):** é conhecida como uma citocina anti-inflamatória com atividade reguladora. Ela inibe a síntese de TNF- α , IL-1, IL6 e IL-8, a ativação de macrófagos, células dendríticas e células natural killer (NK). Está envolvida no controle da imunidade natural e adquirida mediada por células (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).
- **Interferon gama (IFN- γ):** é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções críticas na imunidade natural e adquirida mediada por células (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Durante a infecção as células NK são ativadas e induzem a diferenciação do precursor de células T para células T_H1 (SAGEL & ACCURSO, 2002). Resposta celular T_H1 pode melhorar o prognóstico do paciente com FC (MOSER *et al.*, 2000).
- **Fator transformador de crescimento beta (TGF- β):** é uma citocina pleiotrópica que atua como potente supressor da imunidade e da inflamação, inibindo a produção de muitas citocinas produzidas por monócitos e linfócitos (TNF- α , IL-1 e IL-6), inibe a proliferação das células T e B e induz à produção de IL-1RA a qual contribui com efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios. Estimula a produção de IgA por induzir as células B a realizarem a troca de classe, produzindo assim, imunoglobulinas do isotipo IgA (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; SAGEL & ACCURSO, 2002).

A figura 3 traz um resumo da interação entre o defeito na proteína CFTR e a resposta inflamatória.

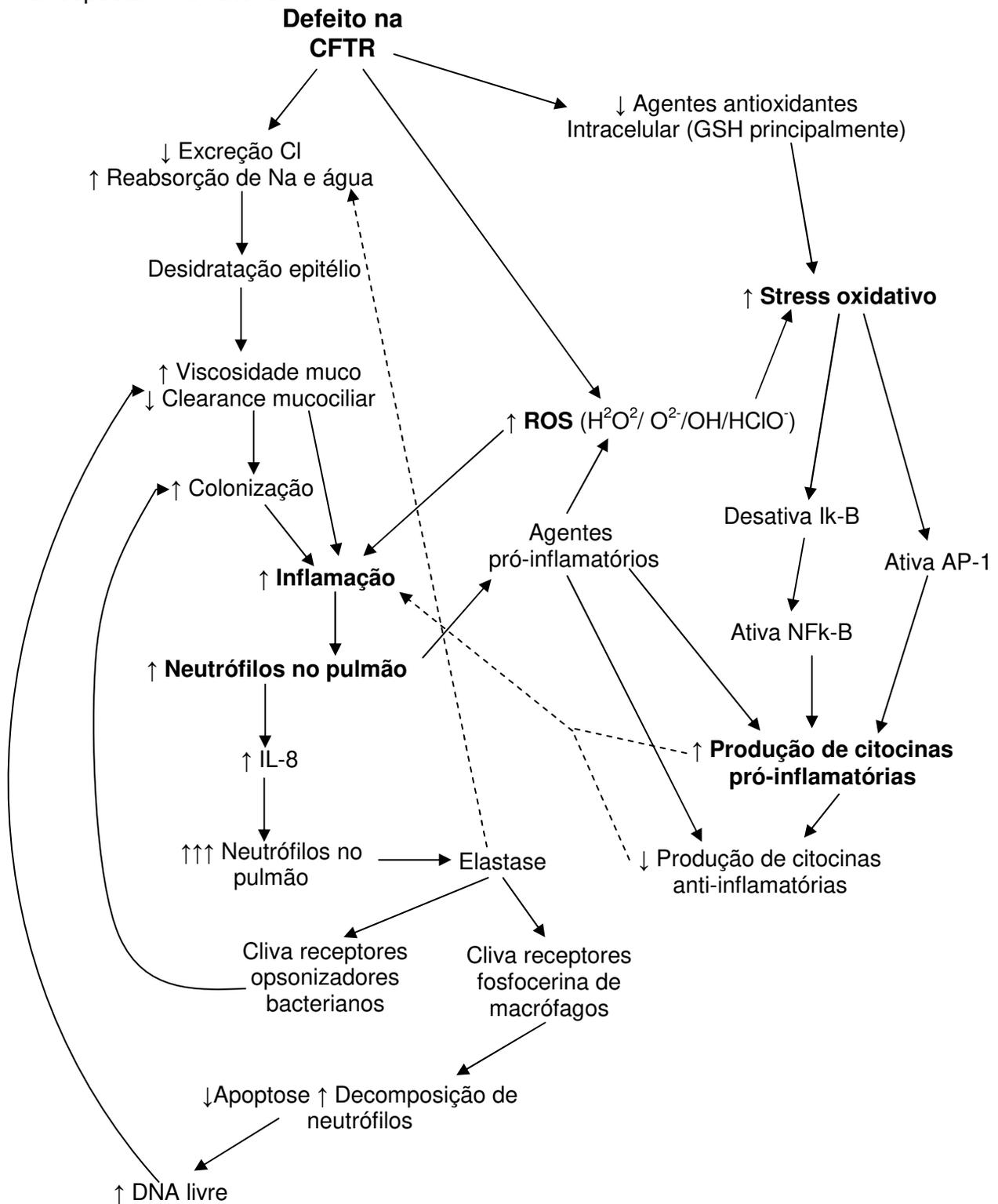


Figura 3: Relação entre o defeito na *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR) e a resposta inflamatória na Fibrose Cística.

2.3.4 Nutrição

A literatura é unânime em afirmar que o estado nutricional possui alta correlação com a sobrevida dos pacientes fibrocísticos, entretanto, o equilíbrio nutricional destes indivíduos pode ser afetado por um conjunto de condições como a insuficiência pancreática, doença pulmonar, infecção, doença hepática, tipo da mutação genética e diabetes, entre outras. (MICHEL; MAQBOOL; HANNA, 2009). Com a influência de tantos fatores, a maioria das crianças com fibrose cística, corre o risco de apresentar sinais e sintomas de comprometimento nutricional durante os primeiros anos de vida (CARDOSO *et al.*, 2007).

É cada vez mais evidente que a condição dos pacientes está intimamente relacionada com o tratamento que recebem e que os pacientes podem ter uma melhora no estado nutricional e clínico onde a atenção à nutrição e crescimento é regular. É encorajador saber que o estado nutricional dos pacientes com FC vem melhorando ao longo dos anos (SINAASAPPEL *et al.*, 2002).

Segundo o Consenso Europeu de FC (SINAASAPPEL *et al.*, 2002), a desnutrição é constatada quando o peso para altura estiver abaixo de 90% em crianças ou quando o IMC estiver abaixo de 18,5 nos adultos. A desnutrição é um importante fator de risco associado à morbi-mortalidade (OLVEIRA; OLIVEIRA; JULIANO, 2005), trabalhos recentes demonstraram isso como verdadeiro tanto para adultos como para crianças (OZTURK *et al.*, 2003).

Os principais fatores responsáveis pelo déficit nutricional nestes pacientes são: aumento das necessidades energéticas, má digestão/má absorção – com conseqüente esteatorréia, infecção, processo inflamatório, anorexia, perda protéica nas secreções pulmonares, uso de medicações, distúrbios comportamentais, glicosúria no paciente já diabético, entre outros (CARDOSO *et al.*, 2007; DODGE & TURCK, 2006).

As necessidades energético-protéicas dos fibrocísticos são aumentadas em relação a indivíduos saudáveis, as várias recomendações elas podem variar entre 110 e 200% (MICHEL; MAQBOOL; HANNA, 2009), porém as recomendações mais aceitas são as do consenso europeu de FC, que propõe que as NED (Necessidades energéticas diárias) destes pacientes estejam em torno de 120 a

150% do recomendado para a mesma idade e gênero em pacientes saudáveis (SINAASAPPEL *et al.*, 2002).

A má digestão/absorção intestinal na FC é multifatorial, sendo a deficiência enzimática sua principal causa. Outros fatores a serem considerados são o transporte deficiente de íons através da mucosa intestinal relacionado ao defeito em CFTR; a perda de sais biliares com o aumento da conjugação com a glicina e a diminuição da conjugação com a taurina; alterações de motilidade com aumento do trânsito intestinal e ressecção intestinal devido a complicações de íleo meconial (CARDOSO *et al.*, 2007).

A infecção e inflamação são processos quase que inerentes à FC e estão fortemente relacionados ao aumento das necessidades energéticas nestes indivíduos. A presença da inflamação e infecção crônicas muitas vezes induzem o indivíduo à anorexia e desenvolvimento de comorbidades (KREMER *et al.*, 2008; MILLA, 2007). A interação sinérgica entre desnutrição, infecção e inflamação é reconhecida há muito tempo com base em observações clínicas e em dados epidemiológicos. Como resultado final ocorre a potencialização de cada uma isoladamente e adicionadas entre si, sendo que a desnutrição compromete as defesas imunológicas do hospedeiro, facilitando a instalação de processos infecciosos que comprometem ainda mais o estado nutricional, tornando-se um círculo vicioso (OLIVEIRA; OLIVEIRA; JULIANO, 2005).

A importância da nutrição no curso da FC é incontestável e nos últimos anos muitos trabalhos têm demonstrado isso (MILLA, 2007). Existe uma forte relação entre o IMC e parâmetros de função pulmonar, onde a desnutrição é correlacionada com maior disfunção pulmonar, sendo que em geral a desnutrição precede a doença pulmonar (OROWITZ, 1996; THOMSON; QUIRK; SWANSON, 1995).

Em trabalho recente de revisão (MILLA, 2007), foram apontados que os principais danos à função pulmonar causados pela desnutrição precoce são as alterações na estrutura pulmonar e a má diferenciação dos bronquíolos, sendo que essas condições consideradas de grande prejuízo para a função pulmonar do paciente nos anos posteriores de sua vida. Este mesmo autor, sugere que em estágios mais avançados da vida a desnutrição também pode afetar a função

pulmonar por meio de aumento da superfície forçada e redução da elasticidade tecidual, sendo que em caso de recuperação nutricional a elasticidade tecidual não é recuperada.

A má nutrição também pode ativar mecanismos de ativação imunológica, sendo que deficiências de vitaminas e outros micronutrientes causam efeitos deletérios nas defesas pulmonares, como atividade ciliar, balanço antioxidante e imunidade inata (KELLY; SACKER; MARMOT, 2003).

Contudo, é incontestável que o estado nutricional do paciente com FC resulta de um processo dinâmico que é influenciado e que influencia muitos fatores (Figura 4).

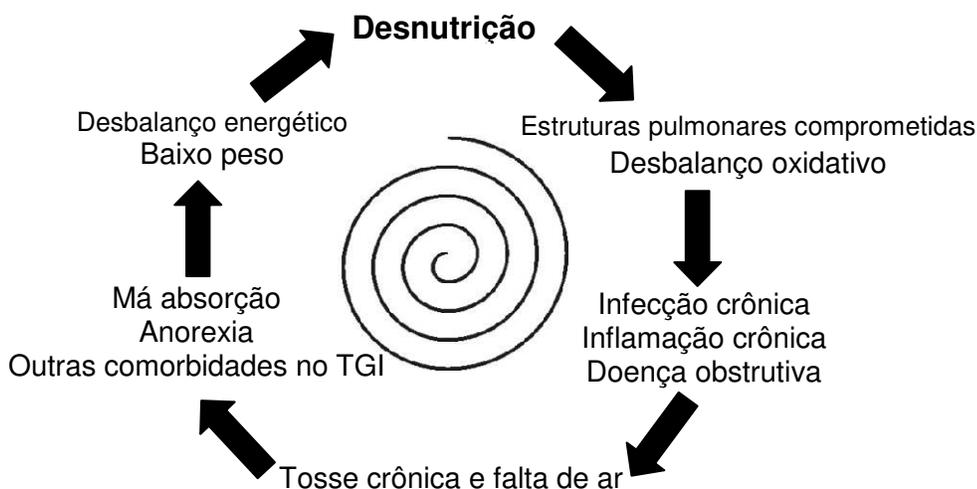


Figura 4: Dinâmica da desnutrição na Fibrose Cística. Figura adaptada Milla, 2007

2.3.5 Pilares do tratamento

Em 1954 Leroy Matthews estabeleceu um programa de atendimento e cuidado ao paciente com FC e o resultado disso foi um dramático aumento na sobrevivência e qualidade de vida destes indivíduos. O programa tinha como base três pilares de tratamento: recuperação do estado nutricional, redução da obstrução das vias aéreas e antibióticoterapia para redução da infecção (DAVIS, 2006). Hoje o manejo clínico destes pacientes ainda é baseado nos três pilares propostos por Matthews, porém com mais um pilar: a supressão do processo inflamatório.

Terapia nutricional

A dieta geral, sem restrição de macronutrientes, e a orientação para o uso correto das enzimas são as primeiras recomendações nutricionais aos pacientes com FC (CARDOSO *et al.*, 2007).

Deve-se ter muito cuidado no manejo dietético do paciente com FC, sempre procurando suprir as necessidades energéticas com uso de dietas hipercalóricas com alimentos apropriados para a idade e até mesmo com o uso de suplementos (CARDOSO *et al.*, 2007). O consenso europeu de FC indica o uso de suplementos nutricionais quando o IMC em adultos for igual a 18,5 e quando a porcentagem de peso ideal estiver igual ou inferior à 90% em crianças ou ainda quando a criança menor de 5 anos não vem ganhando peso há três meses. A nutrição enteral é indicada se o IMC é inferior a 18,5 em adultos e em crianças se o peso e altura estiverem abaixo de 85% ou se o paciente não vier ganhando peso nos últimos 6 meses. A gastrostomia e a nutrição parenteral são indicadas em situações de pós-operatório ou de pré-transplante pulmonar, ou ainda quando nenhuma estratégia estiver dando resultado na recuperação do estado nutricional (SINAASAPPEL *et al.*, 2002).

O uso de triacilgliceróis de cadeia longa (TCL) e triacilgliceróis de cadeia média (TCM) são excelentes opções para melhorar o aporte energético. O TCM apresenta algumas vantagens em relação aos TCL, entretanto a combinação de ambos tem se mostrado benéfica, uma vez que TCM são excelente fonte de energia e os TCL garantem o adequado aporte de ácidos graxos essenciais (CARDOSO *et al.*, 2007).

A deficiência de insulina na FC está associada ao aumento no catabolismo protéico e a terapia com insulina pode contribuir para o aumento de peso do paciente com diabetes relacionada à FC (DRFC). Uso de outros agentes anabólicos como o acetato de megestrol e hormônio do crescimento para melhora do apetite começam a ser cada vez mais propostos (CARDOSO *et al.*, 2007; DODGE & TURCK, 2006).

A administração de vitaminas lipossolúveis é extremamente importante para pacientes com FC, sendo uma prática comum na assistência nutricional.

Alterações de alguns minerais, como cálcio, ferro e zinco, e de eletrólitos também devem ser acompanhadas (CARDOSO *et al.*, 2007; DODGE & TURCK, 2006, MICHEL; MAQBOOL; HANNA, 2009).

A IP é também um grande e freqüente problema na FC e o uso de enzimas pancreáticas é uma importante ferramenta no combate à má digestão e conseqüente má absorção dos nutrientes; assim, sendo uma vez identificada a IP, a terapia enzimática deve ser iniciada. Em 1980, os suplementos enzimáticos foram reformulados, ficando mais protegidos contra os ácidos gástricos e minimizando as escoriações bucais e perianais (DAVIS, 2006). Uso de bloqueador de H₂ ou de inibidor de bomba de prótons contribui para a melhora da ação enzimática. A adequação do uso enzimático é feita por meio de parâmetros de crescimento e padrão de fezes (CARDOSO *et al.*, 2007).

Em relação à suplementação com antioxidantes, sabe-se que a vitamina E é o antioxidante lipossolúvel mais importante e sua suplementação é recomendada e bem definida. A suplementação com vitamina C, selênio e outros antioxidantes requerem mais estudos (CARDOSO *et al.*, 2007).

Alívio da obstrução respiratória

O clearance das secreções tem papel fundamental no cuidado ao FC. A Fisioterapia Respiratória (FR) teve sua importância reconhecida na década de 50, sendo parte fundamental no tratamento diário desta enfermidade (DAVIS, 2006). A FR tem por objetivo remover mecanicamente as secreções viscosas que obstruem as vias aéreas, por meio da utilização das técnicas de percussão, drenagem postural, vibração, tosse, drenagem autogênica, técnica de expiração forçada, flutter e máscara pressão expiratória positiva (KREMER *et al.*, 2008).

O uso de drogas que aumentam o clearance também é amplamente utilizado. Mucolíticos reduzem a viscosidade do muco, sendo que proteína recombinante humana desoxirribonuclease I (rhDNase), é uma enzima que cliva, seletivamente, o DNA livre presente no muco reduzindo a sua viscosidade. Nos últimos anos, aerossol de solução salina hipertônica vem sendo utilizado, com resultados positivos. O uso de broncodilatadores também é pratica comum em

pacientes com FC, atuando principalmente na ativação dos mecanismos que induzem relaxamento do músculo liso respiratório (KREMER *et al.*, 2008; DAVIS, 2006).

Tratamento da infecção respiratória

A antibioticoterapia contribuiu muito para melhorar a sobrevida de pacientes com FC e é utilizada há 60 anos. Os antibióticos são indicados para prevenção, retardo de colonização, tratamento da agudização, supressão da infecção crônica e mais recentemente, tratamento da colonização de via aérea superior em pacientes pós-transplante, para evitar a infecção dos pulmões transplantados (DAVIS, 2006).

Alguns estudos têm avaliado a eficácia da terapia inalatória antipseudomonas para evitar a colonização crônica. Os resultados foram atraso na colonização crônica e menor declínio da função pulmonar. Considerando que grande parte dos pacientes com FC são colonizados por *P. aeruginosa*, antibióticos aminoglicosídeos têm sido extensivamente usados nesta população de pacientes (DAVIS, 2006).

Supressão da inflamação

Recentemente tornou-se evidente que o processo inflamatório precede a infecção. Por essa razão, tratamento antiinflamatório deveria ser iniciado precocemente. Estudos com uso de prednisona mostraram melhora na função pulmonar, embora com os efeitos colaterais da corticoterapia. (EIGEN *et al.*, 1995).

O uso de corticóide inalatório poderia minimizar os efeitos sistêmicos da corticoterapia. Um estudo recente, com uso de corticóide inalado (budesonida) em altas doses, mostrou-se eficaz em reduzir o processo inflamatório na fibrose cística. Dessa forma, o uso de corticóide oral e corticóide inalado pode estar indicado no tratamento de pacientes com FC (BISGAARD *et al.*, 1997).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com um concentrado protéico do soro de leite bovino (WPC) enriquecido com TGF- β e lactoferrina, na resposta inflamatória e nutricional em pacientes pediátricos com diagnóstico de fibrose cística.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o quadro clínico dos pacientes antes da suplementação;
- Estabelecer o perfil imunológico dos pacientes com FC, por meio da comparação com indivíduos saudáveis;
- Avaliar o efeito antiinflamatório e anti-oxidante do WPC-TGF β em pacientes com fibrose cística utilizando as dosagens de glutathiona reduzida (GSH), espécies reativas de oxigênio (ROS), citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL6, IL8 e IL-10 e TGF- β 2), imunoglobulinas séricas e Imunoglobulina A na saliva e hemograma;
- Analisar a colonização durante a suplementação;
- Avaliar do estado nutricional dos pacientes e identificar se a suplementação promoveu alterações favoráveis;

4 MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizada uma pesquisa do tipo ensaio clínico de intervenção nutricional, com os pacientes atendidos no Ambulatório Pediátrico de Fibrose Cística, do Hospital de Clínicas da UNICAMP, Campinas, SP, Brasil. A intervenção foi do tipo randomizada duplo cego com placebo.

O momento (timing) de mensuração foi prospectivo, sendo considerado o estado clínico do paciente antes da suplementação, ou seja tempo zero (T0) e os efeitos durante os quatro meses de suplementação, por acompanhamento clínico, no segundo mês, tempo um (T1) e tempo dois (T2), final do quarto mês.

Também foi determinado o perfil imunológico dos pacientes com FC, incluídos na pesquisa, por meio da inclusão de um grupo controle de indivíduos saudáveis, onde foi realizada apenas uma coleta de sangue. Cabe ressaltar que este grupo controle saudável serviu apenas como parâmetro para as determinações bioquímicas, não sendo realizada avaliação nutricional e nem ingestão do suplemento.

4.2 POPULAÇÃO

O trabalho foi realizado no Ambulatório Pediátrico de Fibrose Cística, do Hospital de Clínicas da UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Os critérios de inclusão para os pacientes foram:

- Idade entre 3 e 12 anos;
- Que tiveram autorização e assinatura –dos pais ou responsáveis– do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1);
- Com diagnóstico confirmado de fibrose cística (2 testes de suor alterados e / ou mutação genética conhecida);
- Com escore de avaliação clínica entre moderado e bom;
- Vacinados com BCG;

Os critérios de exclusão foram:

- Intolerância à ingestão via oral ou alergia alimentar às proteínas do leite;
- Aderência inferior a 50% do tratamento sugerido .

Em relação ao grupo controle saudável os critérios de inclusão foram:

- Idade entre 3 e 12 anos;
- Que tiveram autorização e assinatura –dos pais ou responsáveis– do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 2);
- Ausência de manifestações clínicas de doença;
- Sem histórico familiar de doença crônica;
- Vacinados com BCG;

Os critérios de exclusão para o grupo controle saudável foram:

- Estar tomando antiinflamatório;
- Relato de febre ou qualquer injúria na última semana;

Previamente à seleção dos pacientes com FC, foi realizado o teste estatístico para determinar o tamanho da amostra que foi calculado com base nas estimativas de trabalhos da literatura (ADDE *et al.*, 1997; GREY *et al.*, 2003). Foi assumido o teste T de Student pareado para o cálculo do tamanho da amostra, um nível de significância de 5% e um poder do teste de 80%, assim, assumimos um tamanho de amostra igual a no mínimo 24 indivíduos, sendo que 12 deveriam ser do grupo teste e 12 do placebo.

Assim, considerando que poderia haver uma perda de seguimento, foram selecionados para participar da pesquisa 52 pacientes, sendo que destes, 45 aceitaram participar. Iniciaram 21 indivíduos recebendo caseína (placebo) e 24 indivíduos recebendo o WPC-TGF β .

Não houve exclusão de nenhum dos participantes, entretanto ocorreram 17 desistências ao longo do estudo, sendo 1 no momento da primeira coleta de sangue (T0), 12 antes de ser realizada a segunda coleta (entre T0 e T1) e 4 antes de ser realizada a terceira coleta (entre T1 e T2). Dentre os motivos da desistência um foi pelo medo de colher sangue e os outros 16 foram pelo sabor do suplemento. Dessa forma a pesquisa terminou com 28 participantes, sendo 15 do grupo WPC-TGF β e 13 do grupo caseína.

Com relação ao grupo controle saudável, o tamanho da amostra foi calculado com base no número de pacientes que iniciaram a suplementação em cada grupo, portanto foram incluídos 16 indivíduos.

4.2.1 Escore clínico

A literatura cita aproximadamente 16 escores para avaliar a gravidade da FC, dentre os quais foi utilizado o escore clínico de Shwachman. Este escore avalia o paciente em quatro aspectos: atividade geral, estado de nutrição, radiologia e avaliação física, cada um destes critérios tem uma variação na pontuação entre 5 e 25, quanto maior a pontuação melhor é o estado geral do indivíduo (SANTOS *et al.*, 2004).

Foram incluídos no estudo os pacientes que possuíam pontuação entre 41 a 85, portanto, estado clínico entre moderado e bom (escore em ANEXO 1). Cabe ressaltar, que a avaliação do escore de Shwachman de cada paciente com FC, é procedimento padrão realizado pela equipe multidisciplinar do Ambulatório Pediátrico de Fibrose Cística, do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

4.3 SUPLEMENTOS PROTÉICOS

O suplemento teste foi um concentrado protéico do soro do leite enriquecido com TGF β e lactoferrina (WPC-TGF β) fornecido pela empresa “Hilmar Ingredients, Hilmar, CA, USA”. O placebo foi um concentrado protéico de caseína da empresa “Synth, Diadema, SP, Brasil”.

O suplemento teste e o placebo foram submetidos a análises centesimais e microbiológicas antes de serem entregues aos pacientes. Quanto às análises centesimais os seguintes métodos foram utilizados: proteína bruta (N x 6,38), umidade e cinza segundo os métodos descritos pela “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1995). Para a extração de lipídeos totais foram utilizados os solventes clorofórmio, metanol e água (nas proporções 10, 20, e 8 mL, respectivamente), conforme metodologia descrita por Bligh & Dyer (1959). Os carboidratos totais foram estimados por diferença, subtraindo-se de 100% a soma dos valores obtidos para as determinações anteriores.

O perfil de aminoácidos foi determinado após hidrólise ácida (110°C, HCl 6N, 22h). Foram separados e identificados por cromatografia em coluna de troca catiônica (Dionex DX 300 amino acid analyzer). Para quantificação dos

aminoácidos utilizou-se mistura padrão de concentrações conhecidas, de procedência Pierce (USA).

A análise microbiológica do produto foi realizada pelo laboratório de microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) segundo metodologia padrão.

4.4 SUPLEMENTAÇÃO

Os pacientes incluídos participaram previamente de uma entrevista, juntamente com seu responsável legal, em que foram esclarecidos os objetivos e os métodos a serem utilizados.

Como citado anteriormente, antes de iniciar a suplementação (T0), o paciente foi submetido a avaliação clínica, exames bioquímicos, bem como a avaliação nutricional (descritos mais adiante) e como a suplementação dietética teve duração de 4 meses, os pacientes foram avaliados no segundo mês (T1) e ao término do quarto mês (T2).

O Consenso Europeu de Nutrição em FC sugere que as necessidades energético-protéicas destes indivíduos estejam aumentadas entre 120 e 150% (SINAASAPPEL *et al.*, 2002). Dessa forma, considerou-se que o suplemento protéico oferecido (suplemento teste ou placebo) deveria suprir o aumento de 50% nas necessidades de proteína dos pacientes. Cabe ressaltar, que o cálculo das necessidades protéicas foi baseado na recomendação em gramas por idade por dia proposta pela DRI (2002):

Tabela 2: Recomendações de proteínas (g/dia) estabelecida pela *Dietary Reference Intake* (DRI, 2002) de acordo com as faixas etárias.

Faixa etária	Proteína g/dia (DRI, 2002)	Proteína g/dia (Suplemento)
1 a 3 anos	13	6,5
4 a 8 anos	19	9,5
9 a 13 anos	34	17

Fonte: DRI, 2002

O suplemento foi entregue aos pacientes na forma de pó, em sachês com quantidades padronizadas para a faixa etária. A administração foi feita em duas doses diárias na forma líquida (dissolvido em leite, sucos ou outras bebidas) ou ainda na forma original de pó misturado a farinhas, cereais matinais, purês de frutas ou outros tipos de alimentos, sempre respeitando a tolerância do paciente e a temperatura máxima de 50°C, para não provocar a desnaturação das proteínas. Foi entregue ao paciente um pequeno manual onde continham informações sobre os cuidados com o suplemento bem como receitas para torná-lo mais palatável (APÊNDICE 3).

4.5 AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA

4.5.1 Coleta de Sangue

Foram coletados 20 mL de sangue venoso periférico por técnicas padrão em tubos adequados para cada procedimento realizado, com pelo menos 4 horas de jejum, sendo tomados cuidados a fim de evitar a hemólise das amostras. As coletas foram realizadas no Ambulatório do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED), no Ambulatório de Pediatria do Hospital de Clínicas (HC) da UNICAMP ou ainda na seção de coleta da patologia clínica do HC da UNICAMP.

4.5.2 Hemograma

Foi realizado a partir de 0,5mL de sangue periférico coletado em tubo com EDTA (Vacuette®, Brasil), na Seção de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas, UNICAMP. A contagem de células global e diferencial realizada no aparelho Cobas-Argos 5 Diff, Roche Diagnostics. A confirmação e a caracterização das anormalidades celulares foram realizadas em esfregaços de sangue corados com May-Grünwald, e a contagem, em microscópios Zeiss.

Para o estudo foi avaliado tanto o perfil dos eritrócitos como perfil de leucócitos.

4.5.3 Glutathiona Eritrocitária

A concentração de GSH reduzida nos eritrócitos foi determinada por espectrofotometria por meio do método de Beutler (1986), modificado por Penna (1995).

Foi coletado 1 mL de sangue periférico em tubo com EDTA (Vacuette®, Brasil). Os eritrócitos de sangue periférico foram lisados com água destilada e, em seguida, as proteínas presentes foram desnaturadas com solução de ácido metafosfórico glacial (1,67g/100mL). Após incubação por 5 minutos, a solução foi filtrada em papel filtro Whatman n.1. Foram acrescentados ao 1 mL do filtrado, 4 mL de fosfato de sódio 0,3M. Após leitura em espectrofotômetro a 412 nm (DO1), foram adicionados 100 µL de solução de 5,5'-dithiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) e obtida uma segunda densidade ótica (DO2).

As densidades óticas foram obtidas, em duplicata, no espectrofotômetro (Beckman-Coulter DU-70, Fullerton, EUA).

A concentração percentual da GSH nos eritrócitos foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{GSH (mg/dL)} = \frac{(\text{DO2}-\text{DO1}) \times 31040}{\% \text{ de Hematócrito}}$$

Onde:

DO1= Densidade ótica da amostra antes da adição do DTNB.

DO2= Densidade ótica da amostra após a adição do DTNB.

31040= Coeficiente de extinção molar do DTNB

4.5.4 Liberação de Radicais Intermediários do Oxigênio pelos Granulócitos

Realizou-se pela técnica de Emmendörffer *et al.* (1990) modificada, que determina a produção dos espécies reativas de oxigênio (ROS) em granulócitos, por meio de citometria de fluxo utilizando a dihidrorhodamina 123 (DHR 123) como substrato. Nessa reação a DHR 123 é oxidada pelo peróxido de hidrogênio em rhodamina, que é fluorescente e pode ser detectada e medida por citometria de fluxo (RICHARDSON *et al.*, 1998), segue abaixo uma breve descrição do método.

Utilizou-se 1mL de sangue total heparinizado (Vacuette®, Brasil), do qual foram separadas 3 alíquotas, cada uma com 100 µL, onde apenas uma recebeu estímulo com 4µL (10µL/mL) de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). As amostras foram incubadas à 37°C por 10min. Posteriormente, 2µL (10µg/mL) de DHR123 foram adicionados à alíquota estimulada e a uma das alíquotas sem estímulo. Incubou-se à 37°C por 5min. As alíquotas foram lavadas com 3 mL de PBS (Phosphate-buffered saline – pH 7,4), centrifugadas por 5min à 2200rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* recebeu 3mL de solução de lise (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM e EDTA 4Na 37mg/L). Incubou-se à 37°C por 7min, seguindo-se centrifugação por 5min à 1000rpm. Novamente o sobrenadante foi descartado e as células remanescentes foram ressuspensas em 350µL tampão de lavagem (PBS com 1% de soro bovino fetal inativado pelo calor e 0,1% de azida sódica) para posterior leitura. As amostras foram denominadas da seguinte forma: estimulada (sangue + PMA + DHR123), produção basal (sangue + DHR123) e branco (sangue). No APÊNDICE 4 está uma representação esquemática desta parte da metodologia.

A leitura foi feita em citômetro de fluxo Coulter XL-MCL (Beckman-Coulter, EUA), registrou-se 30.000 eventos para posterior análise no programa computacional EXPO 1.0 (Beckman-Coulter, Flórida, EUA) conforme descrito na Figura 5.

Para a análise dos dados, primeiramente foi feita a identificação dos granulócitos por meio de um *gate* (A1, A2 e A3). Em seguida foi verificado se o branco (1) realmente possui pouca ou nenhuma quantidade de células fluorescentes (C1), uma vez que estas têm fluorescência própria e não representam produção de ROS. Posteriormente avaliou-se a produção basal de ROS (2), ou seja, a quantidade de células fluorescentes (C2) que são produtoras de radicais livres mesmo na ausência de qualquer estímulo. Por fim, verificou-se o máximo de produção de ROS suportado pela célula (3), mediante ao forte estímulo do PMA. Os dados foram expressos em percentual de produção basal de ROS (C2) e razão entre (D3) por (D2), que representa a capacidade máxima de produção celular de ROS (vide figura 5).

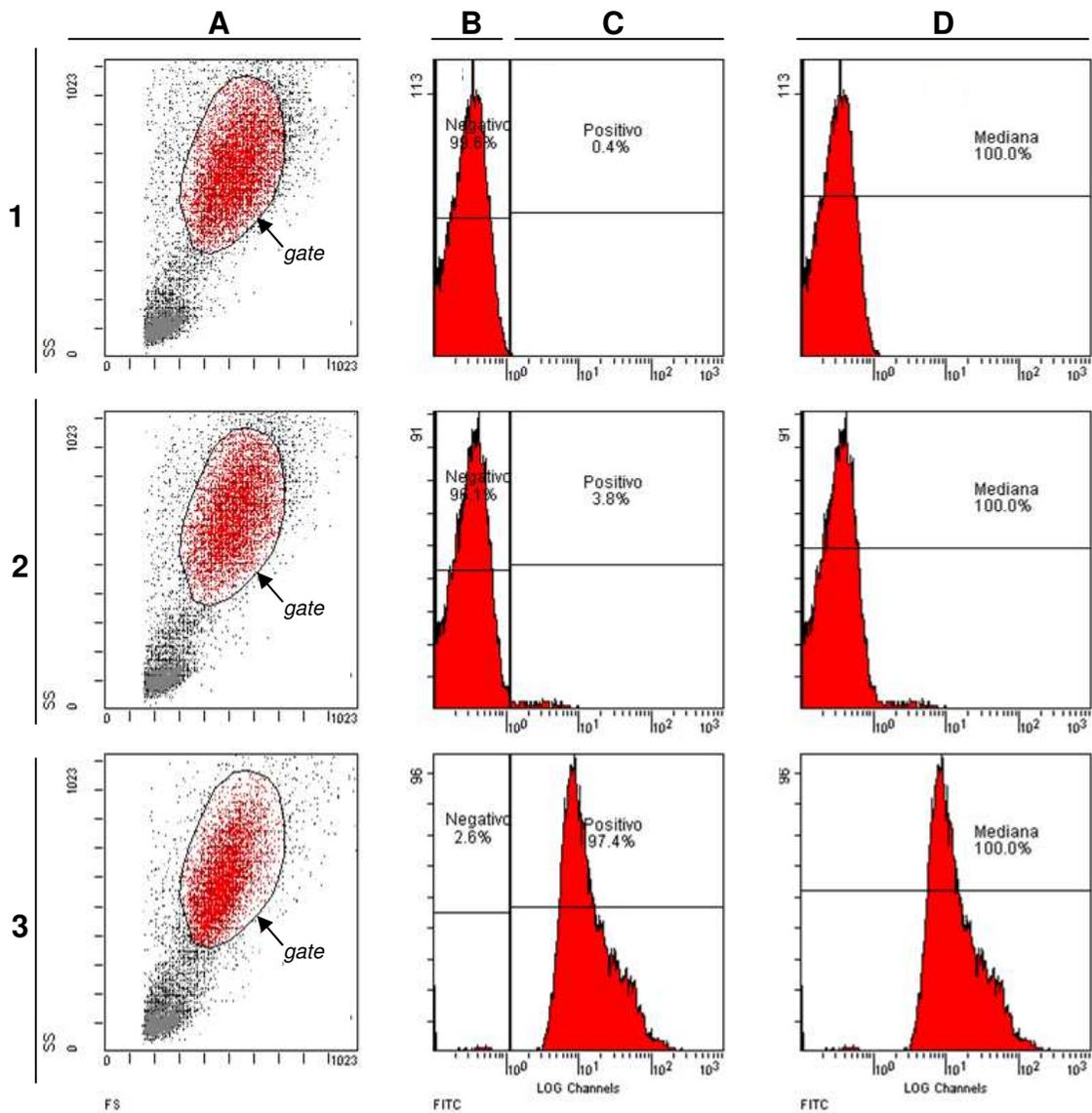


Figura 5: Análise, por citometria de fluxo, da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos, onde **1** é o branco, **2** é a produção basal de ROS (sem estímulo) e **3** é a amostra estimulada, com o máximo de produção de ROS suportado pela célula. **A** é o *gate* para a separação de granulócitos dos demais tipos celulares, **B** é a porção de células não fluorescentes, **C** é a porção de células fluorescentes e **D** representa a mediana de fluorescência.

4.5.5 Produção de Citocinas em sobrenadante de cultura

A análise da produção de citocinas foi realizada a partir de cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) o qual foi realizado a partir de 8 mL de sangue total periférico coletado em tubo heparinizado (Vacuette, Brasil), modificado do protocolo de Gaines, Andersson e Biberfeld (1996). A fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 7,5 µg/mL (Sigma, EUA), foi utilizada como controle positivo; o meio de cultura completo (meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), acrescido de 1% de glutamina (Sigma, EUA), 0,1% de gentamicina e 10% de soro AB humano (Sigma) inativado como controle negativo. A vacina de BCG Moreau Rio de Janeiro liofilizada, após reconstituída com meio RPMI 1640, foi usada na concentração ótima de 5×10^5 UFC/mL.

As CMSP foram isoladas por meio da centrifugação com um gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque 17-1440-02 (Amersham Biosciences, EUA), por 20 minutos a 1800rpm, com posterior lavagem e ressuspensão em meio de cultura completo RPMI.

As células, na concentração de 2×10^6 células/mL, foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nunc, Dinamarca) em incubadora a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ durante 48 horas. O sobrenadante de cultura foi armazenado a -80°C até a realização do ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Para as dosagens de Interferon gama (IFN-γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α), Interleucina 10 (IL-10), Interleucina 8 (IL-8), Interleucina 6 (IL-6) foram utilizados Kits comerciais (DuoSet, RD Systems, EUA). Os ensaios foram realizados em placas MultiSorp (Nunc, Dinamarca) segundo os protocolos do fabricante. Resumidamente, as placas foram incubadas com anticorpos de captura e, após bloqueio, submetidas à incubação com amostras e diluições do padrão recombinante do Kit. Em seguida, houve a incubação com anticorpos de detecção, conjugados a biotina. A incubação seguinte ocorre com uma solução de streptoavidina conjugada à peroxidase. A revelação da reação foi feita com peróxido de hidrogênio e tetrametil-benzidina (TMB) e a inibição ocorreu com a adição de H₂SO₄ 2N. A leitura foi realizada em 450nm. O limite de detecção de

IFN- γ e TNF- α foi de 15,6pg/mL, de IL-10 e IL-8 foi de 31,3pg/mL e de IL-6 foi de 9,4pg/mL.

Em todos os ensaios foi estabelecida uma curva padrão, com gráfico de dispersão, no qual a variável X foi a densidade óptica obtida nas leituras e Y, a concentração das citocinas. A equação da figura do gráfico foi adquirida por meio de uma linha de tendência polinomial, que só foi aceita se R^2 fosse maior que 0,95 no programa Microsoft Excel versão 2007 (Microsoft Corporation, EUA). Todas as amostras e pontos da curva padrão foram feitos em duplicata. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.5.6 Concentração de Fator- β de Transformação do Crescimento (TGF- β) no soro

Foi coletado aproximadamente 1,5mL de sangue periférico em tubo seco (Vacuette®, Brasil). O soro foi separado à 2800 rpm, por 7 minutos. Para a dosagem TGF- β foi utilizado o Kit comercial (DuoSet, RD Systems, EUA). Os ensaios foram realizados em placas MultiSorp (Nunc, Dinamarca) segundo os protocolos do fabricante. Sucintamente, as placas foram incubadas com anticorpos de captura e, após bloqueio. Antes de serem incubadas, as amostras sofreram ativação com HCL (1N), por 10min, e posterior neutralização com NaOH (1N) com Hepes. Após esta etapa as amostras foram incubadas com diluições do padrão recombinante do Kit. Em seguida, houve a incubação com anticorpos de detecção, conjugados a biotina. A incubação seguinte ocorreu com uma solução de streptoavidina conjugada à peroxidase. A revelação da reação foi feita com peróxido de hidrogênio e tetrametil-benzidina (TMB) e a inibição da reação ocorreu com a adição de H₂SO₄ 2N. A leitura foi realizada em 450nm. O limite de detecção de TGF- β 62,5pg/mL.

Em todos os ensaios foi estabelecida uma curva padrão, com gráfico de dispersão, no qual a variável X foi a densidade óptica obtida nas leituras e Y, a concentração da citocina. A equação da figura do gráfico foi adquirida por meio de uma linha de tendência polinomial, que só foi aceita se R^2 fosse maior que 0,95 no programa Microsoft Excel versão 2007 (Microsoft Corporation, EUA). Todas as

amostras e pontos da curva padrão foram feitos em duplicata. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$.

4.5.7 Imunoglobulinas séricas

A determinação da concentração sérica das imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM, IgE) foi realizada a partir da coleta de 4mL de sangue total periférico em tudo seco.

A separação do soro e a dosagem de imunoglobulinas por nefelometria foi realizada no Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas, UNICAMP.

4.5.8 IgA salivar

A coleta foi realizada com pipeta de plástico Pasteur estéril e descartável, coletando-se em torno de 1 mL de saliva. Os pacientes receberam orientações de não consumir alimentos ou beber (exceto água) uma hora antes da coleta, bem como, realizar higiene oral por meio de lavagem com água pura. Após a coleta, as alíquotas de saliva foram pipetadas em tubos eppendorfs, centrifugadas a 1G por 7min e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. Essa análise foi realizada no Laboratório Dr. Franceschi, Campinas-SP, por nefelometria, utilizando-se protocolo de alta sensibilidade.

4.6 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

A análise antropométrica, a avaliação dos parâmetros bioquímicos nutricionais e a avaliação da ingestão alimentar foram realizadas antes do início do ensaio (T0), depois de 2 meses (T1) e ao término de 4 meses (T2).

4.6.1 Antropometria

Para a avaliação antropométrica foram realizadas as seguintes medidas:

- **Peso e altura:** a pesagem foi efetuada em balança digital vertical (Personal Line®, Filizola, São Paulo, SP, Brasil), com aproximação de 0,1 kg. As crianças estavam vestindo roupas leves e sem sapatos. A altura foi obtida em estadiômetro de madeira, o qual possuía régua graduada em centímetros (aproximação de 0,1 cm). A técnica adotada para a coleta das medidas baseou-se nas recomendações propostas pelo *Anthropometric Standardization Reference Manual* (LOHMAN; ROCHE; MARTORELL, 1988).
- **Circunferência de braço:** foi obtido com fita métrica não extensível, milimetrada de acordo com o procedimento descrito por Lohman, Roche e Martorell (1988).
- **Prega cutânea tricipital:** foi medida com adipômetro de marca *Lange* (*Lange Skinfold Caliper, PAT NO. 3,008,239; Beta Technology Incorporated Cambridge, Maryland, USA*) conforme procedimento descrito por Lohman, Roche e Martorell (1988).

Com os dados do peso e altura foi calculado o índice de massa corporal (IMC) que é a relação entre o peso e o quadrado da altura (kg/m²) e com os dados de circunferência de braço (CB) e prega cutânea tricipital (PCT) foi calculado a circunferência muscular da braço (CMB) segundo a fórmula proposta por Frisancho (1990).

Para todos os indivíduos foram calculados os escores-Z para os índices antropométricos estatura/idade (E/I) e IMC/idade (IMC/I) utilizando como referência os dados propostos pela Organização mundial da saúde, sendo que para indivíduos menores de 5 anos utilizou-se a referência da WHO de 2006 e para os indivíduos maiores de 5 anos utilizou-se a referência da WHO de 2007. Os cálculos dos escores-Z foram realizados pelos programas WHOAntro, para menores de 5 anos e WHOAntroPLUS, para maiores ou igual a 5 anos.

A classificação do estado nutricional de acordo com os índices antropométricos, citados acima, foi realizada com base na classificação adotada pela WHO de 2006 e 2007.

Tabela 3: Pontos de corte, em escore-Z, para estatura para idade (E/I) de acordo com *World Health Organization* (WHO, 2006 e 2007)

Escore-Z	Diagnóstico Nutricional
< -3	Muito baixa estatura para a idade
≥ -3 e < -2	Baixa estatura para a idade
≥ -2	Estatura adequada para a idade

World Health Organization, 2006 e 2007

Tabela 4: Pontos de corte, em escore-Z, para índice de massa corporal para idade (IMC/I) para crianças menores 5 anos, de acordo com *World Health Organization* (WHO, 2006)

Escore-Z	Diagnóstico Nutricional
< -3	Magreza acentuada
≥ -3 e < -2	Magreza
≥ -2 e < +1	Eutrofia
≥ +1 e < +2	Sobrepeso
≥ +2 e +3	Obesidade
≥ +3	Obesidade grave

World Health Organization, 2006

Tabela 5: Pontos de corte, em escore-Z, para índice de massa corporal para idade (IMC/I) para crianças maiores de 5 anos, de acordo com *World Health Organization* (WHO, 2007)

Escore-Z	Diagnóstico Nutricional
< -3	Magreza acentuada
≥ -3 e < -2	Magreza
≥ -2 e < +1	Eutrofia
≥ +1 e < +2	Sobrepeso
≥ +2 e +3	Obesidade
≥ +3	Obesidade grave

World Health Organization, 2007

Foram calculados os percentis de CB e CMB de acordo com o proposto por Frisancho em 1990. A classificação destes índices antropométricos também foi realizada de acordo com o mesmo autor.

Tabela 6: Pontos de corte, em percentil, para circunferência de braço (CB) e para circunferência muscular de braço (CMB), segundo Frisancho, 1990

	Percentil	Diagnóstico Nutricional
CB	< 5	Risco de doenças e distúrbios associados à desnutrição
	> 95	Risco de doenças relacionadas ao excesso de peso
CMB	< 5	Risco de doenças e distúrbios associados à desnutrição

Frisancho, 1990

4.6.2 Parâmetros bioquímicos: Albumina e pré-albumina

As determinações das concentrações séricas de albumina e de pré-albumina foram realizadas a partir da coleta de 4mL de sangue periférico em tudo seco.

A separação do soro e as dosagens de albumina e de pré-albumina por nefelometria foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas, UNICAMP.

4.6.3 Avaliação da ingestão alimentar

A ingestão energético-protéica dos participantes, foi calculada com base no recordatório alimentar de 24horas e no registro alimentar de três dias (dois dias habituais e um dia de fim de semana).

Os recordatórios alimentares de 24horas foram realizados a cada consulta (T0, T1 e T2), sendo que a quantificação da ingestão alimentar em medidas caseiras foi realizada pelo paciente juntamente com seu responsável. Quanto aos registros alimentares de três dias, ao todo foram entregues dois aos pacientes, sendo que o primeiro deveria ser preenchido no intervalo entre T0 e T1 e o segundo entre T1 e T2. Dessa forma, pôde-se ter uma avaliação bem fidedigna da

alimentação dos pacientes. Cabe ressaltar que a cada consulta o paciente e seu responsável, eram treinados para fazer o registro alimentar.

Os cálculos nutricionais foram realizados com o auxílio do programa AVANUTRI. A adequação da ingestão alimentar foi avaliada com base nas DRI's de 1997, 2000 e 2002, considerando o aumento proposto pelo Consenso Europeu de FC (SINAASAPPEL *et al.*, 2002):

- As NEDs foram calculadas de acordo com idade e gênero (DRI, 2006). Como as NEDs de indivíduos fibrocísticos estão aumentadas entre 120 e 150%, assim, calculou-se o intervalo de adequação das NED. Quanto aos macronutrientes, foi calculado o percentual de distribuição na dieta (DRI, 2002).
- Em relação a ingestão de fibras, calculou-se o percentual (%) de adequação de acordo com o proposto pela DRI (2002).
- Para a avaliação da ingestão de minerais, entraram para o estudo apenas os citados como importantes pelo Consenso Europeu ou que possuem ação antioxidante, sendo avaliados Ca, Fe, Zn, Se. O cálculo do % de adequação, para cada elemento, foi feito com base nas DRI's (1997, 2002, 2000).
- Em relação a ingestão de vitaminas (A,D,E) calculou-se o percentual (%) de adequação, para cada vitamina, em relação as DRI's (2002, 1997 e 2000) e o percentual (%) de adequação em relação ao intervalo proposto pelo Consenso Europeu (SINAASAPPEL *et al.*, 2002).

4.7 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

4.7.1 Cultura Rotina Diagnóstico no Escarro

A coleta do escarro foi realizada no serviço de fisioterapia do Ambulatório de Pediatria do HC da UNICAMP. As amostras de escarro foram obtidas após a higienização da boca e coletadas em frasco seco, estéril e com tampa de rosca. Após a coleta, as amostras foram refrigeradas até o seu processamento no

Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas, UNICAMP.

Antes da semeadura, foi realizada uma triagem por meio da bacterioscopia do material, onde as amostras aceitas foram as que o número de células epiteliais estiveram inferior à 10 e o número de polimorfonucleares estiveram superior a 25, em aumento de 100x. Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, foi semeada uma alçada (10 µl), por método semi-quantitativo (técnica do esgotamento), nos meios de cultura Ágar Sangue (AS), Ágar Chocolate (ACHOC), Ágar MacConkey (AMC), *Burkholderia Cepacia Selective Agar* (BCSA) e Ágar Manitol (AMAN). As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, com CO_2 (AS e ACHOC) e sem CO_2 (AMC, AMAN e BCSA), por um período de 24 – 72 horas, com avaliação do crescimento microbiano a cada 24 horas. Quando não houve crescimento bacteriano neste período, as placas de BCSA e MC foram mantidas em estufa bacteriológica por até 7 dias.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa apresentou operações independentes que possuíam relevância do ponto de vista ético. Para os pacientes com FC: ingestão diária do suplemento por um período de 4 meses; coleta de sangue, avaliação microbiológica e avaliação do estado nutricional, com intervalo de 2 meses, sendo ao final 3 coletas. Para as crianças do grupo controle saudável: uma coleta de sangue e saliva.

Assim, os pais ou representantes legais das crianças foram informados sobre os objetivos e os métodos empregados. Uma vez cientes da natureza dos procedimentos e desconfortos aos quais as crianças seriam submetidas, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação, foi solicitado que os responsáveis assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado (nº538/2008) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, Campinas, SP (ANEXO 2) e obedeceu às recomendações para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos, propostas pela Resolução no 196 de 10

de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde. Cabe ressaltar que foram enviados dois adendos ao comitê de ética, um em novembro de 2008 e outro em março de 2010, sendo que ambos receberam parecer favorável (ANEXOS 3 e 4).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados e analisados com o programa *SPSS® for Windows, version 7.5.1.* (SPSS Inc., 1989 – 1996, EUA). Descritos em termos de média, desvio-padrão, mediana, mínimo, máximo, frequências absolutas (n) e relativas (%). Posteriormente os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk.

Os normais ou paramétricos foram testados pelo teste-T para avaliar se havia diferença estatística entre os suplementos no T0 ou T1 ou T2, ou seja, amostras independentes. O teste-T também foi utilizado para ver se havia diferença nos dados paramétricos para a comparação entre grupo controle saudável e grupo de fibrocísticos. O teste ANOVA para amostras pareadas foi utilizado para ver se havia diferença estatística no suplemento ao longo dos tempos, ou seja, amostras dependentes.

Os não paramétricos foram testados de acordo com Mann-Whitney, para amostras independentes e o teste de Friedman foi utilizado para amostras dependentes. O teste de Mann-Whitney também foi utilizado para ver se havia diferença nos dados não paramétricos para a comparação entre grupo controle saudável e grupo de fibrocísticos

Foi utilizado o teste de comparações múltiplas para os que apresentaram diferença estatística pelo teste de Friedman, a fim de verificar onde ocorreu a diferença nos tempos.

O nível de significância assumido foi para $p < 0,05$.

As figuras foram feitas no Software *GraphPad Prism, version 4.0* (GraphPad Software, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUPLEMENTO

As tabelas 7 e 8 mostram a composição físico-química e o perfil aminoacídico do suplemento teste e do placebo.

Tabela 7: Composição centesimal da caseína utilizada como placebo e do Concentrado protéico de soro de leite-TGF β (WPC-TGF β), suplemento teste.

Componentes	Caseína – Placebo (%)	WPC-TGFβ (%)
Proteína (N x F) ^a	81,2	68,3
Proteína (base seca)	91,16	72,88
Lipídios	1,61	12,48
Cinza	1,75	3,84
Umidade	10,89	6,29
Carboidrato ^b	4,5	9,09

a: F = 6,38 para caseína e WPC; b: Calculado por diferença = 100 – (proteínas+lípido+cinza+umidade)

Tabela 8: Aminograma das fontes protéicas caseína, utilizada como placebo e concentrado protéico de soro de leite-TGF β (WPC-TGF β), suplemento teste.

Aminoácidos	<i>g/100g de Proteína (base seca)</i>	
	Caseína	WPC-TGFβ
Ácido aspártico	6,25	10,16
Ácido glutâmico	19,88	16,95
Serina	5,12	5,18
Glicina	1,73	2
Histidina	2,68	1,79
Arginina	1,72	1,44
Treonina	3,79	6,22
Alanina	2,75	5
Prolina	9,96	5,9
Tirosina	5,3	3,19
Valina	5,8	5,64
Metionina	2,63	3,1
Cisteína	1,4	2,01
Isoleucina	4,97	6,49
Leucina	8,52	10,16
Fenilalanina	4,98	3,63
Lisina	7,31	9,32

O WPC-TGF β apresentou um teor protéico menor que o da caseína, por outro lado, os teores de lipídios, carboidratos e cinza estiveram mais elevados. Quanto ao teor aminoacídico, as proteínas do soro de leite diferem das caseínas por apresentarem teores mais elevados dos aminoácidos indispensáveis treonina, isoleucina, leucina lisina e metionina, além disso, o WPC é melhor fonte de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína), de alanina e ácido aspártico. As proteínas do soro também apresentam teores mais baixos dos aminoácidos de cadeia aromática (fenilalanina e tirosina).

Em relação às análises microbiológicas em todos os parâmetros o suplemento atendeu à legislação vigente. Em ANEXO 5 seguem os laudos.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

A tabela 9 apresenta as características dos grupos (placebo e WPC-TGF β) de pacientes fibrocísticos antes de iniciarem a suplementação.

Tabela 9: Caracterização dos pacientes antes de iniciarem a suplementação

	Grupo Caseína (n= 24)	Grupo WPC-TGFβ2 (n=21)
Característica		
Idade (meses)	101,47 \pm 44,36 ^a	100,9 \pm 32,83 ^a
Gênero (Feminino / Masculino)	11 / 13 ^b	12 / 9 ^b
Escore de Shuwachman	75 (40 – 85) ^c	80 (60 – 85) ^c
Doença associada		
Insuficiência pancreática	23 ^b	21 ^b
Hepatopatia	7	10
Diabetes	0	3
Estudo genético (mutação)		
Δ F508 homozigoto	7 ^b	7 ^b
Δ F508 heterozigoto / R1162X	1	1
Δ F508 heterozigoto / N1303K	0	1
Δ F508 heterozigoto / G542X	0	1
Δ F508 heterozigoto/Desconhecido	12	11
Desconhecido	4	0

a: Dado paramétrico: Média \pm Desvio padrão, b: Frequência, c: Dado não paramétrico: Mediana (mínimo – máximo)

Houve grande homogeneidade entre os grupos, tanto quanto às características gerais (Idade, gênero e escore clínico) como em relação à presença de doenças inerentes da FC e estudo genético. A maioria dos pacientes apresentou insuficiência pancreática, característica própria da doença. A presença de hepatopatia foi baixa, sendo um dado extremamente relevante uma vez que a função hepática está relacionada à produção de glutathione. O estudo genético está relacionado com a gravidade da doença, dessa forma no grupo avaliado houve predominância das duas classes de mutação associadas às formas mais graves da doença, classes I e II.

Cabe ressaltar, que não foi incluída a frequência da doença pulmonar, uma vez que todos os pacientes, em maior ou menor grau, possuem inflamação, obstrução e infecção respiratória.

5.3 AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA

5.3.1 Hemograma

A mediana dos valores de leucócitos e de eritrócitos para os grupos de fibrocísticos e de controles saudáveis estão expressos nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10: Glóbulos brancos (WBC) nos pacientes com fibrose cística e no grupo de indivíduos saudáveis

Parâmetro Hematológico		Mediana (Mínimo – Máximo)	p^a
WBC (x10 ³ /mm ³)	Pacientes com FC	9,91 (5,45-22,38)	0,000***
	Controles Saudáveis	6,39 (1,79-8,66)	
LINFO (x10 ³ /mm ³)	Pacientes com FC	3,89 (2,27-6,67)	0,006**
	Controles Saudáveis	2,79 (1,92-4,99)	
MONO (x10 ³ /mm ³)	Pacientes com FC	0,65 (0,11-3,44)	0,003**
	Controles Saudáveis	0,42 (0,24-0,91)	
NEU (x10 ³ /mm ³)	Pacientes com FC	4,82 (2,18-11,28)	0,001**
	Controles Saudáveis	3,13 (1,44-5,06)	

a: Teste de Mann-Whitney; *Diferença estatística: p≤0,05; **Diferença estatística: p<0,01; ***Diferença estatística: p<0,001; WBC: leucócitos; LINFO: Linfócitos; MONO: Monócitos; NEU: Neutrófilos.

A concentração de todos os leucócitos foi maior estatisticamente para o grupo dos pacientes com fibrose cística.

Tabela 11: Eritrócitos (RBC) nos pacientes com fibrose cística e no grupo de indivíduos saudáveis

Parâmetro Hematológico		Mediana (Mínimo – Máximo)	p^a
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	Pacientes com FC	4,91 (4,18-5,74)	0,087
	Controles Saudáveis	4,82 (4,17-5,24)	
HCT (%)	Pacientes com FC	39,5 (34,1-45,3)	0,366
	Controles Saudáveis	40,55 (34,1-45)	
HGB (g/dL)	Pacientes com FC	13,05 (11,4-15,2)	0,503
	Controles Saudáveis	13,35 (11,1-14,8)	
MCH (pg)	Pacientes com FC	27,1 (20,8-29,9)	0,011*
	Controles Saudáveis	28,4 (24,2-30,7)	
MCHC (g/dL)	Pacientes com FC	33,4 (29,7-35,3)	0,375
	Controles Saudáveis	33 (30,5-34,5)	
MCV (fL)	Pacientes com FC	80,75 (69-88,1)	0***
	Controles Saudáveis	85,1 (79,2-89,7)	

a: Teste de Mann-Whitney; *Diferença estatística: p≤0,05; ***Diferença estatística: p<0,001; RBC: Eritrócitos; HCT: Hematócrito; HGB: Concentração de Hemoglobina; MCH: Volume corpuscular médio de hemoglobina; MCHC: Concentração corpuscular média de hemoglobina; MCV: Volume corpuscular médio.

A população de eritrócitos variou muito pouco entre os pacientes com FC e os indivíduos saudáveis, porém, tanto MCH quanto o MCV, foram menores estatisticamente para os fibrocísticos.

Os valores medianos das populações de eritrócitos e de leucócitos dos pacientes , ao longo da suplementação estão apresentados nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12: Eritrócitos (RBC) nos grupos placebo e WPC-TGF β em relação ao tempo (T0, T1, T2)

Parâmetro hematológico		T0	T1	T2	p ^b
		Mediana (Mínimo – Máximo)			
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	Caseína	4,97 (4,18 – 5,74)	4,99 (4,38 – 6,44)	5,08 (3,95 – 5,83)	0,913
	WPC	4,85 (4,35 – 5,46)	5,14 (4,75 – 5,77)	5 (4,49 – 5,38)	0,016*
HCT (%)	Caseína	39,6 (34,1 – 35,3)	38,85 (35,3 – 52,4)	40,75 (33,8 – 46,4)	0,401
	WPC	39,4 (34,2 – 42,8)	41,55 (35,8 – 44,9)	41,4 (34,4 – 47,1)	0,05*
HGB (g/dL)	Caseína	13,05 (11,3 – 15,2)	12,9 (11,7 – 17,4)	13,4 (10,4 – 14,8)	0,472
	WPC	13,05 (11,9 – 14,7)	14,15 (12,1 – 14,7)	13,5 (11,6 – 15,5)	0,009**
MCH (pg)	Caseína	26,56 (20,8 – 29,3)	26,3 (21,4 – 28,6)	26,25 (20,8 – 29,2)	0,758
	WPC	27,3 (22,9 – 29,9)	27,6 (23,2 – 29)	28 (23 – 28,9)	0,383
MCHC (g/dL)	Caseína	33,2 (29,7 – 35,3)	33,2 (29,1 – 35)	32,35 (28,7 – 33,9)	0,114
	WPC	33,5 (30,9 – 35,1)	33,7 (29,5 – 35,5)	32,9 (30,8 – 34,6)	0,021*
MCV (fL)	Caseína	79,6 (69 – 87,6)	79 (64,5 – 87)	80,6 (69,8 – 89,2)	0,338
	WPC	81,65 (69,6 – 88,1)	81,95 (70,6 – 86,1)	84,5 (72,1 – 90)	0,106

^b : teste de Friedman; *Diferença estatística: p \leq 0,05; **Diferença estatística: p $<$ 0,01; RBC: Eritrócitos; HCT: Hematócrito; HGB: Concentração de Hemoglobina; MCH: Volume corpuscular médio de hemoglobina; MCHC: Concentração corpuscular média de hemoglobina; MCV: Volume corpuscular médio.

A administração WPC-TGF β aumentou estatisticamente a população de eritrócitos totais e de hemoglobina, houve também, variação estatística para concentração corpuscular média de hemoglobina. Nos demais parâmetros não houve mudança estatística.

Tabela 13: Glóbulos brancos (WBC) nos grupos placebo e WPC-TGF β em relação ao tempo (T0, T1, T2)

Parâmetro Hematológico		T0	T1	T2	p ^b
		Mediana (Mínimo – Máximo)			
WBC (x10 ³ /mm ³)	Caseína	9,23 (5,45 – 21,52)	9,25 (7,18 – 22,11)	9,82 (6,73 – 18,37)	0,307
	WPC	10,43 (0,71 – 22,38)	9,91 (7,92 – 23,25)	9,39 (6,63 – 19,71)	0,368
LINFO (x10 ³ /mm ³)	Caseína	3,87 (2,27 – 6,67)	3,71 (2,33 – 6,2)	3,85 (1,93 – 6,91)	0,558
	WPC	3,89 (2,35 – 6,22)	3,79 (1,42 – 9,99)	3,71 (1,46 – 6,34)	0,558
MONO (x10 ³ /mm ³)	Caseína	0,66 (0,11 – 3,44)	0,68 (0,34 – 1,54)	0,75 (0,29 – 2,02)	0,338
	WPC	0,65 (0,2 – 1,15)	0,67 (0,53 – 1,16)	0,59 (0,42 – 1,45)	0,558
NEU (x10 ³ /mm ³)	Caseína	4,82 (2,18 – 10,64)	5,18 (3,19 – 11,93)	5,28 (2,62 – 10,2)	0,92
	WPC	4,86 (2,44 – 11,28)	4,86 (3,82 – 10,46)	4,59 (2,17 – 11,74)	0,368

b: Teste de Friedman; WBC: leucócitos; LINFO: Linfócitos; MONO: Monócitos; NEU: Neutrófilos.

A suplementação não interferiu estatisticamente, nos leucócitos.

5.3.2 Glutaciona eritrocitária

A figura 6 apresenta a comparação entre a concentração média de GSH nos eritrócitos, de indivíduos saudáveis e de pacientes com FC. A figura 7 mostra

a evolução da concentração média de GSH nos eritrócitos ao longo da suplementação.

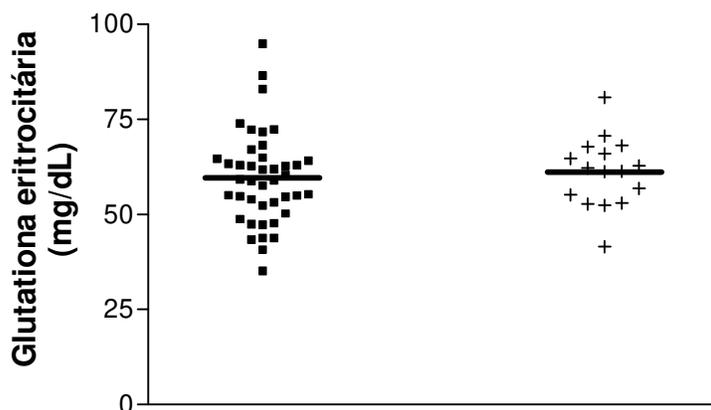


Figura 6: Concentração de glutathiona nos eritrócitos (mg/dL) de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p>0,05$, portanto sem diferença estatística.

A GSH nos eritrócitos não diferiu estatisticamente entre o grupo de indivíduos saudáveis e dos pacientes fibrocísticos.

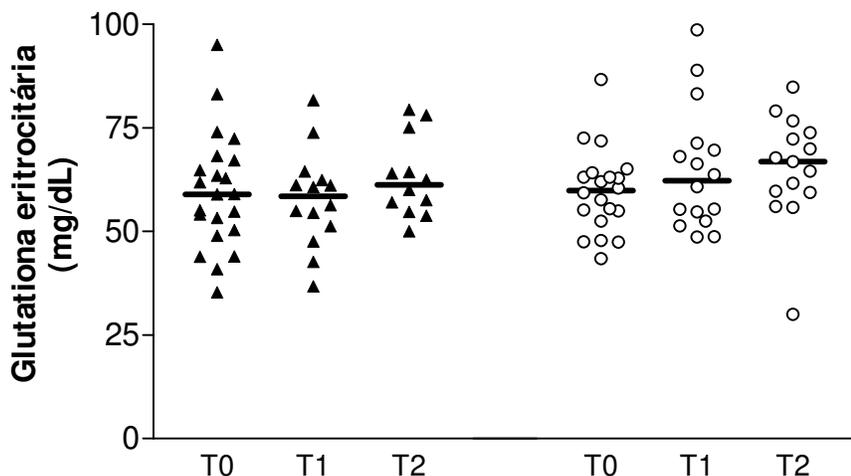


Figura 7: Concentração de glutathiona nos eritrócitos (mg/dL) de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplementos de caseína (▲) e WPC-TGFβ2 (○). $p>0,05$, portanto sem diferença estatística.

A concentração média de GSH entre os grupos de fibrocísticos ao longo da suplementação, verificou-se que não houve diferença estatística antes da suplementação, sendo de $56,63 \pm 14$ para o placebo e de $59,65 \pm 10,13$ para WPC-TGF β . Apesar de observar-se um discreto aumento gradual na média da GSH do grupo que ingeriu o WPC-TGF β , não houve diferença estatística, nos tempos considerados.

5.3.3 Liberação de Radicais Intermediários do Oxigênio pelos Granulócitos

A produção basal de ROS (C2: vide figura 5) e a capacidade máxima de produção de ROS (razão entre D3 e D2: vide figura 5) de pacientes com FC comparado à indivíduos saudáveis estão apresentadas nas figuras 8 e 9.

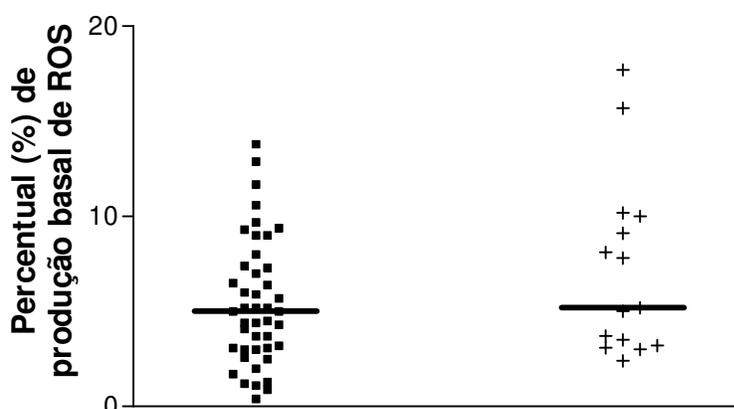


Figura 8: Percentual basal de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

Não houve diferença estatística entre os grupos na a produção celular basal para a produção de ROS.

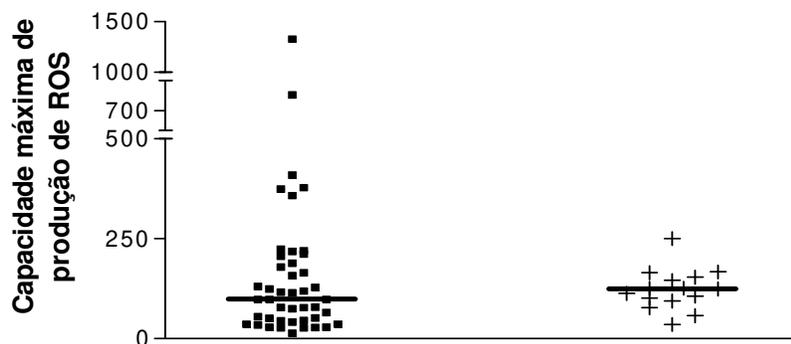


Figura 9: Capacidade máxima de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p > 0,05$, sem diferença estatística.

Também não houve diferença estatística na capacidade máxima de produção de ROS pelos granulócitos.

As figuras 10 e 11 apresentam a evolução dos pacientes fibrocísticos, ao longo da suplementação, em relação a produção basal de ROS dos granulócitos (C2: vide figura 5) e a capacidade de produção de ROS (razão entre D3 e D2: vide figura 5).

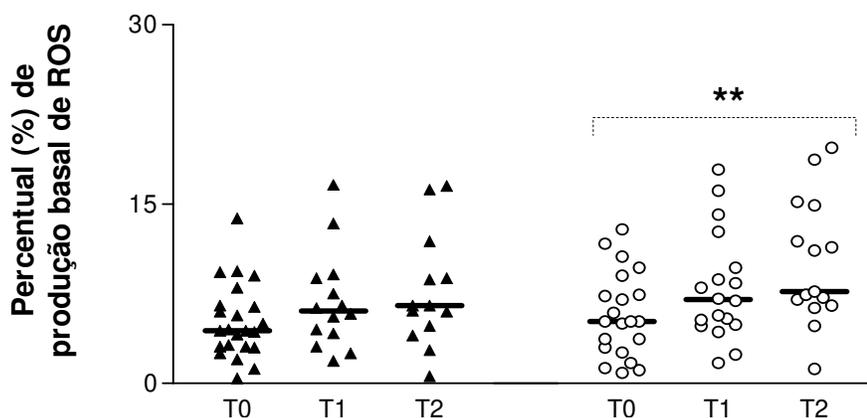


Figura 10: Percentual basal de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos em pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplementos de caseína (▲) e WPC-TGF β 2 (○). Diferença estatística entre os tempos do WPC-TGF β 2 (**: $p < 0,01$) pelo teste de Friedman. Pelo teste de comparações múltiplas diferença entre T0-T1, T1-T2, T0-T2.

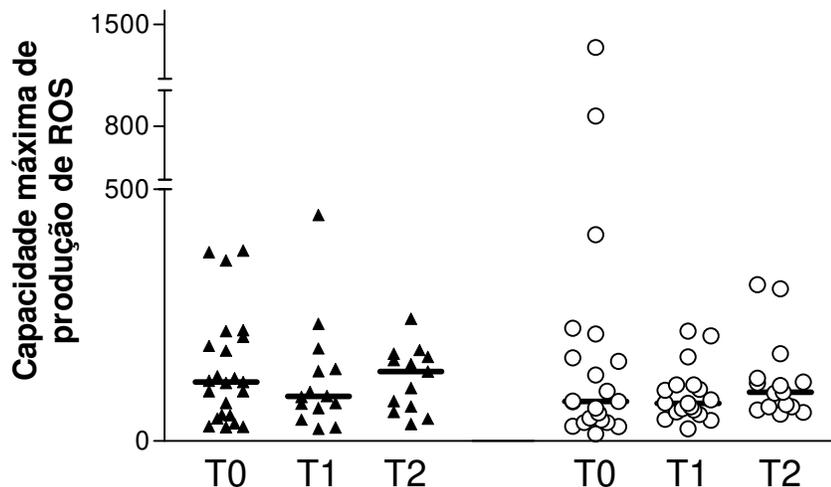


Figura 11: Capacidade máxima de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos em pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplementos de caseína (▲) e WPC-TGFβ2 (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

Os testes estatísticos mostraram que antes de iniciar a suplementação (T0) não havia diferença entre os grupos (placebo e WPC-TGFβ), tanto em relação à produção basal quanto para capacidade máxima de produção de ROS (figura 10 e 11).

O percentual basal de células produtoras de ROS sofreu mudança estatística, com aumento gradual, ao longo dos tempos para o grupo que ingeriu o WPC-TGFβ.

Quanto à produção de ROS, medida pela capacidade máxima de produção, não houve mudança estatística entre os grupos ao longo da suplementação.

5.3.4 Produção de Citocinas em sobrenadante de cultura

As figuras 12, 13 14 e 15 elucidam a resposta celular espontânea e frente à presença de antígeno (BCG) e mitógeno (PHA). Foram avaliadas a produção de TNF-α, IFN-γ, IL-8, IL-6 e IL-10 de pacientes com FC comparado à produção de indivíduos saudáveis.

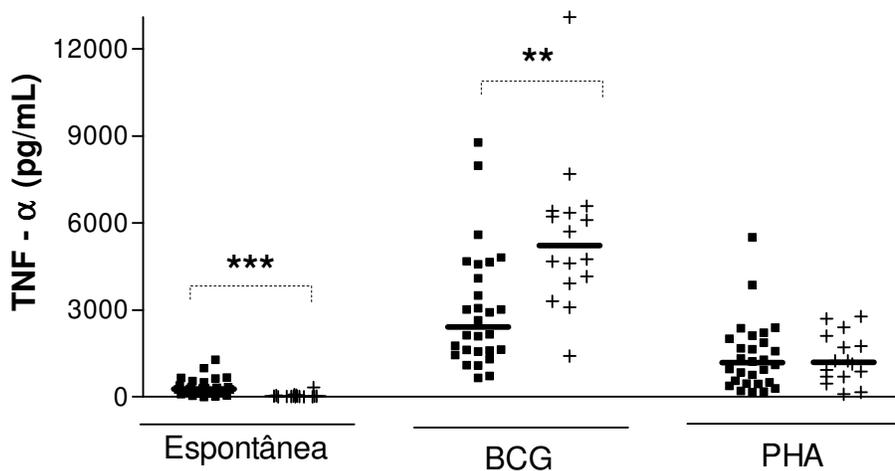


Figura 12: Concentração de TNF- α (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). Pelo teste de Mann-Whitney, diferença estatística para a cultura não estimulada (***: $p < 0,001$) e diferença para a estimulada por BCG (**: $p < 0,01$). Para PHA, $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

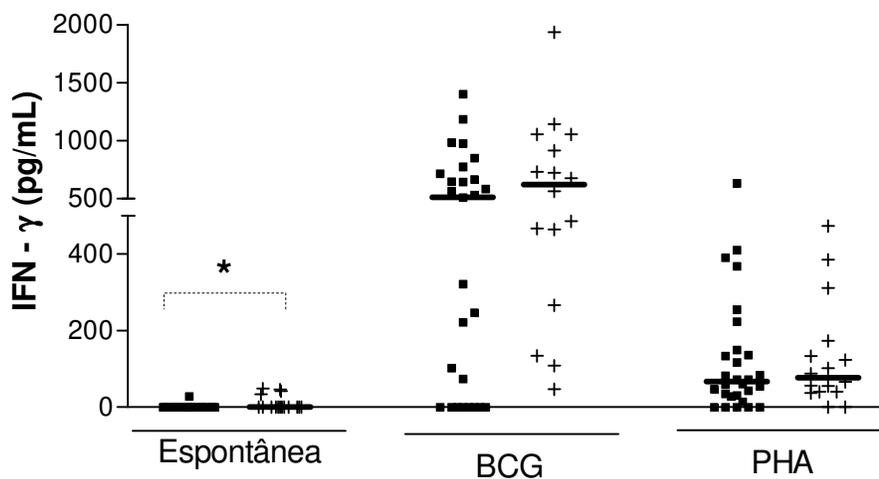


Figura 13: Concentração de INF- γ (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). Pelo teste de Mann-Whitney, diferença estatística para a condição espontânea (*: $p < 0,05$), para as demais condições sem diferença estatística.

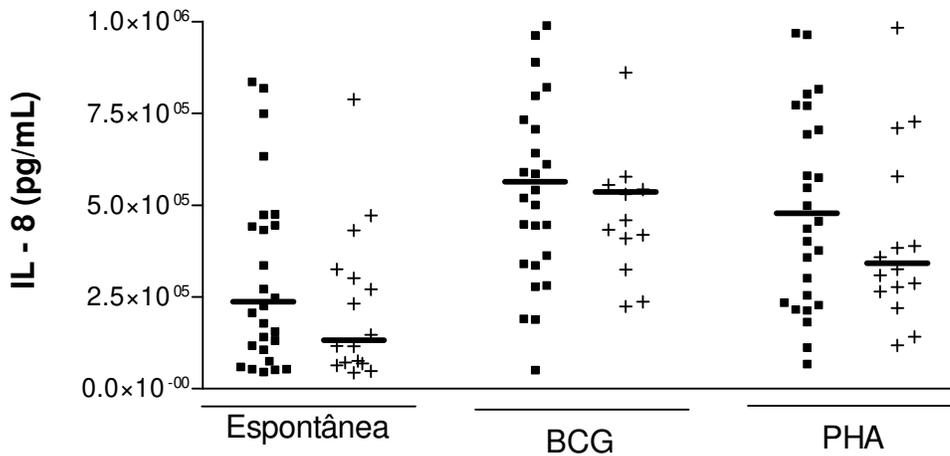


Figura 14: Concentração de IL-8 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (✚). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

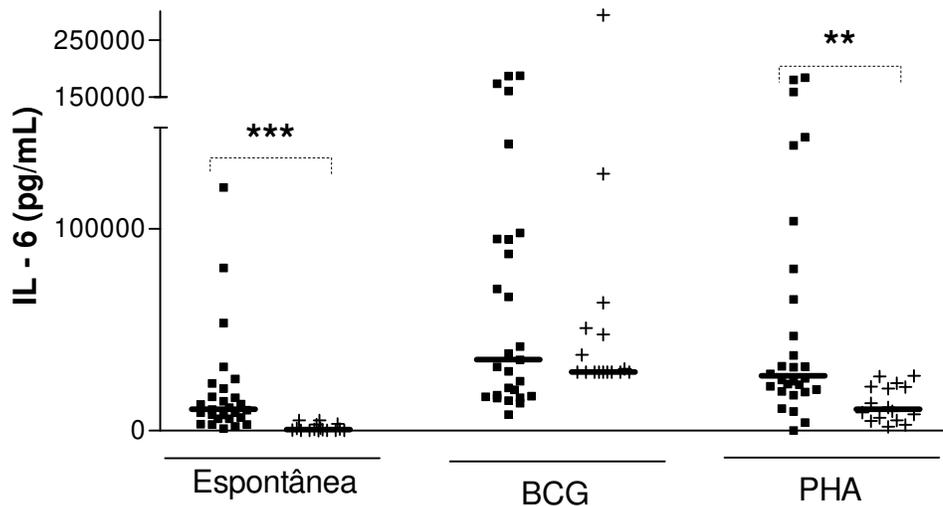


Figura 15: Concentração de IL-6 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (✚). Pelo teste de Mann-Whitney, diferença estatística, para as condições: espontânea (***: $p < 0,001$) e PHA (**: $p < 0,01$), para BCG $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

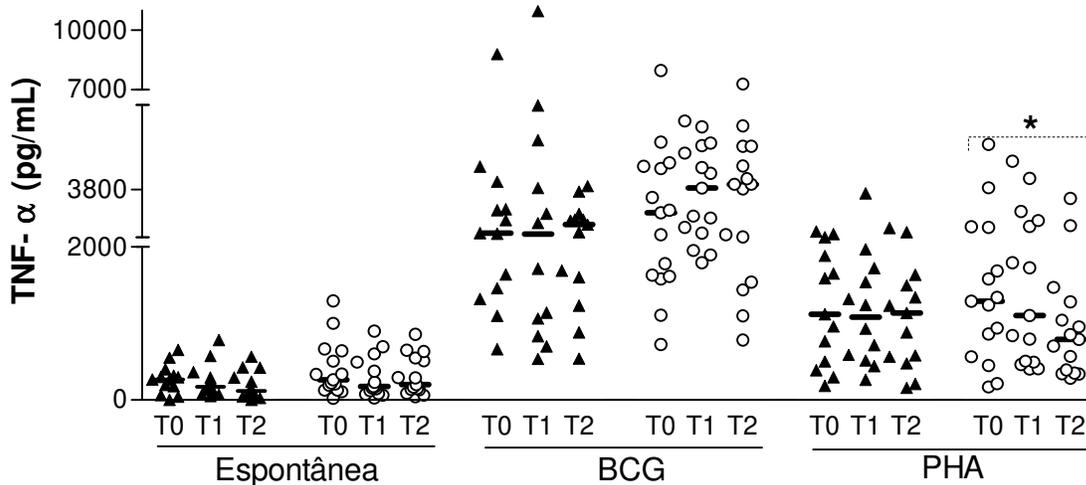


Figura 17: Concentração de TNF- α (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGF β (○). Diferença (*) entre os tempos do WPC-TGF β na condição PHA pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).

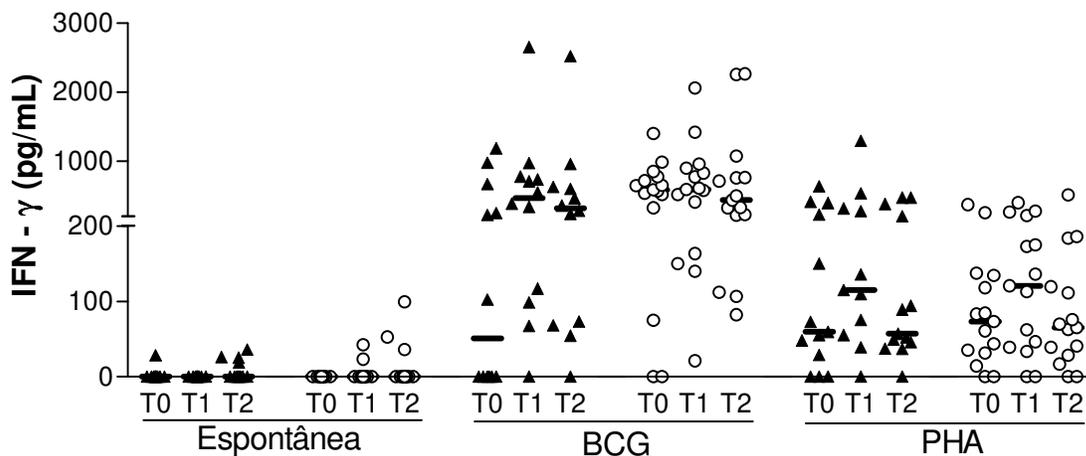


Figura 18: Concentração de IFN- γ (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGF β (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

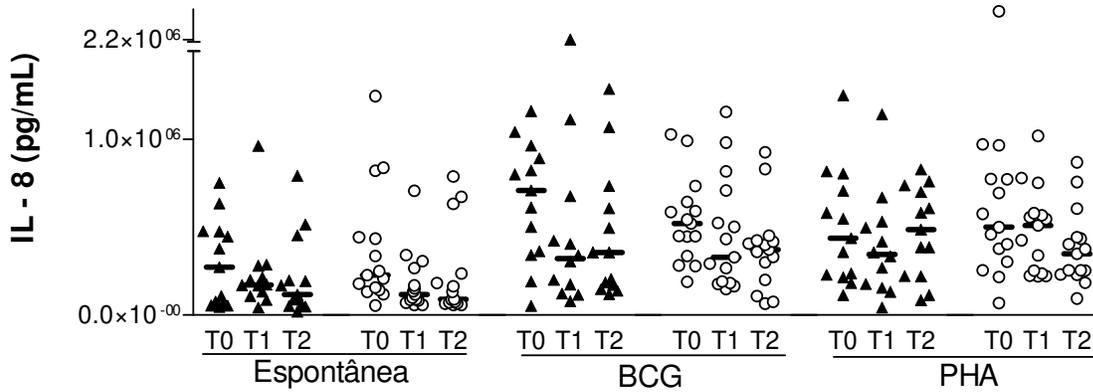


Figura 19: Concentração de IL-8 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

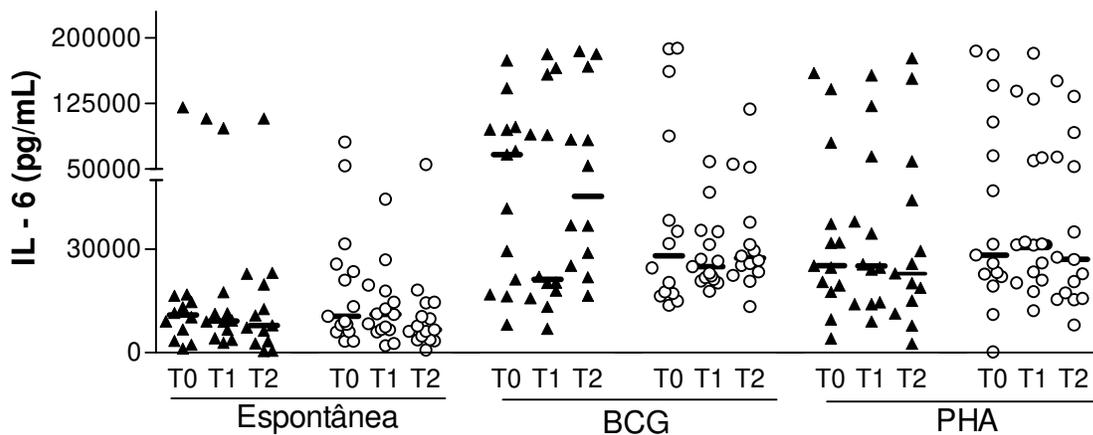


Figura 20: Concentração de IL-6 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

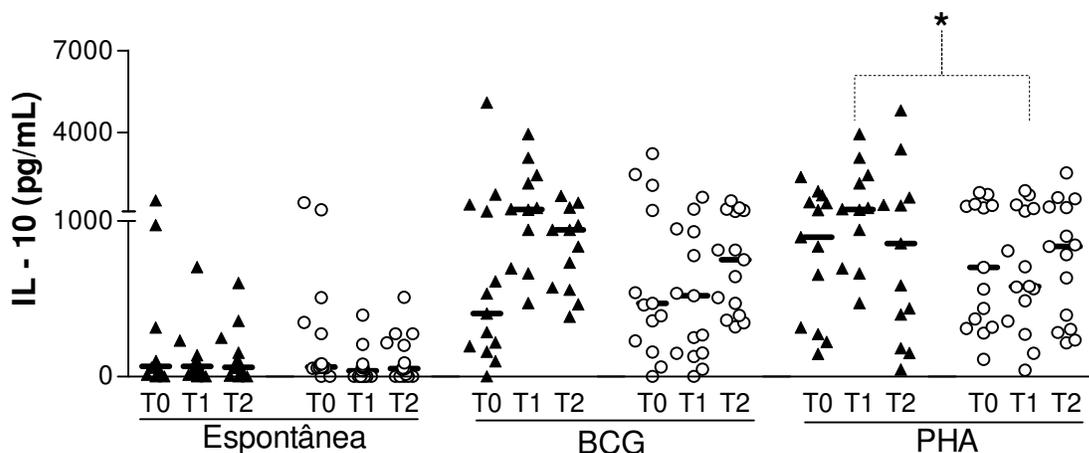


Figura 21: Concentração de IL-10 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de CMSP não estimuladas (espontânea), estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), por 48 horas, de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). Diferença estatística (*) entre os suplementos no T1 da condição PHA pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Antes de iniciar a suplementação não foram observadas diferenças entre os grupos nas concentrações de TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8 e IL-10 nos sobrenadantes de culturas das CMSP não estimuladas, estimuladas por BCG ou PHA. Porém após o início da suplementação o grupo que ingeriu WPC-TGF β mostrou diferença estatística, com gradual redução ao longo dos tempos, na mediana da concentração de TNF- α nos sobrenadantes de cultura estimulados por PHA, sendo que no T0 a mediana foi de 1242,8 pg/mL (170,9 a 5516,79), no T1 de 1106,6 pg/mL (403,5 a 4877,41) e no T2 de 791,4 pg/mL (285,88 a 3465,68). Nas demais condições de TNF- α (espontânea e BCG) não ocorreram mudanças significativas. Para IFN- γ , IL-8 e IL-6 não foram observadas mudanças significativas, entre os grupos e entre os tempos.

A mediana da concentração de IL-10 no sobrenadante estimulado por PHA, foi estatisticamente diferente entre os suplementos no T1, sendo menor no grupo que ingeriu WPC-TGF β em que a mediana da concentração no T1 foi de 580,2 pg/mL (40,77 a 1869,2), enquanto que para o grupo placebo foi de 1175,84 pg/mL (471,6 a 3939).

5.3.5 Concentração de Fator-β2 de Transformação de Crescimento (TGF-β2) no soro

As figuras 22 e 23 apresentam as concentrações de TGF-β2 no soro de pacientes com FC e de indivíduos saudáveis, bem como as concentrações desta citocina ao longo da suplementação com a proteína teste e o placebo.

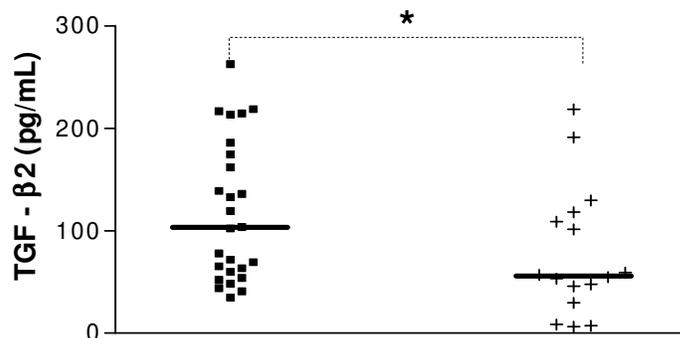


Figura 22: Concentração de TGF- β2 (pg/mL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p < 0,05$, portanto com diferença estatística (*), pelo teste de Mann-Whitney.

A concentração de TGF- β2 no soro do grupo de fibrocístico foi maior estatisticamente que para grupo de crianças saudáveis sendo que a mediana foi de 103,39 pg/mL e 56,02 pg/mL, respectivamente

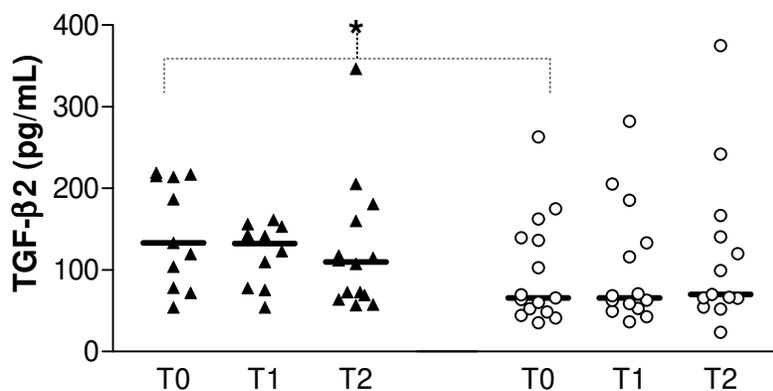


Figura 23: Concentração de TGF-β2 (pg/mL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento Caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). Diferença estatística (*) entre os suplementos no T0 pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

A mediana da concentração de TGF- β 2 no soro, foi estatisticamente diferente no T0 dos suplementos, sendo maior no grupo placebo. Ao longo dos tempos a concentração de TGF- β 2 no grupo placebo passou a não ser mais estatisticamente diferente do grupo teste. A concentração no grupo teste manteve-se estável nos três tempos. A mediana da concentração de TGF- β 2 no T0 foi de 133,2pg/mL (54,18 a 219,08) para o grupo caseína e de 65,59pg/mL (35,09 a 262,81) para o grupo WPC-TGF β .

5.3.6 Imunoglobulinas séricas

As concentrações medianas das imunoglobulinas séricas (IgA, IgG, IgM e IgE) encontram-se nas figuras 24, 25, 26 e 27.

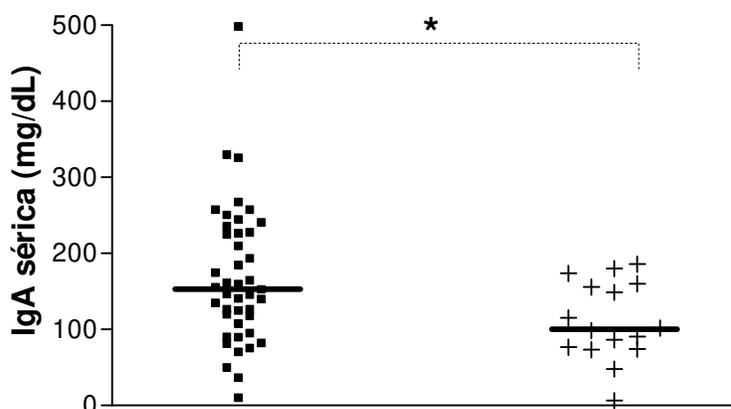


Figura 24: Concentração de IgA (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p < 0,05$, portanto com diferença estatística (*).

Pelo teste de Mann-Whitney a mediana da concentração de IgA foi maior estatisticamente para o grupo de pacientes com FC (153mg/dL), comparado à indivíduos saudáveis (100,3mg/dL).

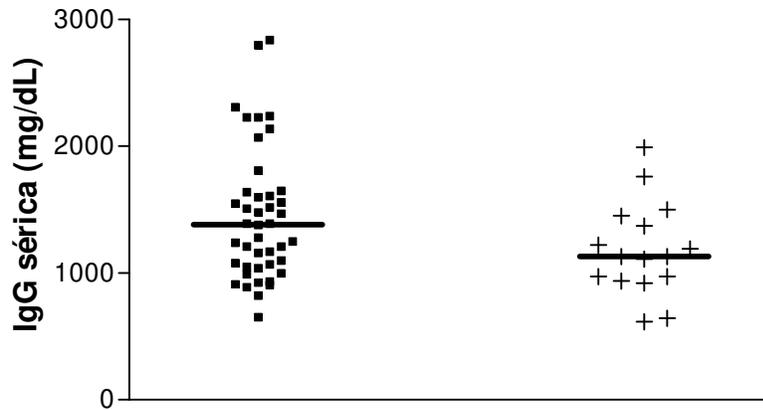


Figura 25: Concentração de IgG (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

A concentração mediana de IgG não diferiu estatisticamente entre os pacientes com FC e crianças saudáveis.

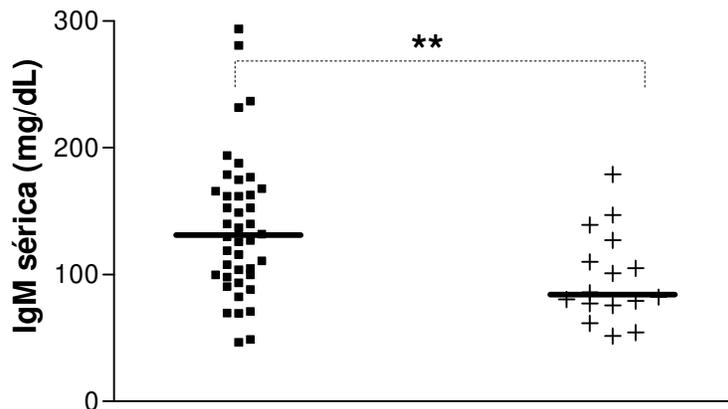


Figura 26: Concentração de IgM (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $P < 0,01$, portanto com diferença estatística (**), segundo teste de Mann-Whitey.

A mediana da concentração de IgM foi maior estatisticamente nos pacientes com FC (131 mg/dL) quando comparado aos indivíduos saudáveis (84,2mg/dL).

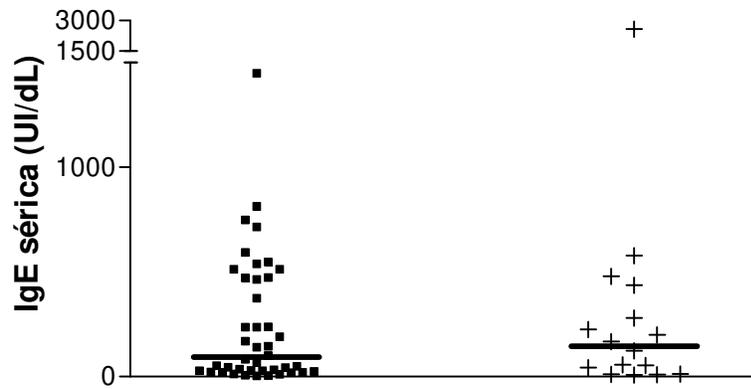


Figura 27: Concentração de IgE (UI/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

Para a IgE não houve diferença significativa entre os fibrocísticos e crianças saudáveis.

As medianas da concentração sérica das imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM e IgE) ao longo da suplementação encontram-se, respectivamente, nas figuras 28, 29, 30 e 31.

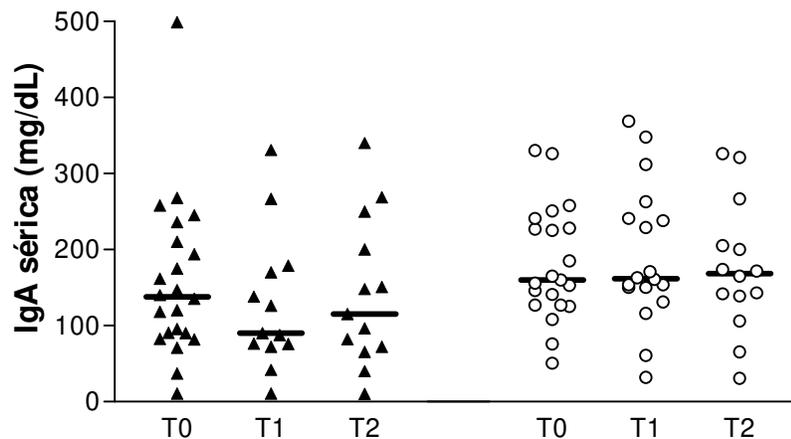


Figura 28: Concentração de IgA (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGF β (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

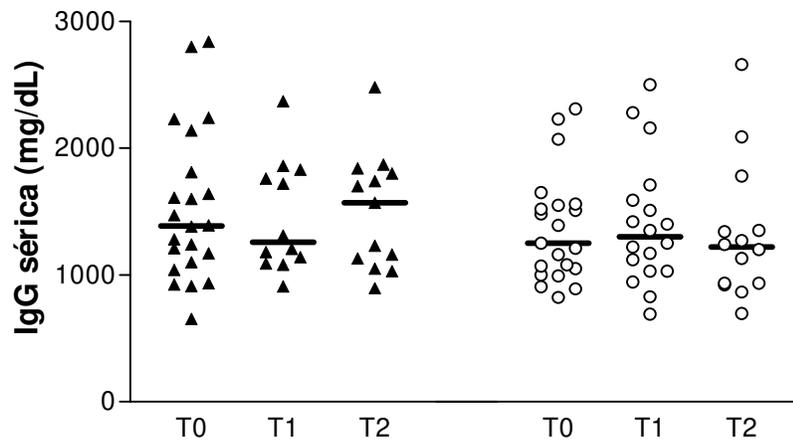


Figura 29: Concentração de IgG (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

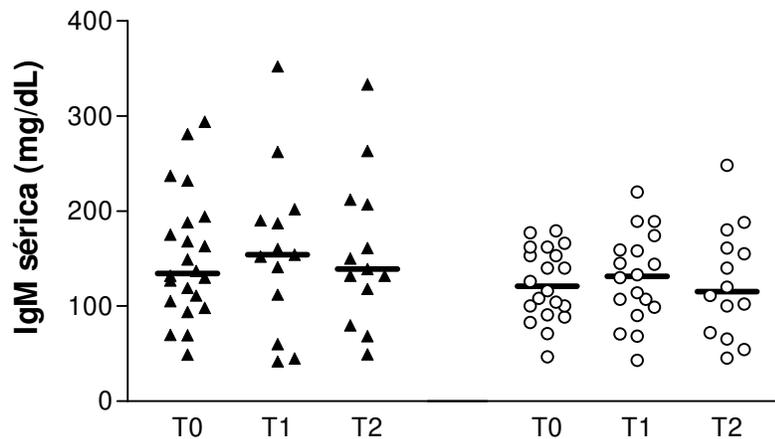


Figura 30: Concentração de IgM (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

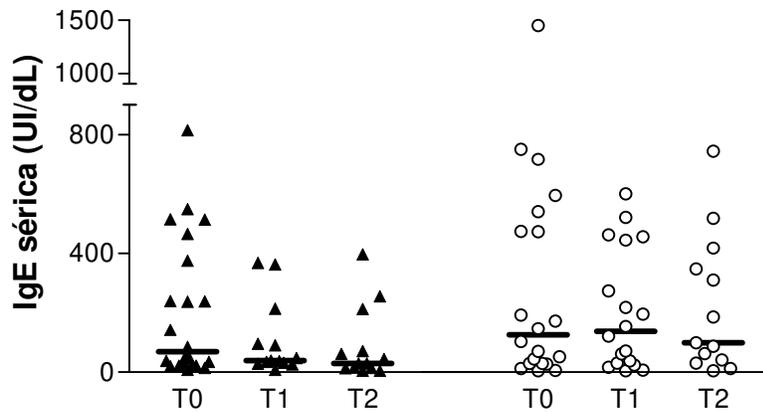


Figura 31: Concentração de IgE (UI/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

Em relação à suplementação, no início e no decorrer do trabalho não foram encontradas diferenças significativas, entre os grupos placebo e teste, para as imunoglobulinas séricas IgA, IgG, IgM e IgE.

5.3.7 IgA salivar

A figura 32 apresenta a concentração de IgA na saliva de fibrocísticos e crianças saudáveis. Na figura 33 temos a IgA salivar durante a suplementação.

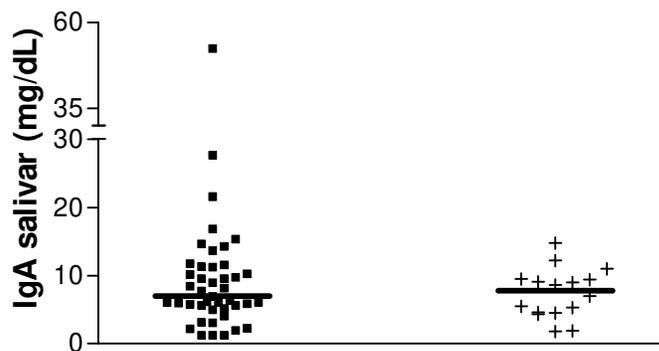


Figura 32: Concentração de IgA (mg/dL) na saliva de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p > 0,05$ sem diferença estatística.

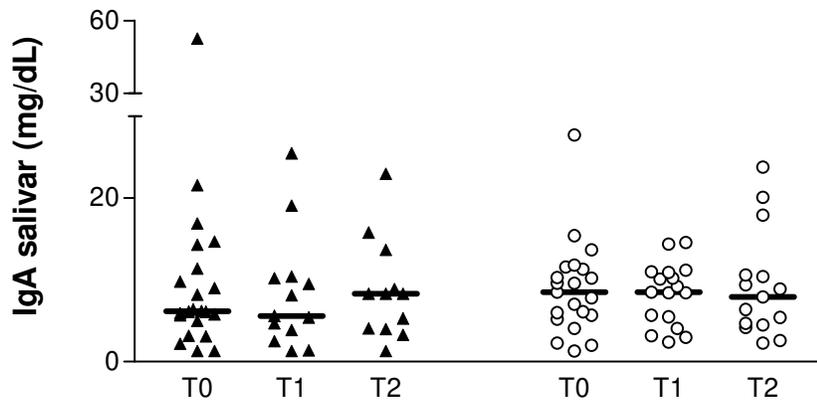


Figura 33: Concentração de IgA (mg/dL) na saliva de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). $p > 0,05$, portanto sem diferença estatística.

A mediana da concentração de IgA salivar não diferiu estatisticamente entre os pacientes com FC e crianças saudáveis. Em relação à suplementação, também não ocorreram mudanças estatísticas significativas.

5.4 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

5.4.1 Antropometria

Os escores-z do IMC/I e E/I encontram-se nas figuras 34 e 35.

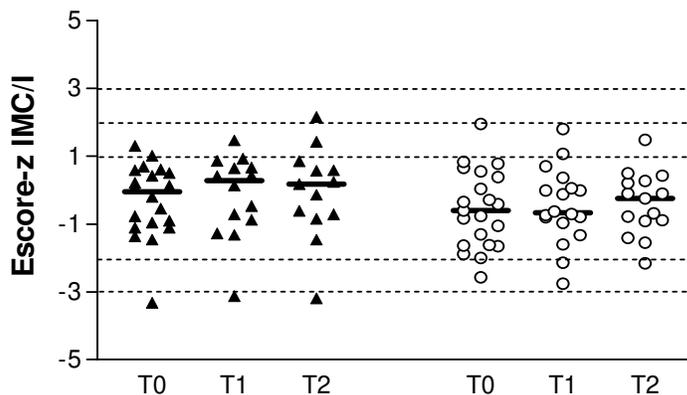


Figura 34: Escore-Z do índice antropométrico índice de massa corporal para idade (IMC/I) de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). $p > 0,05$.

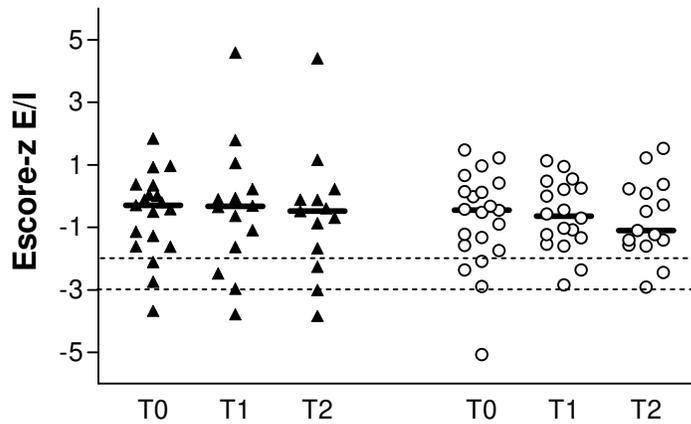


Figura 35: Escore-Z do índice antropométrico estatura para idade (E/I) de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). $p > 0,05$.

No início e ao decorrer do trabalho não foram encontradas diferenças significativas, entre os grupos placebo e teste, para os índices antropométricos IMC/I e E/I. De acordo com a classificação da WHO, 2006/2007, para o índice antropométrico IMC/I no T0 do grupo que ingeriu caseína 16 crianças estavam eutróficas, 2 com sobrepeso e 1 com magreza acentuada e para o índice E/I no T0 16 crianças foram classificadas com estatura adequada para idade, 2 com baixa estatura para a idade e 1 com muito baixa estatura para idade. Para o grupo que ingeriu WPC-TGFβ, o índice IMC/I revelou que no T0 18 crianças estavam eutróficas, 1 sobrepeso e 2 com magreza e para o índice E/I no T0 17 crianças foram classificadas com estatura adequada para idade, 3 com baixa estatura para a idade e 1 com muito baixa estatura para idade. Ao longo do estudo (T1 e T2), os pacientes, de ambos os grupos, não sofreram mudanças na classificação do estado nutricional.

Cabe ressaltar que o índice IMC/I é um parâmetro mais sensível de mudanças recentes no estado nutricional, enquanto que o índice E/I, reflete o resultado do manejo nutricional ao longo do tempo.

As tabelas 14 e 15 revelam a frequência da classificação nutricional para os índices CMB e CB, respectivamente.

Tabela 14: Classificação nutricional da CMB dos pacientes ao longo do estudo

		N	Classificação	Distribuição
T0	Caseína	19	Risco de distúrbios associados à desnutrição	3
			Adequado	16
	WPC-TGFβ	21	Risco de distúrbios associados à desnutrição	1
			Adequado	17
T1	Caseína	14	Risco de distúrbios associados à desnutrição	2
			Adequado	12
	WPC-TGFβ	18	Risco de distúrbios associados à desnutrição	1
			Adequado	17
T2	Caseína	13	Risco de distúrbios associados à desnutrição	2
			Adequado	11
	WPC-TGFβ	15	Risco de distúrbios associados à desnutrição	1
			Adequado	14

Tabela 15: Classificação nutricional da CB dos pacientes ao longo do estudo

		n	Classificação	Distribuição
T0	Caseína	19	Risco de distúrbios associados à desnutrição	5
			Adequado	13
	WPC-TGFβ	21	Risco de doenças relacionadas ao excesso de peso	1
			Risco de distúrbios associados à desnutrição	8
			Adequado	13
			Risco de doenças relacionadas ao excesso de peso	0
T1	Caseína	14	Risco de distúrbios associados à desnutrição	3
			Adequado	11
	WPC-TGFβ	18	Risco de doenças relacionadas ao excesso de peso	0
			Risco de distúrbios associados à desnutrição	7
			Adequado	11
			Risco de doenças relacionadas ao excesso de peso	0
T2	Caseína	13	Risco de distúrbios associados à desnutrição	3
			Adequado	10
	WPC-TGFβ	15	Risco de doenças relacionadas ao excesso de peso	0
			Risco de distúrbios associados à desnutrição	3
			Adequado	12
			Risco de doenças relacionadas ao excesso de peso	0

Para o valor de CMB não foram encontradas mudanças importantes no percentil dos pacientes. No grupo que ingeriu WPC-TGF β , ao longo do estudo, 3 crianças mudaram de classificação nutricional para o índice de CB, passando de risco de distúrbio associado à desnutrição, para adequado. Vale ressaltar que a CB não deve ser utilizada isoladamente para avaliar mudanças no perfil nutricional do indivíduo.

5.4.2 Parâmetros bioquímicos: Albumina e pré-albumina

As figuras 36 e 37 apresentam as concentrações de albumina e pré-albumina séricas para pacientes com FC comparado à indivíduos saudáveis.

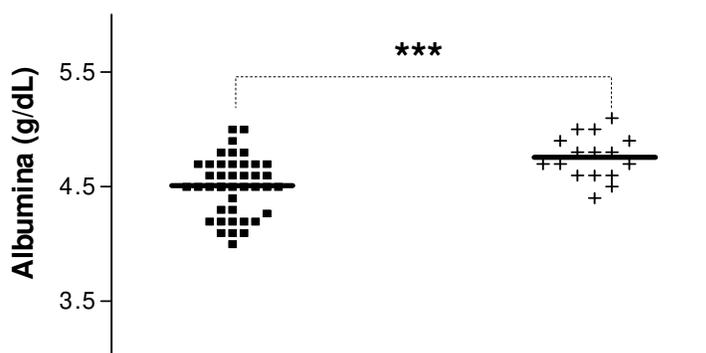


Figura 36: Concentração de albumina (g/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). Diferença estatística (***) entre os grupos, pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,001$).

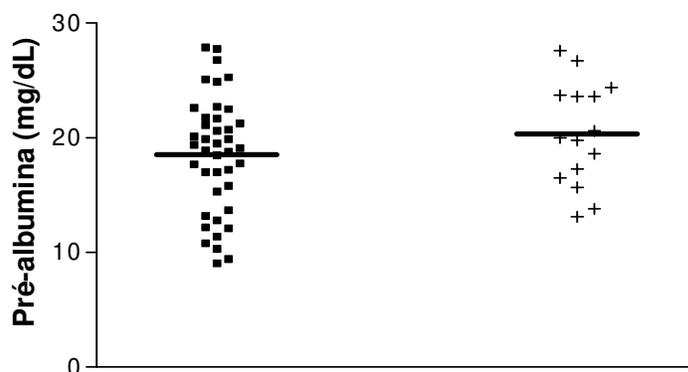


Figura 37: Concentração de pré-albumina (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos (■) e de crianças saudáveis (+). $p > 0,05$.

Houve diferença estatística entre a mediana de albumina do grupo de fibrocísticos (4,5g/dL – de 4g/dL a 5g/dL) e de indivíduos saudáveis (4,75g/dL – de 4,4g/dL a 5,1g/dL). A pré-albumina não apresentou diferença estatística.

As figuras 38 e 39 mostram o perfil de albumina e pré-albumina ao longo da suplementação.

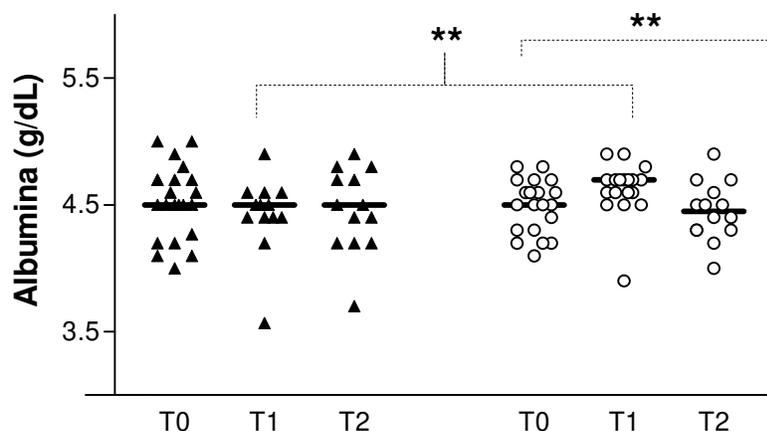


Figura 38: Concentração de Albumina (g/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) de suplementação alimentar com caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). Diferença estatística (**) entre os tempos do WPC-TGFβ ($p < 0,01$) pelo teste de Mann-Whitney e diferença estatística (**) entre os suplementos no T1 ($p < 0,01$) pelo teste de Friedman.

Ocorreram mudanças significativas na albumina dos pacientes que ingeriram o WPC-TGFβ, sendo que a concentração no T0 teve mediana de 4,5g/dL (4,1 a 4,8), no T1 4,7g/dL (3,9 a 4,9) e no T2 de 4,45g/dL (4 a 4,9). Também houve diferença entre os suplementos no T1, em que a mediana da caseína foi de 4,5g/dL (3,57 a 4,9). Mesmo o menor valor encontrado de albumina esteve dentro da normalidade (3,2 a 5 g/dL).

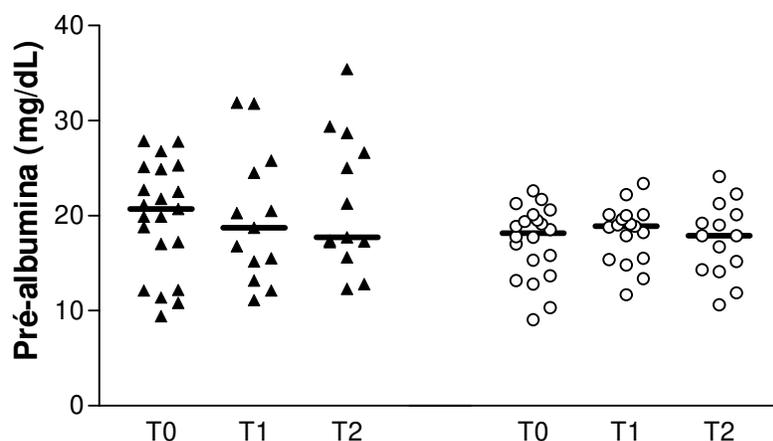


Figura 39: Concentração de Pré-albumina (mg/dL) no soro de pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1) e no final do quarto mês (T2) da suplementação alimentar com suplemento de caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). Sem diferença estatística.

Para a pré-albumina, não ocorreram mudanças significativas ao longo do tempo. Em muitos pacientes, em ambos os grupos, a pré-albumina esteve abaixo dos valores de normalidade (20 – 50mg/dL).

5.4.3 Avaliação da ingestão alimentar

A ingestão alimentar dos pacientes foi avaliada com base em duas ferramentas amplamente citadas na literatura, o recordatório de 24horas (T0, T1 e T2) e o registro alimentar de 3 dias (T0-T1 e T1-T2). A partir destes métodos foi avaliada a distribuição dos macronutrientes na dieta (figura 40); calculado o percentual de adequação de ingestão energética (tabela 16), considerando o intervalo de aumento proposto pelo consenso Europeu de FC; o percentual de adequação de ingestão alimentar de vitaminas lipossolúveis (A,D,E) em relação às DRI's e ao intervalo de adequação proposto pelo Consenso Europeu de FC (tabelas 17, 18 e 19) e por fim o percentual de adequação de ingestão alimentar, relação às DRI's, de Ca, Fe e Zn (tabela 20) dos antioxidantes vitaminaC, Se e Fe (tabela 21).

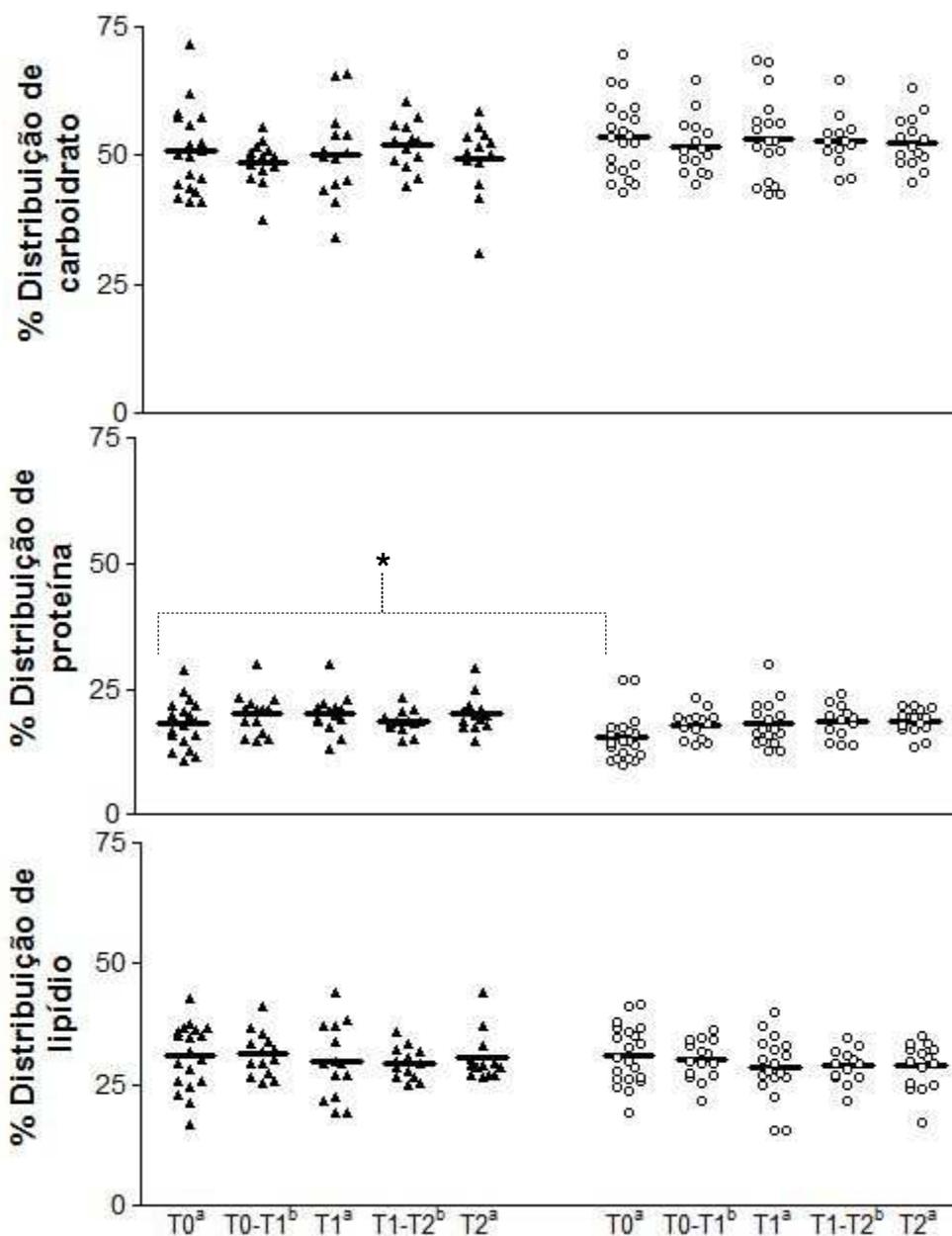


Figura 40: % Distribuição dos macronutrientes na dieta dos pacientes fibrocísticos no início (T0), com dois meses (T1), no final do quarto mês (T2), no intervalo entre o início e o meio (T0-T1) e no intervalo entre o meio e o fim (T1-T2) da suplementação alimentar com caseína (▲) e WPC-TGFβ (○). Os dados foram obtidos a partir do Recordatório Alimentar de 24h (^a) e do Registro alimentar de 3 dias (^b). Diferença estatística (*) no percentual de distribuição da proteína entre os suplementos no T0 ($p < 0,05$). Nos demais não houve diferença estatística.

Os macronutrientes estavam com distribuição dentro do preconizado pela DRI, 2002. Não houve diferença significativa na distribuição de carboidratos e lipídios ao longo do tempo entre os suplementos. A mediana do percentual de distribuição de carboidrato na dieta variou entre 49,75 – 50,4% para o grupo placebo e entre 51,13 – 53,54% para o grupo WPC-TGFβ. Em relação à distribuição de lipídios, a mediana variou entre 29,11 – 32,01% para o grupo placebo e entre 28,59 – 30,58% para o WPC-TGFβ.

Quanto à distribuição de proteínas a mediana do percentual de distribuição variou entre 18,3 – 20,8% para o grupo placebo e entre 14,71 - 19,23% para o grupo que ingeriu o WPC-TGFβ. Houve diferença estatística entre os suplementos no T0 ($p=0,036$ – Mann-Whitney), figura 40.

Tabela 16: Percentual (%) de adequação de ingestão energética relação ao Intervalo de adequação (120 a 150%) proposto pelo Consenso Europeu de Fibrose cística, 2002.

	Caseína		WPC-TGFβ	
	NED 120%	NED 150%	NED 120%	NED 150%
T0 ^a	97,05 (61,4 - 149,4)	77,02 (46,8 - 116,4)	96,28 (58,5 - 145,5)	77,02 (46,8 - 116,4)
T0-T1 ^b	101,27 (72 - 143,4)	81,01 (52,6 - 114,7)	118,86 (81,8 - 146,9)	95,08 (65,4 - 117,5)
T1 ^a	104,54 (73,2 - 143)	83,64 (58,6 - 114,4)	112,58 (68,6 - 148,5)	90,06 (54,9 - 119)
T1-T2 ^b	98,05 (74,5- 130,4)	78,44 (59,6 - 104,3)	107,62 (88,3 - 159,6)	86,1 (70,7 - 127,7)
T2 ^a	104,11 (67,4 - 124,3)	83,29 (53,9 - 99,5)	99,67 (54 - 151,5)	79,74 (43,2 - 121,2)

a: Recordatório de 24h; b: Registro alimentar de 3 dias; dados apresentados na forma de mediana e intervalo entre os valores mínimos e máximos

Em relação à ingestão energética, verificou-se um alto percentual de adequação para ambos os grupos. Não foram encontradas diferenças estatísticas na ingestão energética para os grupos e entre os tempos, portanto, a suplementação não interferiu no aporte energético dos pacientes.

Tabela 17: Percentual (%) de adequação de ingestão alimentar de vitamina A em relação à *Dietary Reference Intake* (DRI, 2002) e ao Intervalo de adequação proposto pelo Consenso Europeu de Fibrose cística, 2002.

	Caseína			WPC-TGFβ		
	DRI	Intervalo FC		DRI	Intervalo FC	
T0 ^a	84,95 (5,4-466)	40,3 (2,7-121,6)	16,1 (1,1-48,6)	73,6 (17-724)	36 (8,4-242)	14,4 (3,3-96,6)
T0-T1 ^b	87,6 (31-916)	42,2 (15,3-458)	16,9 (6-183,1)	111,8 (3,7-321)	40,8 (1,9-138)	16,3 (0,8-55,1)
T1 ^a	95,3 (22-253)	34,4 (7,2-126,5)	13,8 (2,9-50,6)	90,5 (0-321,3)	30,2 (0-107)	12,1 (0-42,8)
T1-T2 ^b	107,1 (20-250)	38,4 (10,2-95,9)	15,4 (4,1-38,4)	141,0 (3,7-288)	51,5 (1,9-96)	20,6 (0,8-38,3)
T2 ^a	66,9 (15-323)	24,6 (7,7-161,5)	9,8 (3,1-64,6)	86,0 (0-235,1)	34,6 (0-78,4)	13,9 (0-31,4)

a: Recordatório de 24h; b: Registro alimentar de 3 dias; dados apresentados na forma de mediana e intervalo entre os valores mínimos e máximos

Tabela 18: Percentual (%) de adequação de ingestão alimentar de vitamina E em relação à *Dietary Reference Intake* (DRI, 2000) e ao Intervalo de adequação proposto pelo Consenso Europeu de Fibrose cística, 2002.

	Caseína			WPC-TGFβ		
	DRI	Intervalo FC		DRI	Intervalo FC	
T0 ^a	108,2 (16-469)	11 (1,6-65)	3,9 (0,4-16)	147,1 (36-341)	15,4 (4-43,8)	3,8 (1-11)
T0-T1 ^b	125,5 (71-434)	14,3 (7,4-45)	3,6 (1,9-11)	152,9 (51-419)	16,7 (8-68,6)	4,2 (2-17,2)
T1 ^a	129,5 (44-396)	16,3 (4,6-41)	4,1 (1,2-10)	124,3 (30-456)	15,7 (3-74,7)	3,9 (0,8-19)
T1-T2 ^b	130 (54-434)	16,7 (4,9-45)	4,2 (1,2-11)	165,8 (66-419)	18,7 (8,8-67)	4,7 (2,2-17)
T2 ^a	121,8 (54-396)	16,5 (5,1-41)	4,1 (1,3-10)	141,8 (4,6-456)	17 (0,8-75)	4,3 (0,2-19)

a: Recordatório de 24h; b: Registro alimentar de 3 dias; dados apresentados na forma de mediana e intervalo entre os valores mínimos e máximos

Tabela 19: Percentual (%) de adequação de ingestão alimentar de vitamina D em relação à *Dietary Reference Intake* (DRI, 1997) e ao Intervalo de adequação proposto pelo Consenso Europeu de Fibrose cística, 2002.

	Caseína			WPC-TGFβ		
	DRI	Intervalo FC		DRI	Intervalo FC	
T0 ^a	14 (0-100)	7 (0-50)	3,5 (0-25)	24 (0-526)	12 (0-263)	6 (0-132)
T0-T1 ^b	36 (4-956)	18 (2-478)	9 (1-239)	35 (6,7-583)	17,5 (3,3-291)	8,8 (1,7-146)
T1 ^a	38 (0-448)	19 (0-224)	9,5 (0-112)	56 (0-1530)	28 (0-765)	14 (0-383)
T1-T2 ^b	22,3 (5,3-780)	11,2 (2,7-390)	5,6 (1,3-195)	76,7 (5,3-452)	38,3 (2,7-226)	19,2 (1,3-113)
T2 ^a	12 (0-646)	6 (0-323)	3 (0-161)	16 (0-492)	8 (0-246)	4 (0-123)

a: Recordatório de 24h; b: Registro alimentar de 3 dias; dados apresentados na forma de mediana e intervalo entre os valores mínimos e máximos

Não houve diferença significativa entre os grupos e ao longo do tempo ($p > 0,05$) para ingestão das vitaminas lipossolúveis avaliadas (A,E,D). Os dados, revelam a importância da suplementação vitamínica para estes pacientes, considerando que para fibrocísticos a necessidade de vitamina A e E seja igual à de indivíduos saudáveis, as necessidades estariam atendidas, entretanto considerando a necessidade real da fibrose cística verificou-se que o percentual de adequação da ingestão alimentar de vitaminas A e E foi muito baixa.

Em relação à vitamina D, as medianas do percentual de adequação, revelaram uma ingestão muito deficiente por parte desta população, entretanto ao se avaliar individualmente pode-se verificar que em alguns dos casos (máximos) a ingestão, não só supriu, como foi muito superior à esperada.

Tabela 20: Percentual (%) de adequação de ingestão alimentar de Ca, Fe, Fibra em relação às *Dietary References Intake* (DRI's 1997 e 2002).

	Caseína			WPC-TGFβ		
	Ca	Fe	Fibra	Ca	Fe	Fibra
T0 ^a	24 (2,7-141)	122,5 (60-285)	38,9 (6-103)	31,1 (7,8-125)	128 (59-226)	42 (22-118)
T0-T1 ^b	29,6 (13-81,2)	131,4 (87-243)	43,7 (14,3-61)	39,3 (8,4-98)	127,8 (62-241)	39,1 (24-73,6)
T1 ^a	37 (9,1-80)	119,5 (92-261)	40 (11,6-68)	30,8 (5,7-87)	107 (67-258)	36,2 (18,4-82)
T1-T2 ^b	22,9 (9,2-51)	117,6 (69,7-213)	34,9 (15,3-64)	26,9 (8,4-94)	113,7 (74-241)	36 (13,4-74)
T2 ^a	24,4 (7,8-46)	123 (102-179)	24,5 (11,2-71)	21,5 (4,1-76)	92,5 (67-235)	30,4 (6,8-82)

a: Recordatório de 24h; b: Registro alimentar de 3 dias; dados apresentados na forma de mediana e intervalo entre os valores mínimos e máximos

Em ambos os grupos, o percentual de adequação para a ingestão de cálcio e fibras esteve inferior às recomendações propostas pela DRI, enquanto que a ingestão de ferro foi adequada/ superior as recomendações. Não houve diferença estatística entre os grupos e entre os tempos destes parâmetros avaliados.

Tabela 21: Percentual (%) de adequação de ingestão alimentar de VitC, Se, Zn em relação às *Dietary References Intake* (DRI's 2000 e 2002).

	Caseína			WPC-TGFβ		
	VitC	Se	Zn	VitC	Se	Zn
T0 ^a	185,8 (5,6-401)	89,3 (21-358)	187,5 (20-533)	188,8 (1,3-1732)	89,1 (16-244)	130 (34-329)
T0-T1 ^b	283,9 (17-739)	109,4 (50-248)	140 (63-437)	328,7 (14-1027)	160,4 (68-314)	112,8 (47-301)
T1 ^a	137,2 (9,3-426)	114,9 (26-251)	194,7* (61-320)	155,2 (18-962)	145,5 (49-328)	114* (43-1135)
T1-T2 ^b	287 (73-674)	125,7 (77-196)	139,2 (56-265)	218,5 (14-1027)	130,1 (52-314)	130,7 (62-670)
T2 ^a	143,6 (46-636)	103 (26-198)	144 (68-314)	171,2 (25,2-719)	95,7 (5,5-328)	130 (43-1135)

a: Recordatório de 24h; b: Registro alimentar de 3 dias; dados apresentados na forma de mediana e intervalo entre os valores mínimos e máximos

Por se tratar de uma pesquisa de suplementação alimentar que visava melhorar o estado nutricional, reduzir o processo inflamatório e aumentar os índices antioxidantes avaliou-se alguns dos micronutrientes que são representantes deste grupo: Vitamina C, Se e Zn. Verificou-se que para o Zn houve diferença estatística no T1 entre o placebo e o WPC-TGF β , $p=0,025$, teste de Mann-Whitney. Para vitamina C também houve diferença estatística ao longo dos tempos para a caseína, $p=0,009$, teste de Friedman. Para os demais dados não houve diferença significativa ($p>0,05$).

5.5 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

5.5.1 Cultura Rotina Diagnóstico no Escarro

A suplementação não foi eficiente na redução e/ou inibição da colonização. Não houve mudança significativa na frequência dos patógenos ao longo do tempo (tabela 22). Em relação ao exame semi-quantitativo da presença dos MOs no escarro dos pacientes, também não houve alteração nos casos avaliados.

Tabela 22: Cultura Rotina Diagnóstico (CRD) no escarro dos pacientes com fibrose cística, em relação ao tempo e aos suplementos

Suplemento	Bactéria	Presença	T0		T1		T2	
			n	Distribuição	n	Distribuição	n	Distribuição
Caseína	<i>Stafilococcus aureus</i>	Sim	19	17	11	10	8	6
		Não		2		1		2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sim		9		3		0
		Não		10		8		8
	<i>Pseudomonas aeruginosa mucóide</i>	Sim		7		3		1
		Não		12		8		7
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	Sim		1		1		1	
	Não		18		10		7	
WPC	<i>Stafilococcus aureus</i>	Sim	21	17	14	12	14	12
		Não		4		2		2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sim		7		4		3
		Não		14		10		11
	<i>Pseudomonas aeruginosa mucóide</i>	Sim		4		2		2
		Não		17		12		12
	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	Sim		2		1		1
		Não		19		13		13

6 DISCUSSÃO

Este trabalho reveste-se de considerável importância por ser uma pesquisa de intervenção nutricional, em que foram avaliados os efeitos de um concentrado protéico de soro de leite enriquecido com TGF- β e lactoferrina (WPC- TGF- β), oferecido por via oral a pacientes pediátricos com FC. Pouquíssimos trabalhos foram encontrados nesta área de conhecimento.

Os alvos da suplementação foram o sistema antioxidante, a produção de citocinas, o estado nutricional e a infecção. A utilização de sangue periférico representou uma resposta parcial da doença em relação à imunidade. Em relação ao perfil nutricional dos pacientes, foram utilizados um conjunto de parâmetros que buscaram avaliar todas as alterações no estado de nutrição destes indivíduos, mesmo que estas fossem mínimas. Por outro lado, a avaliação da infecção foi realizada no escarro, pois métodos mais sensíveis de identificação e quantificação do processo infeccioso são invasivos.

A comparação dos exames, relacionados ao processo inflamatório, dos fibrocísticos com indivíduos saudáveis, também trouxe grande contribuição científica, uma vez que foi possível visualizar a FC por uma ótica diferente, uma doença cujo processo inflamatório é determinante na evolução do paciente.

No presente trabalho, o balanço entre a presença de espécies reativas de oxigênio e antioxidantes foi analisado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em granulócitos estimulados por forbol-miristato-acetato (PMA) em citometria de fluxo e determinação bioquímica de glutatona reduzida, em eritrócitos.

Com relação à produção de ROS pelos granulócitos periféricos, verificou-se que estas células em pacientes com FC não apresentaram diferenças na produção, basal ou estimulada, de ROS em relação ao grupo de crianças saudáveis. Diferentemente destes dados, os níveis de ROS na superfície do epitélio respiratório estão elevados e uma das causas deve-se ao sistema antioxidante se mostrar defeituoso no controle da produção de ROS (BONCUEUR *et al.*, 2008)

A infiltração maciça de neutrófilos no pulmão de pacientes com FC leva a uma intensa formação de ROS em particular de H_2O_2 que contribui para um irreversível dano pulmonar. Os neutrófilos ativados que migram para as vias aéreas, geram íons superóxidos (O_2^-), radical hidroxil livre (OH^\cdot) e ácido hipocloroso ($HClO^\cdot$). As células epiteliais dos FC, também geram quantidades significativas de H_2O_2 pela via de produção de ATP. (JACQUOT *et al.*, 2008). O aumento da oxidação do epitélio respiratório resulta diretamente da ausência da proteína CFTR funcionante ou indiretamente da infiltração de células inflamatórias que produzem uma alta quantidade de H_2O_2 (ROTTNER; FREYSSINET; MARTINEZ, 2009; JACQUOT *et al.*, 2008).

A oxidação pode ter papel chave na proteção contra patógenos, mediada pelo sistema imune inato, entretanto a produção excessiva de ROS e de seus subprodutos, pode causar uma injúria tecidual e modificar as vias de sinalização enviadas pela célula. Dessa forma, entende-se que as vias aéreas de FC estão expostas não só a oxidantes do meio ambiente, mas sim a oxidantes derivados das próprias células inflamatórias, resultando portanto em um desbalanço oxidativo (ROTTNER; FREYSSINET; MARTINEZ, 2009; JACQUOT *et al.*, 2008).

O stress oxidativo tem grande importância na evolução da FC e vem sendo identificado como uma das complicações mais precoces das vias aéreas nestes pacientes. Estudos recentes mostram que o dano oxidativo nas proteínas pulmonares durante a infecção crônica pode contribuir enormemente para a queda na função pulmonar de fibrocísticos (STAROSTA & GREISE, 2006).

Neste estudo, observou-se que a glutatona nos eritrócitos de sangue periférico no grupo de pacientes fibrocísticos não foi diferente do grupo de indivíduos saudáveis. Os dados de Mangione e colaboradores (1994), corroboram com os aqui apresentados, além disso, eles identificaram uma alta relação inversa entre GSH eritrocitária e função pulmonar. Esta mesma correlação foi identificada por Lands *et al.*, 1999, entretanto esta observação foi para linfócitos. Laskowska-Klita & Chechowska (2001) mostraram que algumas das enzimas envolvidas no sistema antioxidante eritrocitário estão diminuídas em pacientes com FC.

No fluído do epitélio apical respiratório Gao e colaboradores (1999) verificaram uma redução de GSH e que a proteína CFTR é a responsável pelo transporte anormal deste tripeptídeo e o principal mecanismo de fluxo de GSH do meio extracelular pulmonar, para o epitélio celular do pulmão, o que leva a supor que a CFTR esteja envolvida em manter o estado redox das vias aéreas. Portanto, a disfunção na CFTR leva ao aumento do stress oxidativo, caracterizado pela deficiência de GSH e elevada produção de ROS em células CFTR-deficientes (ROTTNER; FREYSSINET; MARTINEZ, 2009; JACQUOT *et al.*, 2008).

Rottner, Freyssinet e Martinez, 2009 verificaram que tanto em fluídos epiteliais como no plasma, a concentração de GSH (não de GSSG) em fibrocísticos é reduzida quando comparado com indivíduos normais, sugerindo uma deficiência sistêmica de GSH, não sendo, portanto, limitada ao local da inflamação. A infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (PA) também pode contribuir para aumentar os níveis de GSSG nas células epiteliais, reduzindo o quociente GSH/GSSG e aumentando o stress oxidativo.

A suplementação com agentes antioxidantes e/ou precursores da glutathiona vem sendo proposta como uma das alternativas para reduzir o stress oxidativo nestes pacientes (CANTIN *et al.*, 2007). Além disso, a suplementação com agentes capazes de modular a resposta inflamatória, ou interferir na infecção crônica, pode trazer muitos benefícios aos pacientes e representam um desafio para os pesquisadores.

Os resultados ora apresentados revelaram que a suplementação com WPC-TGF β aumentou estatisticamente, de forma gradativa, a estimulação basal dos granulócitos para a produção de ROS. Cantin e colaboradores (2006) identificaram que o aumento do stress oxidativo celular, pode reprimir a expressão da CFTR e aumentar, posteriormente, os conteúdos celulares de GSH, sendo esta uma resposta adaptativa do organismo.

A suplementação com WPC-TGF β não alterou estatisticamente os níveis de glutathiona eritrocitária. Por outro lado, em um estudo observacional, os autores verificaram que a restrição de GSH na dieta, causou um aumento nos marcadores

clínicos dos pacientes com FC (VISCA *et al.*, 2008). Kariya *et al.* (2007), sugeriram um aumento da GSH pulmonar por meio da administração de glutathiona na dieta de fibrocísticos. Além disso, outro trabalho mostrou que a inalação de GSH atenuou a inflamação nestes pacientes (BISHOP *et al.*, 2005).

Em dois estudos de intervenção nutricional (GREY *et al.*, 2003; LANDS *et al.*, 2010), realizados pelo mesmo grupo de pesquisa, em que pacientes com FC foram suplementados com proteínas do soro de leite, houve contraposição dos resultados. No primeiro, publicado em 2003, verificou-se que a suplementação com um WPI (Immunocal®) aumentou os níveis séricos de GSH nos linfócitos, entretanto no segundo trabalho, publicado em 2010, não se observou aumentos significativos deste tripeptídeo no mesmo tipo celular, mediante a suplementação de um WPC submetido à alta pressão.

Aumento significativo dos níveis de GSH linfocitária após ingestão de concentrado protéico de soro de leite também foi descrito por Lothian *et al.* (2000) em pacientes com doença obstrutiva aérea.

O excesso de agentes oxidantes, insuficientes quantidades de agentes antioxidantes, como a GSH, alterações no metabolismo de Ca^{+2} intracelular e presença de citocinas pró-inflamatórias extracelulares, ativam os receptores toll-like (TLR), o fator nuclear kappa B (NF-kB) e a AP-1, resultando na transcrição de citocinas pró-inflamatórias, que resultaram em aumento do recrutamento de neutrófilos e macrófagos para a região. Sabe-se também, que o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pode aumentar a produção de ROS. (ROTTNER; FREYSSINET; MARTINEZ, 2009; BRENNAN, 2008).

No presente estudo, a suplementação com WPC-TGFβ alterou significativamente a produção de TNF-α em presença de PHA, levando à uma gradual redução na produção de TNF-α em resposta ao antígeno citado. Também foi observado que em cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com FC e de indivíduos saudáveis, a resposta celular de TNF-α frente à BCG, foi maior para os indivíduos saudáveis, por outro lado a produção celular espontânea foi maior para o grupo de fibrocísticos.

Trabalho realizado em pacientes com doença de Crohn suplementados com WPC-TGF β , não foram encontradas diferenças significativas na produção de TNF- α (OYA, 2010). Moreno (2007), também não observou diferenças significativas na produção de TNF- α em sobrenadante de cultura de CMSP, de pacientes infectados por HIV-1 suplementados com concentrado protéico de soro de leite (nativo e hidrolizado).

Achados de Norman e colaboradores (1991), revelaram que a concentração de TNF- α sérico em pacientes com FC foi maior que em indivíduos normais, além disso, outro trabalho mostrou que os níveis circulatórios de TNF- α parecem estar aumentados mesmo em pacientes clinicamente estáveis (LEVY *et al.*, 1993). Entretanto, outros autores não encontraram TNF- α no soro de pacientes estáveis com FC (KRONBORG *et al.*, 1993). Quando avaliada a concentração de TNF- α no lavado brônquico de pacientes com FC, encontrou-se concordância entre os estudos, no qual os níveis desta citocina mostraram-se elevados para estes pacientes (BALOUGH *et al.*, 1995; BONFIELD *et al.*, 1995a). A concentração no escarro também mostrou-se elevada em vários trabalhos (WOLTER *et al.*, 1999; OSIKA *et al.*, 1999; KARPATI; HJELTE; WRETLIND, 2000). Pacientes cronicamente infectados por PA têm níveis mais altos de TNF (KRONBORG *et al.*, 1993; PUKHALSKY *et al.*, 1999), sendo que estes tornam-se ainda mais elevadas durante a exacerbação (KARPATI; HJELTE; WRETLIND, 2000). A antibioticoterapia reduz estes níveis. O aumento de TNF- α esta associado com aumento de proteína-C-reativa e elastase neutrofílica (SAGEL & ACCURSO, 2002).

A suplementação com WPC-TGF β não foi capaz de alterar a resposta de IFN- γ para os antígenos estudados. Moreno (2007) verificou um aumento de produção de IFN- γ BCG específico, após a suplementação com WPC formado de proteínas nativas, por outro lado, os resultados de Oya (2010) revelaram que após suplementação com WPC-TGF β houve uma redução significativa na produção de IFN- γ em presença de PHA, em pacientes com doença de Chron.

Os resultados apresentados neste trabalho revelaram que existe diferença estatística em relação a produção de IFN- γ , entre indivíduos normais e pacientes com FC, porém não houve diferença na mediana entre os grupos de estudo.

O IFN- γ está intimamente envolvido no processo inflamatório e função pulmonar dos pacientes com FC. Um estudo recente, com CMSP de pacientes com FC cronicamente infectados por PA, observou-se baixas quantidades de IFN- γ e altas de IL-4 –característica Th2– quando comparado com pacientes não infectados (MOSER *et al.*, 2000). Em biopsia brônquica de pacientes com FC, altas expressões de IFN- γ foram associadas à doença mais leve, enquanto que a baixa expressão foi associada à pacientes com doença pulmonar aguda com frequentes exacerbações (WOJNAROWSKI *et al.*, 1999). Portanto, fibrocísticos com alta concentração de IFN- γ e, portanto resposta predominantemente do tipo Th1, tem melhor função pulmonar.

A suplementação com WPC-TGF β não produziu mudanças significativas nas concentrações de IL-8, entretanto evidenciou-se uma tendência de redução, nas células em que o estímulo antigênico foi a PHA, para o grupo que ingeriu o suplemento teste, o mesmo foi identificado no estudo coordenado por Lands (2010), onde verificaram uma tendência –não significativa– de redução na IL-8 em cultura de CMSP estimuladas por PHA, de pacientes que ingeriram WPC submetido à alta pressão (*pressurized whey*).

Os dados apresentados no presente estudo, revelaram que não houve diferença estatística na resposta celular entre cultura de CMSP de pacientes com FC e indivíduos saudáveis. A avaliação da produção de IL-8 em resposta celular, basal e frente à presença de antígenos, é de grande importância na FC, uma vez que esta é a mais importante quimiocina envolvida no processo inflamatório da FC (SAGEL & ACCURSO, 2002).

Muitos estudos na literatura têm demonstrado grandes quantidades de IL-8 nas vias aéreas de pacientes com FC. Balough e colaboradores (1995) identificaram altas concentrações de IL-8 no lavado brônquico alveolar de fibrocísticos, mesmo na ausência de infecção, entretanto outros dois estudos

identificaram concentrações significativamente elevadas apenas em pacientes que evidenciavam baixa função pulmonar (ARMSTRONG *et al.*, 1997; NOAH *et al.*, 1997). As concentrações de IL-8 no escarro, também aparecem aumentadas em uma série de estudos (OSIKA *et al.*, 1999; WOLTER *et al.*, 1999; PUKHALSKY *et al.*, 1999; KARPATI; HJELTE; WRETLIND, 2000; FRANCOEUR & DENIS, 1995; SHAH *et al.*, 1996). Em relação à resposta da IL-8 ao uso de antibiótico ainda não existe consenso (PUKHALSKY *et al.*, 1999; KARPATI; HJELTE; WRETLIND, 2000).

No estudo aqui relatado, a suplementação com WPC-TGF β não modificou, significativamente, a resposta celular para a produção de IL-6, dessa forma, estes achados corroboram com os de Oya (2010) e Lands, *et al.* (2010).

Os achados do presente trabalho revelaram que cultura de CMSP de pacientes com FC produziram uma maior quantidade IL-6, tanto na ausência de estímulo como em resposta à PHA, quando comparado com indivíduos saudáveis.

A IL-6 possui tanto efeito inflamatório quanto efeito antinflamatório (NICHOLS; CHMIEL; BERGER, 2008; SAGEL & ACCURSO, 2002). Em resposta à PA, a secreção de IL-6 mostra-se prolongada e aumentada (BONFIELD; KONSTAN; BERGER, 1999; KUBE *et al.*, 2001). Nixon e colaboradores (1998) mostraram que durante a exacerbação e o período de estabilidade clínica, as quantidades circulantes de IL-6 em pacientes com FC são aumentadas, e somente após o tratamento com antibiótico os níveis séricos de IL-6 ficam diminuídos. As concentrações de IL-6 no lavado brônquico são elevadas em pacientes FC infectados e semelhantes aos de indivíduos normais em pacientes não infectados (BONFIELD *et al.*, 1995b). No escarro, os níveis de IL-6 são significativamente mais baixos em pacientes FC em relação aos indivíduos saudáveis (OSIKA *et al.*, 1999).

A produção de IL-10 sofreu uma pequena alteração com a suplementação, observando-se que no tempo 1 (T1) houve uma diferença significativa entre as medianas dos grupos suplementados, entretanto no T2 esta diferença deixou de

existir. Moreno (2007), não observou variação na produção de IL-10, após suplementação com proteínas do soro de leite.

No presente estudo, também verificou-se que em sobrenadante de cultura de CMSP de pacientes com FC, houve maior produção de IL-10 na ausência de estímulo que em indivíduos normais. Por outro lado, Moss e colaboradores (1996) observaram em cultura de CMSP de indivíduos com FC índices mais baixos de IL-10, em presença de estímulo, comparados com indivíduos saudáveis.

A IL-10 inibe a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias envolvidas na FC. Bonfield e colaboradores (1995a) foram os primeiros a mostrar que os níveis de IL-10 no lavado brônquico alveolar de pacientes com FC era significativamente mais baixos que em indivíduos saudáveis. Mais tarde identificaram também que células epiteliais brônquicas de fibrocísticos, *in vitro*, produziam menos IL-10 (BONFIELD; KONSTAN; BERGER, 1999). A hipótese de que a anormal/ausente funcionalidade da CFTR seja a responsável pela menor produção de IL-10 em células epiteliais é bem aceita (SOLTYS *et al.*, 2002).

Neste estudo verificou-se que antes da suplementação, os níveis de TGF- β 2 no soro eram significativamente mais elevados no placebo, entretanto, com a ingestão WPC-TGF β não foram mais verificadas diferenças significativas entre os grupos. Após a administração com o suplemento (WPC-TGF β), pacientes com doença de Crohn apresentaram aumento significativo na concentração de TGF- β 2 no plasma (OYA, 2010).

No trabalho ora apresentado os níveis de TGF- β 2 de fibrocísticos foram mais elevados que nos indivíduos saudáveis.

O TGF- β é um potente modulador da inflamação. Em biópsia brônquica de pacientes com FC, foi encontrada alta expressão de TGF- β 1 para os pacientes com doença pulmonar leve, enquanto que em pacientes com frequentes exacerbações, a concentração foi relativamente menor (WOJNAROWSKI *et al.*, 1999). Em relação à quantidade plasmática de TGF- β 1, foram encontrados níveis

normais em pacientes com função hepática normal e baixos níveis em pacientes com hepatopatia (ROSENSWEIG *et al*, 1998).

A maior produção celular espontânea de IL-10 e a maior concentração TGF- β 2 no soro dos pacientes com FC, em relação às crianças normais, pode ser uma resposta adaptativa do organismo gerada pela grande inflamação promovida pela doença, uma vez que, estas duas citocinas são consideradas importantes moduladores da inflamação.

Os resultados expostos no presente trabalho, permitiram verificar que os níveis de IgA salivar em pacientes com FC foram estatisticamente iguais à dos indivíduos saudáveis, além disso observou-se que a suplementação com WPC-TGF β não foi capaz de alterar os níveis deste anticorpo na saliva, mesmo sabendo que o TGF- β é um importante modulador da produção de IgA (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Não existe um consenso na literatura sobre os níveis de IgA na saliva de pacientes com FC, South e colaboradores (1967) relataram elevados níveis de IgA sérica, porém níveis normais de IgA na saliva, enquanto que, o grupo americano de Gugler *et al.* (1968), documentou que a IgA salivar e sérica é elevada em pacientes com FC, quando comparados à indivíduos normais. Em avaliação da IgA gástrica, observou-se que pacientes com FC possuem níveis inferiores de IgA nesta mucosa, que indivíduos saudáveis, sugerindo um defeito no transporte de IgA transmucosa na FC (HALLBERG *et al.*, 2001).

Nesta pesquisa, observou-se que os pacientes com FC avaliados apresentaram, em geral, níveis séricos de IgA, IgG e IgM dentro dos parâmetros de normalidade, entretanto ao se comparar com indivíduos saudáveis verificou-se que a concentração no soro de IgA e IgM foi maior para os fibrocísticos. Em relação à suplementação não ocorreram mudanças significativas na concentração sérica destas imunoglobulinas nos grupos WPC-TGF β e caseína.

Em resultados reportados por Hodson, Morris e Batten (1988), as concentrações de imunoglobulinas séricas, IgA, IgG, IgM mostraram-se mais

elevadas em pacientes com FC, do que em indivíduos normais e asmáticos, além disso os níveis de IgG e de suas subclasses mostraram correlação com os níveis de IgA.

Maíz e colaboradores (2008) em estudo sobre a resposta de anticorpos frente à presença de *A. fumigatus* e *C. albicans*, verificaram que pacientes com FC possuem uma maior produção de IgA, IgG e IgM que indivíduos saudáveis.

Em um estudo com 419 fibrocísticos, foi identificado que em pacientes com menos de 10 anos a IgG está diminuída, entretanto, em indivíduos de mais idade ela está em níveis normais ou elevados. Os autores concluíram que com a progressão da doença pulmonar estes pacientes ficam mais suscetíveis a desenvolverem hipergamaglobulinemia (MATTHEWS *et al.*, 1980). Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo prospectivo de 5 anos, no qual associou-se a hipogamaglobulinemia-G ao melhor peso para a idade, menos hospitalizações por exacerbação, menos colonização por PA e conseqüentemente menor declínio da função pulmonar (WHEELER *et al.*, 1984). A PA parece ser um importante fator responsável pela hipergamaglobulinemia em FC (MOSS, 1987).

Treharne e colaboradores (2009), recentemente propuseram a hipótese de que a CFTR pode interagir com a IgG intra-epitelial, estabelecendo um link direto entre CFTR e sistema imunológico.

Em relação à IgE, os resultados do trabalho ora apresentado não mostraram diferença estatística na produção deste anticorpo, entre pacientes com FC e indivíduos saudáveis, além disso, a suplementação também não mudou as concentrações de IgE. Sabe-se que na FC altos níveis de IgE estão, em geral, relacionados à aspergilose broncopulmonar alérgica (THIA & BALFOUR LYNN, 2009).

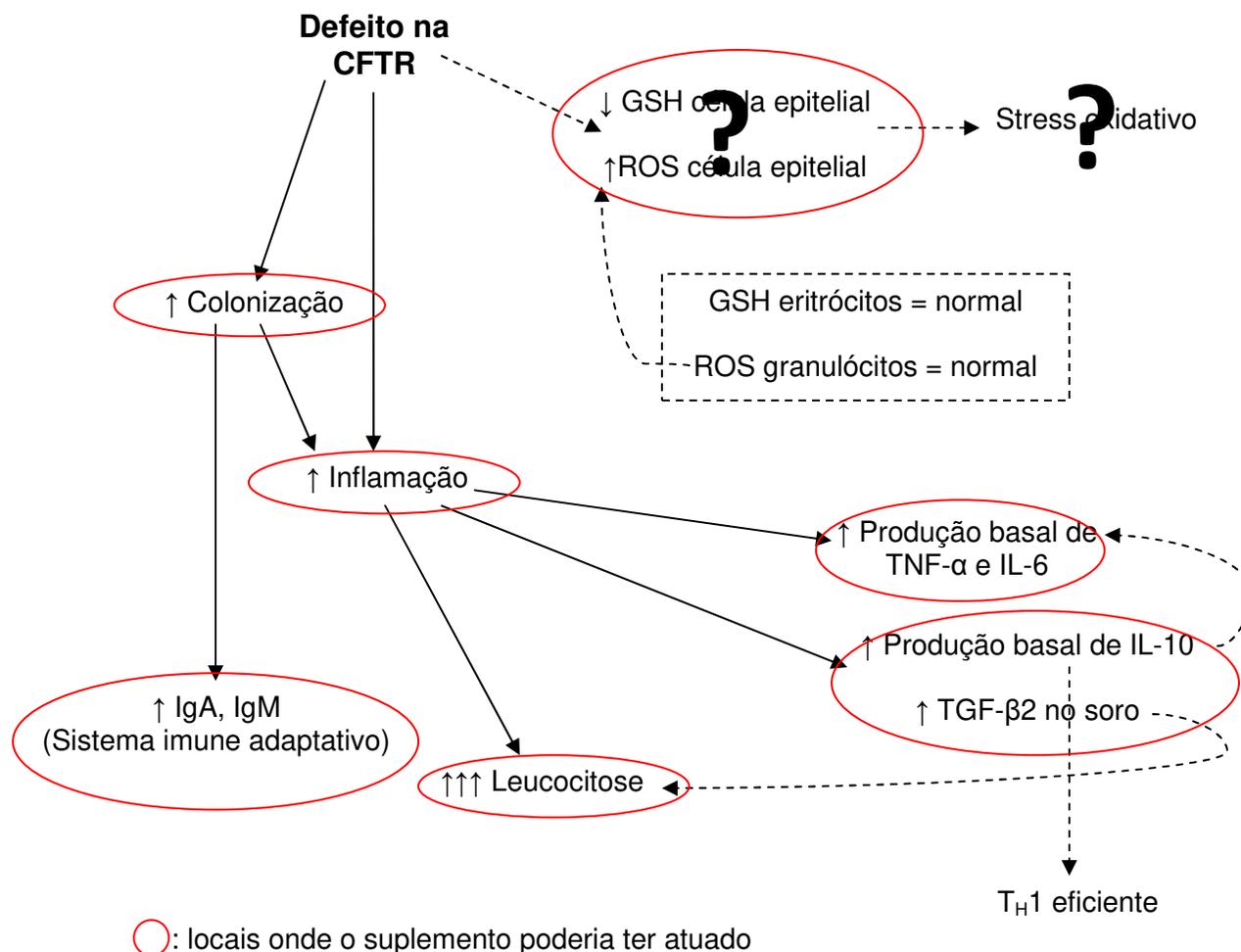


Figura 41: Representação esquemática da inflamação na fibrose cística associada aos resultados obtidos no trabalho. Sinalização dos locais onde o suplemento poderia ter atuado para modular positivamente a reação

O presente trabalho mostrou que a criança clinicamente estável com FC, consegue manter um balanço oxidante e antioxidante normal em células de sangue periférico que não expressam a CFTR. As altas concentrações de TNF-α e de IL-6 demandam uma maior produção de IL-10, o que foi observado. Embora a produção de TNF-α na presença de BCG tenha sido diminuída na FC, a resposta T_H1 permanece adequada e isso seria explicado pela produção normal de IFN-γ, sendo assim, a maior produção de IL-10 também parece ser a responsável pela regulação deste mecanismo. A maior produção de IgA e IgM confirmam um

sistema imune adaptativo normal frente ao estímulo freqüente da colonização bacteriana observada nesses indivíduos (Figura 41).

A suplementação com WPC-TGF β poderia ter atuado na redução da produção de citocinas inflamatórias que mostraram-se aumentadas nos sujeitos desta pesquisa (TNF- α e de IL-6), também poderia ter ocorrido uma conseqüente regulação na produção de IL-10 e na alta produção de leucócitos. Mesmo que nos tipos celulares avaliados, tenha sido encontrada uma regulação do sistema oxidante e antioxidante, não foi possível verificar se isso também estava acontecendo em nível epitelial, portanto a suplementação também poderia ser positiva no sentido de manter e/ou aumentar as quantidades celulares de glutathiona (Figura 41).

O trabalho apresentou alguns indícios de que a suplementação com WPC-TGF β poderia trazer benefícios na FC, entretanto, algumas perguntas ainda permaneceram tais como: A quantidade suplementada foi suficiente? O tempo de suplementação foi insuficiente? A mutação na CFTR contribuiu na redução da eficácia do produto? A terapia utilizada na FC interferiu nos resultados? A colonização e as freqüentes exacerbações prejudicaram a ingestão adequada do suplemento? A via mais eficaz de administração de precursores de glutathiona na FC, é a via oral? A dieta suporte, incluindo um complemento enzimático usado, teria modificado desfavoravelmente o modo de ação do WPC-TGF β ?

Dois conjuntos de fatores dificultaram sobremaneira interpretar e entender, em profundidade, porque a suplementação com o WPC, enriquecido com TGF e lactoferrina, não produziu os efeitos esperados nas crianças portadoras da FC: a) a composição do suplemento foi analisada quanto a sua composição centesimal mínima e perfil aminoacídico. Detalhes do processo de produção, integridade estrutural das proteínas e real concentração do TGF- β e da lactoferrina, não foram revelados pelo fabricante, pelo fato do produto ter sido objeto de solicitação de patente; b) Por motivos éticos e humanitários todas as análises foram feitas em células sanguíneas de sangue periférico e saliva, o que certamente não refletiu a

situação do processo inflamatório e infeccioso “*in situ*”, isto é, nos próprios órgãos e tecidos diretamente afetados na FC.

Observou-se que o suplemento WPC-TGF β enriquecido com lactoferrina foi capaz de aumentar significativamente os valores de RBC total e HGB, principalmente após os dois meses de suplementação, sugerindo, que a lactoferrina presente no suplemento tenha interferido na homeostase do Fe.

Kawakami, Hiratsuka e Dosako (1988) estiveram entre os pioneiros em levantar à hipótese de que a lactoferrina possui papel na absorção do ferro. Estudos recentes sugerem que a lactoferrina pode ser usada como um importante regulador do equilíbrio do ferro, principalmente em casos de anemia associada à gravidez (PAESANO *et al.*, 2009).

Em um estudo prospectivo, randomizado, duplo cego, controlado em 100 mulheres grávidas com anemia, submetidas à suplementação com lactoferrina bovina e com sulfato ferroso, não houve diferença significativa entre os dois suplementos, mostrando que a lactoferrina é tão eficaz quanto o sulfato ferroso no combate à anemia, além disso a lactoferrina apresentou vantagens por não causar efeitos colaterais no TGI dos participantes (NAPPI *et al.*, 2009). Outro estudo com 300 mulheres grávidas em diferentes períodos gestacionais, mostrou que a lactoferrina pode agir diretamente na homeostase do ferro ou indiretamente por meio de proteínas envolvidas no transporte do ferro do lúmen intestinal para o sangue (PAESANO *et al.*, 2009).

A lactoferrina, também possui efeito protetor na prevenção de anemia, em mulheres corredoras de longa distancia (KOIKAWA *et al.*, 2008) bem como em mulheres jovens (LÖNNERDAL & BRYANT, 2006).

Por outro lado, é consenso na literatura, que a lactoferrina possui um efeito antimicrobiano, inclusive sobre a *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacea*. Entretanto não foram observadas mudanças em relação à colonização dos pacientes suplementados com WPC enriquecido com lactoferrina, sugerindo, que em pacientes cronicamente infectados a suplementação via oral não

consegue reduzir a colonização. Neste contexto uma questão permanece sem resposta: A suplementação com lactoferrina iniciada em pacientes com FC neonatos, livres de infecção, pode retardar o início da colonização?

A avaliação do crescimento e do estado nutricional de indivíduos com FC é feita principalmente, pelo uso das medidas peso e estatura (MICHEL; MAQBOOL; HANNA, 2009) e por meio destes índices a literatura nacional têm mostrado uma alta prevalência de desnutrição e déficit do crescimento nos pacientes com fibrose cística (ADDE; RODRIGUES; CARDOSO, 2004; REIS *et al.*, 2000; FIATES *et al.* 2001).

O presente estudo revelou um baixo índice de desnutrição nos pacientes que iniciaram o estudo, o percentual de indivíduos classificados como com magreza, pelo índice IMC/I, foi inferior a 8% da amostra. Em relação à evolução estatural, também verificamos um baixo índice de indivíduos com baixa estatura para a idade, sendo inferior à 18% da amostra. Cabe ressaltar que estamos falando de indivíduos com escore clínico entre moderado e bom.

Não houve diferença estatística, nos escores-Z de IMC/I e E/I, para os pacientes suplementados com o placebo e com o WPC-TGF β , porém houve diferença estatística para os valores absolutos de peso e estatura. Também não foi encontrado diferença entre os grupos na avaliação da circunferência de braço e na circunferência muscular de braço, não havendo, portanto, alteração na massa magra dos pacientes. É provável que a ausência de diferenças estatística nos dados antropométricos, tenha ocorrido uma vez que os suplementos oferecidos (WPC-TGF β e caseína) eram isoprotéicos e isocalóricos .

ADDE *et al.* (1997), verificaram o efeito de um suplemento hipercalórico em pacientes fibrocísticos internados por um pequeno período de tempo, no qual foi avaliado índices de peso e altura. Os resultados mostraram que não houve mudanças significativas no escore-z dos pacientes suplementados, entretanto, mudanças na média de peso foram observadas, corroborando, portanto os resultados ora apresentados.

Observamos que no presente estudo houve diferença estatística na concentração de albumina no T1 entre os suplementos, sendo a mediana do grupo suplementado com WPC-TGF β mais elevada que a mediana do grupo placebo (caseína), podendo ser um reflexo da melhor composição aminoacídica do WPC-TGF β .

A albumina sérica é muito utilizada para avaliar estado nutricional, entretanto, possui meia vida longa o que à torna um índice pouco sensível a variações rápidas no estado nutricional (CUPPARI, 2005). Em casos de deficiência nutricional ela fica diminuída, entretanto, esta é uma proteína de fase aguda negativa, ou seja, na fase aguda do processo inflamatório também ocorre diminuição nas suas concentrações séricas (KOLETZKO, 2008).

A pré-albumina possui meia vida mais reduzida, sendo bastante sensível às variações na oferta protéico-energética (CUPPARI, 2005). Em relação à esta proteína, não houve mudanças significativas ao longo da suplementação, entretanto, foi observado que em muitos dos pacientes a concentração esteve abaixo dos valores de normalidade, podendo ser conseqüência do processo inflamatório dos fibrocísticos.

Em um estudo de intervenção nutricional em pacientes com fibrose cística, inicialmente foram verificadas baixas concentrações séricas de pré-albumina, as quais mostraram um gradual aumento após suplementação hipercalórica (ADDE *et al.*, 1997).

Estudos relatam que o catabolismo e deposição de proteínas provocam uma variedade de resultados, os quais culminam em diferenças no estado nutricional e saúde do paciente com FC (VAISMAN *et al.*, 1992; GEUKERS *et al.*, 2005). Sabe-se que fontes protéicas com melhor composição aminoacídica, como a do soro do leite por exemplo, podem contribuir para um incremento nutricional. Em geral, pacientes fibrocísticos que têm um adequado aporte energético também possuem suficiente e adequado aporte de proteína (KAWCHAK *et al.*, 1996; WHITE *et al.*, 2003).

Observou-se que não houve diferença estatística, na ingestão alimentar dos pacientes em função da suplementação, sugerindo que a participação na pesquisa não modificou a rotina alimentar dos pacientes.

A ingestão e as necessidades das vitaminas lipossolúveis são amplamente discutidas na literatura (SINAASAPPEL *et al.*, 2002), uma vez que a insuficiência pancreática com conseqüente esteatorréia pode levar à uma drástica redução na absorção das mesmas (DODGE & TURCK, 2006). A ingestão das vitaminas lipossolúveis avaliadas, em ambos os grupos, ficou inferior às recomendações, evidenciando assim a importância da suplementação para estes pacientes, o que tem sido feito de rotina.

7 CONCLUSÕES

A comparação das análises entre os pacientes com fibrose cística e indivíduos saudáveis, permitiu concluir que:

- Os pacientes mostraram que modulam o balanço oxidativo/antioxidativo, de modo que apresentaram estado redox semelhante ao de crianças saudáveis, ou seja, concentração de GSH e produção de ROS normal;
- A quantidade de leucócitos circulantes (neutrófilos, monócitos e linfócitos) foi maior nos pacientes. Evidenciando o recrutamento neutrofílico para o local da inflamação, o pulmão.
- A produção de citocinas em sobrenadante de cultura de pacientes com FC diferiu da produção de crianças saudáveis. A produção espontânea de TNF- α , IL-6, IL-10 e TGF- β 2 estavam aumentadas na FC. A produção de IL-6 em resposta à PHA também estava aumentada nos fibrocísticos. Por outro lado, os indivíduos saudáveis responderam melhor na produção de TNF- α em resposta ao estímulo de BCG.
- A concentração de IgA e IgG no soro de pacientes com FC foi maior que em indivíduos normais;

Em relação à avaliação nutricional dos pacientes com FC concluímos que:

- O estado nutricional dos pacientes que participaram da pesquisa apresentou-se bom, pois verificou-se um baixo índice de desnutrição nesta população com escore clínico entre moderado e bom;
- A albumina sérica apresentou-se estatisticamente mais elevada em indivíduos saudáveis;
- A pré-albumina esteve abaixo do parâmetro de normalidade para a maioria dos pacientes, podendo ser resultado do estado nutricional, bem como da inflamação;

- A ingestão alimentar dos pacientes com FC esteve adequada do ponto de vista energético, entretanto, apenas com a ingestão de alimentos é impossível atingir as necessidades de vitaminas lipossolúveis recomendadas para esta patologia, sendo, portanto, fundamental o uso de suplementos vitamínicos;
- O manejo nutricional adequado é fator determinante na evolução do paciente;

Nas condições utilizadas no presente estudo, a suplementação alimentar com concentrado protéico do soro de leite –enriquecido com TGF- β e lactoferina – em pacientes pediátricos com FC permitiram as conclusões:

- Não influenciou na concentração de glutathiona reduzida;
- Aumentou a estimulação basal de granulócitos para a produção de ROS, podendo esta, ser uma resposta adaptativa do organismo;
- Reduziu a produção de TNF- α em sobrenadante de cultura de células (CMSP) em resposta à PHA, além disso reduziu momentaneamente (T1) a produção de IL-10 em resposta à PHA;
- Atenuou a diferença estatística que existia, para TGF- β 2, antes da suplementação entre os grupos de pacientes de proteína teste e placebo;
- Não interferiu na concentração de imunoglobulinas séricas e de IgA salivar;
- Observou-se um aumento do número total de eritrócitos, e principalmente de hemoglobina, sugerindo um importante papel da lactoferrina no metabolismo do Fe;
- Aumentou a concentração de albumina sérica no T1 e não influenciou nos escores-Z de IMC/I e E/I;
- Não influenciou na colonização dos pacientes;

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Citocinas. In: ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p 267-301.

ADDE, F.V.; DOLCE, P.; TANIKAWA, C.E.; UEHARA, D.Y; CARDOSO, A.L.; ROZOV, T. Suplementação dietética em pacientes com fibrose cística. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.73, n.5, p.317-22, set./out. 1997.

ADDE, F.V.; RODRIGUES, J.C.; CARDOSO, A.L. Seguimento nutricional de pacientes com fibrose cística: Papel do aconselhamento nutricional. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.80, n.6, p.475-82, dez. 2004.

ANDERSEN, D. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. **American Journal Of Diseases Of Children**, Chicago, v.56, p.344-99, aug. 1938.

ARAI S. Global view on functional foods: Asian perspectives. **British Journal of Nutrition**, London, v.88, n.2, p.S139-S143, nov. 2002.

ARIS, R.M.; MERKEL, P.A.; BACHRACH, L.K.; BOROWITZ, D.S.; BOYLE, M.P.; ELKIN, S.L.; GUISE, T.A.; HARDIN, D.S; HAWORTH; C.S.; HOLICK, M.F.; JOSEPH, P.M.; O'BRIEN, K.; TULLIS, E.; WATTS, N.B.; WHITE, T.B. Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Philadelphia, v.90, n.3, p.1888-96, mar. 2005.

ARIS, R.M.; STEPHENS, A.R.; ONTJES, D.A.; DENENE BLACKWOOD A.; LARK, R.K.; HENSLER, M.B.; NEURINGER, I.P.; LESTER, G.E. Adverse Alterations in Bone Metabolism Are Associated with Lung Infection in Adults with Cystic Fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.162, p.1674-78, nov. 2000.

ARMSTRONG, D.S.; GRIMWOOD, K.; CARLIN, J.B.; CARZINO, R.; GUTIÉRREZ, J.P.; HULL, J.; OLINSKY, A.; PHELAN, E.M.; ROBERTSON, C.F.; PHELAN, P.D. Lower Airway Inflammation in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.156, p.1197-1204, oct. 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 16. ed. Washington: DC; 1995.

AVANUTRI [programa de computador]. Versão 3.0. São Paulo (Brasil): Avanutri Informática Ltda; 2006.

BALLATORI, N.; KRANCE, S.M.; NOTENBOOM, S.; SHI, S.; TIEU, K.; HAMMOND, C.L. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biological chemistry**, Berlin, n.390, p.191-214, mar. 2009.

BALOUGH, K.; McCUBBIN, M.; WEINBERGER, M.; SMITS, W.; AHRENS, R.; FICK, R.. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, New York, v.20, p.63-70, aug. 1995.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism**. New York: Churchill Livingstone, 1986. 126p.

BISGAARD, H.; PEDERSEN, S.S.; NIELSEN, K.G.; SKOV, M.; LAURSEN, E.M.; KRONBORG, G.; REIMERT, C.M.; HØIBY, N.; KOCH, C. Controlled trial of inhaled budesonide in patients with cystic fibrosis and chronic bronchopulmonary Pseudomonas aeruginosa infection. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.156, p.1190-96, oct. 1997.

BISHOP, C.; HUDSON, V.M.; HILTON, S.C.; WILDE, C. A pilot study of the effect of inhaled buffered reduced glutathione on the clinical status of patients with cystic fibrosis. **Chest**, Park Ridge, v.127, n.1, p.308-317, jan. 2005.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, aug. 1959.

BONCOEUR, E.; BONVIN, E.; MUSELET-CHARLIER, C.; HENRION-CAUDE, A.; GRUENERT, D.; CLEMENT, A.; JACQUOT, J.; TABARY, O. Oxidative stress induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase in cystic fibrosis lung epithelial cells: Potential mechanism for excessive IL-8 expression. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v.40, p.432-46, sep.2008.

BONFIELD, T.L.; KONSTAN, M.W.; BERGER, M. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, St. Louis, v.104, n.1, p.72-78, jul. 1999.

BONFIELD, T.L.; KONSTAN, M.W.; BURFEIND, P.; PANUSKA, J.R.; HILLIARD, J.B.; BERGER, M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, New York, v.13, n.3, p.257-61, sep. 1995a.

BONFIELD, T.L.; PANUSKA, J.R.; KONSTAN, M.W.; HILLIARD, K.A.; HILLIARD, J.B.; GHNAIM, H.; BERGER, M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.152, n.6, p.2111-18, dec. 1995b.

BORGES, P.F.Z.; SGARBIERI, V.S.; DIAS, N.F.G.P.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S. Produção Piloto de Concentrado de Proteínas de Leite Bovino: Composição e Valor Nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.4, p.1-8, 2001.

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey protein: role of glutathione. **Clinical and investigative medicine**, Quebec, v.14, n.4, p.296-309, aug. 1991.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P.A.L. Influence of dietary proteins on immune system of mice. **The Journal of nutrition**, Philadelphia. v.112, n.9, p.1747-55, sep. 1982.

BOUNOUS, G.; LETOURNEAU, L.; KINGSHAVN, P.A.L. Influence of dietary protein type on the immune system of mice. **The Journal of nutrition**, Philadelphia, v.113 n.7, p. 1415-12, jul. 1983.

BRAZOVA, J.; SISMOVA, K.; VAVROVA, V.; BARTOSOVA, J.; MACEK, M.; LAUSCHMAN, H.; SEDIVA, A. Polymorphisms of TGF-beta1 in cystic fibrosis patients. **Clinical immunology**, Orlando, .n.121, n. 3, p.350-7, dec. 2006.

BREMER, L.A.; BLACKMAN, S.M.; VANSKOY, L.L.; MCDUGAL, K.E.; BOWERS, A.; NAUGHTON, K.M.; CUTLER, D.J.; CUTTING, G.R. Interaction between a novel TGF- β 1 haplotype and CFTR genotype is associated with improved lung function in CF. **Human molecular genetics**, Oxford, v.17, n.14, p.2228-37, jul. 2008.

BRENNAN, S. Innate immune activation and cystic fibrosis. **Paediatric respiratory review**, London., v.9, n.4, p.271-280, dec. 2008.

BURNS, J.L.; EMERSON, J.; STAPP, J.R.; YIM, D.L.; KRZEWINSKI, J.; LOUDEN, L.; RAMSEY, B.W.; CLAUSEN, C.R. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, Chicago, v. 27, n.1, p.158-63, jul. 1998.

CANTIN, A. M.; BILODEAU, G.; OUELLET, C.; LIAO, J.; HANRAHAN, J.W. Oxidant stress suppresses CFTR expression. **American journal of physiology: Cell physiology**, Bethesda, n.290, v.1, p.C262–70, jan. 2006.

CANTIN, A. M.; WHITE, T. B.; CROSS, C. E.; FORMAN, H. J.; SOKOL, R. J.; BOROWITZ, D. Antioxidants in cystic fibrosis. Conclusions from the CF antioxidant workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003. **Free radical biology & medicine**, New York, v.42, n.1, p.15-31, jan. 2007.

CARDOSO, A.L.; GURMINI, J.; SPOLIDORO, J.V.N.; NOGUEIRA, R.J.N. Nutrição e fibrose cística. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, Porto Alegre, v.22, n.2, p.146-54, abr./jun. 2007

COLOMBO, C.; RUSSO, M.C.; ZAZZERON, L.; ROMANO, G. Liver disease in cystic fibrosis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v.43, n.1, p.S49-55, jul. 2006.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v.284, n.5418, p.1318-22, may. 1999.

COURTNEY, J.M.; ENNIS, M.; ELBORN, J.S. Cytokines and inflammatory mediators in Cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, Amsterdam, v.3, n.4, p.223-231, dec. 2004

CUPPARI, L. Nutrição Clínica no Adulto. (2.ed). São Paulo: Manole; 2005

DASENBROOK, E.C.; MERLO, C.A.; DIENER-WEST, M.; LECHTZIN, N.; BOYLE, M.P. Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV1

decline in cystic fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.178, n.8, p.814-21, apr. 2008

DAVIS, P.B. Cystic fibrosis since 1938. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.173, n.5, p.475-482, mar. 2006.

DEAN, T.P.; DAI, Y.; SHUTE, J.K.; CHURCH, M.K.; AND WARNER, J.O. Interleukin-8 Concentrations are Elevated in Brochoalveolar Lavage, Sputum and Sera of Children with Cystic Fibrosis. **Pediatric research**, Baltimore, v.34, n.2, p.159-61, aug. 1993.

DI SANT'AGNESE, P.A.; DARLING, R.C.; PERERA, G.A.; SHEA, E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas: clinical significance and relationship to the disease. **Pediatrics**, Evanston, v.12, n.5, p.549-63, nov. 1953.

DIETARY REFERENCE INTAKE (DRI). **Dietary Reference Intakes - The essential guide to nutrient requirements**. Washington (DC): National Academy Press, 2006.

DIETARY REFERENCE INTAKE (DRI). **Dietary Reference Intake for energy, carbohydrates, fiber, fat, protein and amino acids (Macronutrients)**. Institute of Medicine (IOM), 2002. Acesso em: 26 out. 2008. Disponível em: <http://www.nap.edu/openbook/0309085373/html/1.html>.

DIETARY REFERENCE INTAKE (DRI). **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington (DC): National Academy Press, 2002.

DIETARY REFERENCE INTAKE (DRI). **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids**. Washington (DC): National Academy Press, 2000.

DIETARY REFERENCE INTAKE (DRI). **Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride**. Washington (DC): National Academy Press, 1997.

DIMANGO, E.; RATNER, A.J.; BRYAN, R.; TABIBI, S.; PRINCE, A. Activation of NFkappaB by adherent Pseudomonas aeruginosa in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. **The Journal of clinical investigation**, New York, v.101, n.11, p.2598-2605, jun. 1998.

DODGE, J.A.; TURCK, D. Cystic fibrosis: Nutritional consequences and management. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, London, v.20, n.3, p.531-46, 2006.

EIGEN, H.; ROSENSTEIN, B.; FITZSIMMONS, S.; SCHIDLOW, D.V. A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. **The Journal of pediatrics**, St. Louis, v.126, n.4, p.515-23, apr. 1995.

ELIZUR, A.; CANNON, C.L.; FERKOL, T.W. Airway Inflammation in Cystic Fibrosis. **Chest**, Park Ridge, v.133, n.2, p.489-495, feb. 2008.

EMMENDÖRFFER, A.; HETCHT, M.; LOHMANN-MATTHES, M.L.; ROESLER, J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v.131, n.6, p.269-75, jul. 1990.

FARBER, S. Pancreatic function and disease in early life. I. Pancreatic enzyme activity and the celiac syndrome. **The Journal of clinical investigation**, New York, v.22, n.6, p.827:38, nov. 1943.

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**, Campinas, v.14, n.2, p.95-101, mai./ago. 2001.

FRANCOEUR, C.; DENIS, M. Nitric oxide and interleukin-8 as inflammatory components of cystic fibrosis. **Inflammation**, New York v.19, n.5, p.587-98, oct. 1995.

FRISANCHO, A.R. **Anthropometric Standards for the assessment of growth and nutritional status**. Ann Arbor: University of Michigan Press, 1990. 189p.

GAINES, H.; ANDERSSON, L; BIBERFELD, G. A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow

cytometry. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v.195, n. 1/2, p.63-72, 1996.

GAO, L.; KIM, K.J.; YANKASKAS, J.R.; FORMAN, H.J. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. **American journal of physiology**, Bethesda, v.277, n.1pt1, p.113-8, jul. 1999.

GENESTRA, M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cellular Signalling**, Oxford, v.19, n.9, p.1807-19, sep. 2007.

GEUKERS, V.G.M.; OUDSHOORN, J.H.; TAMINIAU, J.A.J.M.; van der ENT, C.K.; SCHILTE, P.; RUITER, A.F.; ACKERMANS, M.T.; ENDERT, E.; JONKERS-SCHUITEMA, C.F.; HEYMANS, H.S.; SAUERWEIN, H.P. Short-term protein intake and stimulation of protein synthesis in stunted children with cystic fibrosis. **The American journal of clinical nutrition**, Bethesda, v.81, n. 3, p.605-10, mar. 2005.

GRAPHPAD PRISM [programa de computador]. Version 4.0, GraphPad Software, EUA.

GREENBERGER, P.A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, St. Louis, v.110, n.5. p.685–92, nov. 2002.

GREY, V.; MOHAMMED, S.R.; SMOUNTAS, A.A.; BAHLOOL, R.; LANDS, L.C. Improved glutathione status in young adult patients with cystic fibrosis supplemented with whey protein. **Journal of Cystic Fibrosis**, Amsterdam, v.2, n.4, p.195-8, dec. 2003.

GRIMBLE, R.F. Immunonutrition. **Current opinion in gastroenterology**, Philadelphia, v.21, n.2. p.216-22, mar. 2005.

GUGLER, E.; PALLAVICINI, J.C.; SWEDLOW, H.; ZIPKIN, I.; AGNESE. P.A. Immunological studies of submaxillary saliva from patients with cystic fibrosis and from normal children. **The Journal of pediatrics**, St. Louis, v.73, n.4, p.548-59, oct. 1968.

HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. **The Journal of nutritional biochemistry**, Stoneham, v.14, n.5, p.251-8, may. 2003.

HALLBERG, K.; MATTSSON-RYDBERG, A.; FÄNDRIKS, L.; STRANDVIK, B. Gastric IgA in cystic fibrosis in relation to the migrating motor complex. **Scandinavian Journal of gastroenterology**, Oslo, v.36, n.8, p.843-8, aug. 2001

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; de PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.19, n.4, p.479-88, jul./ago. 2006.

HECKER, T.M.; ARIS, R.M. Management of osteoporosis in adults with cystic fibrosis. **Drugs**, New York, v.64, n.2, p.133-47, 2004.

HEYS, S.D.; SCHOFIELD, A.C.; WAHLE, K.W.J. Immunonutrition in clinical practice: what is the current evidence? **Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral**, Madrid, v.19, n.6, p.325-32, nov./dec. 2004.

HODSON, M.E.; MORRIS, L.; BATTEN, J.C. Serum immunoglobulins and immunoglobulin G subclasses in cystic fibrosis related to the clinical state of the patient. **The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology**, Copenhagen, v.1, n.8:701-5, aug.1988.

IONESCU, A.A.; NIXON, L.S.; EVANS, W.D.; STONE, M.D.; LEWIS-JENKINS, V.; CHATHAM, K.; SHALE, D.J. Bone Density, Body Composition, and Inflammatory Status in Cystic Fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.162, n.3pt1, p.789-94, sep. 2000.

ISLES, A.; MACLUSKY, I.; COREY, M.; GOLD, R.; PROBER, C.; FLEMING, P.; LEVISON, H. Pseudomonas cepacia infection in cystic fibrosis: an emerging problem. **The Journal of pediatrics**, St. Louis, v.104, n.2, p.206-210, feb. 1984.

JACQUOT, J.; TABARY, O.; ROUZIC, P.L.; CLEMENT, A. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, Oxford, v.40, n.9, p.1703-15, feb. 2008.

JENSSEN, H.; HANCOCK, R.E.W. Review: Antimicrobial properties of lactoferrin. **Biochimie**, Paris, v.91, n.1, p.19-29, jan. 2009.

KALISH, L.A.; WALTZ, D.A.; DOVEY, M.; POTTER-BYNOE, G.; MCADAM, A.J.; LIPUMA, J.J.; GERARD, C.; GOLDMANN, D. Impact of Burkholderia dolosa on lung function and survival in cystic fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.173, n.4, p.421-5, feb. 2006.

KARIYA, C.; LEITNER, H.; MIN, E.; HEECKEREN, C.V.; HEECKEREN, A.V.; DAY, B.J. A role for CFTR in the elevation of glutathione levels in the lung by oral glutathione administration. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, Bethesda, v.292, n.6, p.L1590-97, jun. 2007.

KARPATI, F.; HJELTE, F.L.; WRETLIND, B. TNF-a and IL-8 in Consecutive Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients During Antibiotic Treatment. **Scandinavian journal of infectious diseases**, Stockholm, v.32, n.1, p.75-9, 2000.

KAWAKAMI, H.; HIRATSUKA, M.; DOSAKO, S. Effects of Iron-saturated Lactoferrin on Iron Absorption. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.52, n.4, p.903-8, apr. 1988.

KAWCHAK, D.A.; ZHOA, H.; SCANLIN, T.F.; TOMEZSKO, J.L.; CNAAN, A.; STALLINGS, V.A. Longitudinal, prospective analysis of dietary intake in children with cystic fibrosis. **The Journal of pediatrics**, St. Louis, v.129, n.1, p.119-29, jul. 1996.

KELLY, F.J. Glutathione : in defence of lung. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, Oxford, v.37, n. 9/10, p.963-6, sep./oct. 1999.

KELLY, Y.; SACKER, A.; MARMOT, M. Nutrition and respiratory health in adults: findings from the health survey for Scotland. **The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology**, Copenhagen, v.21, n.4, p.664-7, apr. 2003.

KEREM, B.; ROMMENS, J.M.; BUCHANAN, J.A.; MARKIEWICZ, D.; COX, T.K.; CHAKRAVARTI, A.; BUCHWALD, M.; TSUI, L.C. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**, Washington, v.245, n.4922, p.1073-80, sep. 1989.

KITTS, D.D.; WEILER, K. Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. **Trends in food science and technology**, Cambridge, v.16, n. 12, p.549-54, dec. 2005.

KOIKAWA, N.; NAGAOKA, I.Y.; YAMAGUCHI, M.; HAMANO, H.; YAMAUCHI, K.; SAWAKI, K. Preventive Effect of Lactoferrin intake on Anemia in Female Long Distance Runners. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Tokyo, v.72, n.4, p.931-5, apr. 2008

KOLETZKO, B. **Pediatric Nutrition in Practice**. Basel: Karger, 2008. 1-305p.

KREMER, T.M.; ZWERDLING, R.G.; MICHELSON, P.H.; O`SULLIVAN, B.P. Intensive care management of the patient with cystic fibrosis. **Journal of Intensive Care Medicine**, Cambridge, v.23, n.3, p.159-77, may./jun. 2008.

KRISSANSEN, G.W. Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical Implications. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v.26, v.6, p.713S-23S, dec. 2007.

KRONBORG, G.; HANSEN, M.B.; SVENSON, M.; FOMSGAARD, A.; HOIBY, N.; BENDTZEN, K. Cytokines in sputum and serum from patients with CF and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection as markers of destructive inflammation in the lungs. **Pediatric Pulmonology**, New York, v.15, n.5, p.292- 7, may. 1993.

KUBE, D.; SONTICH, U.; FLETCHER, D.; DAVIS, P.B. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, Bethesda, v. 280, n.3, p.L493-502, mar. 2001.

LAJOLO, F.M. Functional foods: Latin American perspectives. **British Journal of Nutrition**, London, v.88, v.2, p.S145-50, nov. 2002.

LANDS, L.C.; ISKANDAR, M.; BEAUDOIN, N.; MEEHAN, B.; DAULETBAEV, N.; BERTHIUAME, Y. Dietary Supplementation with Pressurized Whey in Patients with Cystic Fibrosis. **Journal of medicinal food**, New Rochelle, v.13, n.1, p.77-82, feb. 2010

LANDS, L.C.; GREY, V.; SMOUNTAS, A.A.; KRAMER, V.G.; MCKENNA, D. Lymphocyte glutathione levels in children with cystic fibrosis. **Chest**, Park Ridge, v.116, n.1, p 201-5, jul. 1999

LASKOWSKA-KLITA, T.; CHECHOWSKA, M. Antioxidant status in erythrocytes of cystic fibrosis children. **Acta biochimica Polonica**, Warsaw, v.48, n.1, p.283-5, 2001.

LEVY, E.; GURBINDO, C.; LACAILLE, F.; PARADIS, K.; THIBAUT, L.; SEIDMAN, E. Circulating Tumor Necrosis Factor- α and Lipid abnormalities in patients with cystic fibrosis. **Pediatric research**, Baltimore, v.34, n.2, p.162-3, aug. 1993.

LEVY, J. Immunonutrition: The pediatric experience. **Nutrition**, Burbank, v.14, n.7/8, p.641-7 jul./aug. 1998.

LI, E.W.Y.; MINE, Y. Immunoenhancing Effects of Bovine Glycomacropeptide and Its Derivatives on the Proliferative Response and Phagocytic Activities of Human Macrophagelike Cells, U937. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.52, n.9, p.2704-8, may. 2004.

LIPUMA, J.J. Burkholderia cepacia. Management issues and new insights. **Clinics in chest medicine**, Philadelphia, v.19, n.3, p473-86, sep.1998.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F.; MARTORELL, R. **Anthropometric Standardization Reference Manual**. Champaign: Human Kinetics, 1988.

LÖNNERDAL, B.; BRYANT, A. Absorption of iron from recombinant human lactoferrin in young US women. **The American journal of clinical nutrition**, Bethesda, v.83, n.2, p.305-9, feb. 2006.

LOTHIAN, B.; GREY, V.; KIMOFF, J.; LANDS, L.C. Treatment of Obstrutive Airway Disease with a Cysteine Donor Protein Supplement. **Chest**, Park Ridge, v.17, n.3, p.914-6, mar. 2000.

MÁIZ, L.; CUEVAS, M.; LAMAS, A.; SOUSA, A.; QUIRCE, S.; SUÁREZ, L. *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in Cystic Fibrosis: Clinical Significance and Specific Immune Response Involving Serum Immunoglobulins G, A, and M. **Archivos de Bronconeumologia**, Barcelona, v.44, n.3, p.146-51, mar. 2008.

MANGIONE, S.; PATEL, D.D.; LEVIN, B.R.; FIEL, S.B. Erythrocytic glutathione in cystic fibrosis. A possible marker of pulmonary dysfunction. **Chest**, Park Ridge, v.105, n.5, p.1470-3, may. 1994.

MARSHALL, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. **Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic**, Saindpoint, v.9, n.2, p.136-56, jun. 2004.

MASELLI, J.H.; SONTAG, M.K.; NORRIS, J.M.; MACKENZIE, T.; WAGENER, J.S.; ACCURSO, F.J. Risk factors for initial acquisition of pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis identified by newborn screening. **Pediatric Pulmonology**, New York, v.35, n.4, p.257-62, apr. 2003.

MATTHEWS WJ JR, WILLIAMS M, OLIPHINT B, GEHA R, COLTEN HR. Hypogammaglobulinemia in patients with cystic fibrosis. **The New England journal of medicine**, Boston, v.302, n.5, p.245-9, jan. 1980.

McELVANEY, N.G.; NAKAMURA, H.; BIRRER, P.; HÉBERT, C.A.; WONG, W.L.; ALPHONSO, M.; BAKER, J.B.; CATALANO, M.A.; CRYSTAL, R.G. Modulation of Airway Inflammation in Cystic Fibrosis. In vivo suppression of interleukin-8 levels on the respiratory epithelial surface by aerosolization of recombinant secretory leukoprotease inhibitor. **The Journal of clinical investigation**, New York. v.90, n.4, p.1296-301, oct. 1998.

McINTOSH G.H.; ROYLE P.J.; LE LEU R.K.; REGESTER G.O.; JOHNSON M.A.; GRINSTED R.L.; KENWARD R.S.; SMITHERS, G. W. Whey proteins as functional food ingredients? **International dairy journal**, Barking, v.8, n.5/6, p.425-34, sep. 1998.

MICHEL, S.H.; MAQBOOL, A.; HANNA, M.D.; MASCARENHAS, M. Nutrition management of pediatric patients Who have cystic fibrosis. **Pediatric clinics of North America**, Philadelphia, v.56, n.5, p.1123-41, oct. 2009.

MIKAMI, M.; LLEWELLYN-JONES, C.G.; BAYLEY, D.; HILL, S.L.; STOCKLEY, R.A. The Chemotactic Activity of Sputum from Patients with Bronchiectasis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v. 157, n.3pt1, p.723-8, mar. 1998

MILLA, C.E. Nutrition and lung disease in cystic fibrosis. **Clinics in chest medicine**, Philadelphia, v.28, n.2, p.319-30. Jun. 2007.

MIYAUCHI, H.; KAINO, A.; SHINODA, I.; FUKUWATARI, Y.; HAYASAWA, H. Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate on murine splenocytes and Peyer's patch cells. **Journal of dairy science**, Champaign, v.80, n.10, p.2330-9, oct. 1997.

MORAN, A, DOHERTY L, WANG X, THOMAS, W. Abnormal glucose metabolism in cystic fibrosis. **The Journal of pediatrics**, St. Louis, v.133, n.1, p.10-7, jun. 1998.

MORENO, Y.M.F. **Proliferação celular e citocinas BCG específicos em crianças com AIDS: efeito de suplementos nutricionais**. 2007, 243f. Tese. (Doutorado na Saúde da Criança e do Adolescente) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MOSER, C.; KJAERGAARD, S.; PRESSLER, T.; KHARAZMI, A.; KOCH, C.; HØIBY, N. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. **APMIS: Acta pathologica microbiologica et immunologica scandinavica**, Copenhagen. v.108, n.5, p.329-35, may. 2000

MOSS, R.B. Hypergammaglobulinemia in cystic fibrosis. Role of *Pseudomonas* endobronchial infection. **Chest**, Park Ridge, v.91, n.4, p.522-6, apr. 1987

MOSS, R.B.; BOCIAN, R.C.; HSU, Y.P.; DONG, Y.J.; KEMNA, M.; WEI, T.; GARDNER, P. Reduced IL-10 secretion by CD4+ lymphocytes expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). **Clinical and experimental immunology**, London, v.106, n.2, p.374-88, nov. 1996.

MULLALLY, M.M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R.J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. **International Dairy Journal**, Barking, v.7, n.5, p.229-303, may. 1997.

NAPPI, C.; TOMMASELLI, G.A.; MORRA, I.; MASSARO, M.; FORMISANO, C.; DI CARLO, C. Efficacy and tolerability of oral bovine lactoferrin compared to ferrous sulfate in pregnant women with iron deficiency anemia: a prospective controlled

randomized study. **Acta obstetricia et gynecologica scandinavica**, Stockholm, v.88, n.9, p.1031-5, 2009.

NICHOLS, D.; CHMIEL, J.; BERGER, M. Chronic inflammation in the cystic fibrosis lung: Alterations in inter- and intracellular signaling. **Clinical reviews in allergy and immunology**, Totowa, v.34, n.2, p.146-62, apr. 2008.

NIXON, L.S.; YUNG, B.; BELL, S.C.; ELBORN, J.S.; SHALE, D.J. Circulating Immunoreactive Interleukin-6 in Cystic Fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.157, n. 6pt1, p.1764-9, jun 1998.

NOAH, T.L.; BLACK, H.R.; CHENG, P.W.; WOOD, R.E.; LEIGH, M.W. Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 175, n.3, p.638-47, mar. 1997.

NORMAN, D.; ELBORN, J.S.; CORDON, S.M.; RAYNER, R.J.; WISEMAN, M.S.; HILLER, E.J.; . Plasma tumour necrosis factor alpha in cystic fibrosis. **Thorax**, London, v.46, n.2, p.91-5, feb. 1991.

NTIMBANE, T.; KRISHNAMOORTHY, P.; HUOT, C.; LEGAULT, L.; JACOB S.V.; BRUNET, S.; LEVY, E.; GUÉRAUD, LANDS, L.C.; COMTE, B. Oxidative stress and cystic fibrosis-related diabetes: A pilot study in children. **Journal of Cystic Fibrosis**, Amsterdam, v.7, n. 5, p.373-84, sep. 2008.

O`SULLIVAN, B.P.; FREEDMAN, S.D. Cystic fibrosis. **Lancet**, London, v.373, n.9678, p1891-904, may. 2009.

OLIVEIRA, A.F.; OLIVEIRA, F.L.C.; JULIANO, Y.; ANCONA-LOPES, F. Evolução nutricional de crianças hospitalizadas e sob acompanhamento nutricional. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.18, n.3, p341-8, may./jun. 2005

OLIVIER, K.N.; WEBER, D.J.; WALLACE, R.J. Jr; FAIZ, A.R.; LEE, J.H.; ZHANG, Y.; BROWN-ELLIOT, B.A.; HANDLER, A.; WILSON, R.W.; SCHECHTER, M.S.; EDWARDS, L.J.; CHAKRABORTI, S.; KNOWLES, M.R. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.167, n.6, p.828-34, mar. 2003.

OROWITZ, D. The interrelationship of nutrition and pulmonary function in patients with cystic fibrosis. **Current opinion in pulmonary medicine**, Philadelphia, v.2, n.6, p.457-61, nov. 1996.

OSIKA, E.; CAVAILLON, J.M.; CHADELAT, K.; BOULE, M.; FITTING, C.; TOURNIER, G.; CLEMENT, A. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. **European respiratory journal: official journal of European Society for Clinical Respiratory Physiology**, Copenhagen, v.14, n.2, p.339-46, aug.1999.

OYA, V. **Imunidade Celular para o BCG na Doença de Crohn: efeito de proteínas de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β** . 165f. Dissertação. (Mestrado na Saúde da Criança e do Adolescente) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on câncer therapy. **Journal of pharmaceutical sciences**, Washington, v.96, n.9, p.2181-96, sep. 2007.

OZTURK, Y.; BUYUKGEBIZ, B.; ARSLAN, N.; ELLIDOKUS, H. Effect of hospital stay on nutritional anthropometric data in Turkish children. **Journal of tropical pediatrics (1980)**, London. v.49, n.3, p.189-90, jun. 2003.

PACHECO, M.T.B.; ANTUNES, A.E.C.; SGARBIERI, V.C. New technologies and physiological functional properties of milk proteins. In: BOSCOE, A.B.; LISTOW, C.R. **Protein Research Progress**. New York: Nova Science Publishers. 2008. 117-68p.

PAESANO, R.; PIETROPAOLI, M.; GESSANI, S.; VALENTI, P. The influence of lactoferrin, orally administered, on systemic iron homeostasis in pregnant women suffering of iron deficiency and iron deficiency anaemia. **Biochimie**, Paris, v.91, n.1, p.44-51, jan. 2009.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica chimica acta: International journal of clinical chemistry and medical biochemistry**, Amsterdam, v.333, n.1, p.19-39, jul. 2003.

PELLEGRINI, A.; DETTLING, C.; THOMAS, U.; HUNZIKER, P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine-lactoglobulin. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam v.1526, n.2, p.131-40, may. 2001.

PELLEGRINI, A.; THOMAS, U.; BRAMAZ, N.; HUNZIKER, P.; VON FALLENBERG, R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine μ -lactalbumin molecule. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam v. 1426, n.3, p.439-48, fev, 1999.

PENNA, S.P. **Níveis de glutathiona reuzida e atividade da catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em indivíduos expostos ao vapor de mercúrio.** 1995. 77f. Dissertação (Mestre em Farmacologia) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

POULIOT, Y.; GAUTHIER, S.F. Milk growth factors as a health products: some technological aspects. **International dairy journal**, Barking, v.16, n.11, p.1415-20. Nov. 2006.

PUKHALSKY, A.L.; KAPRANOV, N.I.; KALASHNIKOVA, E.A.; SHMARINA, G.V.; SHABALOVA, L.A.; KOKAROVTSOVA, S.N.; PUKHALSKAYA, D.A.; KASHIRSKAJA, N.J.; SIMONOVA, O.I. Inflammatory markers in cystic fibrosis patients with lung Pseudomonas aeruginosa infection. **Mediators of inflammation**, New York, v.8, n.3. p.159-67. 1999

QUINTON, P.M. Chloride impermeability in cystic fibrosis. **Nature**, London, v.301, n.5899, p.421-2, feb.1983.

RAQIB, R.; CRAVIOTO, A. Nutrition, immunology, and genetics: future perspectives. **Nutrition Reviews**, New York, v.67, n.2, p.S227–36, nov. 2009.

RASKIN, S.; PHILLIPS, J.A.; KRISHNAMANI, M.R.; VENENCAK-JONES, C.; PARKER, R.A.; ROZOV, T.; CARDIERI, J.M.; MAROSTICA, P.; ABREU, F.; GIUGLIANI, R. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. **American journal of medical genetics**, New York, v.46, n. 6, p.665-9, jul. 1993.

RATJEN, F.A. Cystic fibrosis: patogenesis and future treatment strategies. **Respiratory care**, Dallas, v.54, n.5, p.595-605, may. 2009.

REGESTER, G.O.; MCINTOSH, G.H.; LEE, V.W.K.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, Sydney, v.48, n.3, p.123-127, sep. 1996.

REIS, F.J.C.; OLIVEIRA, M.C.L; PENNA, F.J.; OLIVEIRA, M.G.R.; OLIVEIRA, E.A.; MONTEIRO, A.P.A.F. Quadro clínico e nutricional de pacientes com fibrose cística: 20 anos de seguimento no HC-UFMG. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.46, n.4, p.325-30, out./dez. 2000.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. Revisão: A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience journal (Impressa)**, Uberlandia, v.21, n.3, p.133-49, set./dez. 2005.

RIBEIRO, A.F.; RIBEIRO, J.D.; RIBEIRO, M.A.G.O. Fibrose cística. In: LOPES, A.C. **Tratado de clínica médica** (2.ed.). São Paulo: Roca, 2009.

RIBEIRO, J.D.; RIBEIRO, M.A.G.O.; RIBEIRO, A.F. Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.78, n.2, p.S171-86, nov./dez. 2002.

RICHARDSON, M.P.; AYLIFFE, M.J.; HELBERT, M.; DAVIES, E.G. A simple flow cytometry assay using dihidrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v.219, n. 1/2, p.187-93, oct. 1998.

RIORDAN, J.R.; ROMMENS, J.M.; KEREM, B.; ALON, N.; ROZMAHEL, R.; GRZELCZAK, Z.; ZIELENSKI, J.; LOK, S.; PLAVSIC, N.; CHOU, J.L. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. **Science**, Washington, v.245, n.4922, p.1066–73, sep. 1989.

ROSENSWEIG, J.N.; OMORI, M.; PAGE, K.; POTTER, C.J.; PERLMAN, E.J.; THORGEIRSSON, S.S.; SCHWARZ, K.B. Transforming growth factor-beta1 in plasma and liver of children with liver disease. **Pediatric research**, Baltimore, v.44, n. 3, p.402-9, sep. 1998.

ROBERFROID, M.B. Global view on functional foods: European perspectives. **British Journal of Nutrition**, London, v.88, n.2, p.S133-S138, nov. 2002.

ROMMENS, J.M.; IANNUZZI, M.C.; KEREM, B.; DRUMM, M.L.; MELMER, G.; DEAN, M.; ROZMAHEL, R.; COLE, J.L.; KENNEDY, D.; HIDAKA, N. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. **Science**, Washington, v.245, n.4922, p.1059-65, sep. 1989.

ROTTNER, M.; FREYSSINET, J.M.; MARTÍNEZ, M.C. Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. **Respiratory Research**, London, v. 13, p.10:23, mar. 2009.

ROY, M.K.; KUWABARAI, Y.; HARA, K.; WATANABE, Y.; TORNAL, Y. Peptides from bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. **Journal of dairy science**, Champaign. v.85, n.9, p.2065-74, sep. 2002.

RUSU, D.; DROUIN, R.J.; POULIOT, Y.; GAUTHIER, S.; POUBELLE, P.E. A Bovine Whey Protein Extract Can Enhance Innate Immunity by Priming Normal Human Blood Neutrophils. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.139, n.2, p.386-93, feb. 2009.

SAGEL, S.D.; ACCURSO, F.J. Monitoring inflammation in CF (Cytokines). **Clinical Reviews in allergy and immunology**, Totowa, v.23, n.1, p.41-57, aug. 2002.

SANTOS, C.I.S.; RIBEIRO, J.D.; RIBEIRO, A.F.; HESSEL, G. Análise crítica dos escores de avaliação de gravidade da fibrose cística: Estado da arte. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v.30, n.3., p286-98, mai./jun. 2004.

SCRIMSHAW, N.S. Prologue: Historical Introduction – Immunonutrition in health and disease. **British Journal of Nutrition**, London, v.88, n.2, p. S145-50, oct. 2002.

SÉVERIN, S.; WENSHUI, X. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. **Critical reviews in food science and nutrition**, Boca Raton. v.45, n.7/8, p.645-56, 2005.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.4, p.397-409, out./dez. 2004.

SGARBIERI, V.C.; ZIEGLER, F.L.F; CASTRO, G. Componentes do Leite e Sistema Imune. In: ANTUNES, A.E.C.; PACHECO, M.T.B. **Leite para Adultos - Mitos e Fatos Frente à Ciência**. (1. ed.) São Paulo: Varela, 2009. 291-329p.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades-degradações-modificações**. São Paulo: Varela; 1996. 517p.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.1/2, p.17-9, 1998.

SHAH, P.L.; SCOTT, S.F.; KNIGHT, R.A.; HODSON, M.E. The effects of recombinant human DNase on neutrophil elastase activity and interleukin-8 levels in the sputum of patients with cystic fibrosis. **European respiratory journal: official journal of European Society for Clinical Respiratory Physiology**, Copenhagen, v.9, n.3, p.531-4, mar.1996.

SINAASAPPEL, M.; STERN, M.; LITTLEWOOD, J.; WOLFE, S.; STEINKAMP, G.; HEIJERMAN, H.G.M.; ROBBERECHT, E.; DORING, G. Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. **Journal of Cystic Fibrosis**, Amsterdam, v.1, n.2, p.51-75, jun. 2002.

SOLTYS, J.; BONFIELD, T.; CHMIEL, J.; BERGER, M. Functional IL-10 deficiency in the lung of cystic fibrosis (cftr^{-/-}) and IL-10 knockout mice causes increased expression and function of B7 costimulatory molecules on alveolar macrophages. **Journal of immunology**, Baltimore, v.168, n.4, p.1903-10, feb. 2002.

SOUTH, M.; WARWICK, W.; WOLLHEIM, F.; GOOD, R. The IgA system. IgA levels in the serum and saliva of pediatric patients evidence for a local immunological system. **Journal of pediatrics**, St. Louis, v.71, n.5, p.645-53, nov. 1967.

SPSS® FOR WINDOWS® [programa de computador]. Version 7.5.1. SPSS Inc(EUA), 1989-1996.

STAROSTA, V.; GRIESE, M. Protein oxidation by chronic pulmonary diseases in children. **Pediatric Pulmonology**, New York, v.4, n.1, p.67-73, jan. 2006.

STRAUSBAUGH, S.D.; DAVIS, P.B. Cystic fibrosis: A review of epidemiology and pathology. **Clinics in Chest Medicine**, Philadelphia, v.28, n.2, p.279-88, jun. 2007.

SUTER, S.; SCHADD, U.D.; ROUX-LOMBARD, P.; GIARARDIN, E.; GRAU, G.; DAYER, J.M. Relation between TNF and granulocyte elastase alpha-1 proteinase

inhibitor complexes in the plasma of patients with CF. **American review of respiratory disease**, New York, v.140, n.6, p.1640-4, dec. 1989

TEN KATE, L.P. Cystic fibrosis in the Netherlands. **International journal of epidemiology**, London, v.6, n.1, p.23-34, mar. 1977.

TERRY, A.M. Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? **American journal of physiology: cell physiology**, Bethesda, v.291, n.2, p.218-30, aug. 2006

THIA, L.P.; BALFOUR LYNN, I.M. Diagnosing allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. **Paediatric respiratory reviews**, London, v.10, n.1, p.37-42, mar. 2009.

THOMSON, M.A.; QUIRK, P.; SWANSON, C.E. Nutritional growth retardation is associated with defective lung growth in cystic fibrosis: a preventable determinant of progressive pulmonary dysfunction. **Nutrition**, Burbank, v.11, n.4, p.350-4, jul./aug. 1995.

TIROUVAZIAM, R.; KHAZAAL, I.; PEAULT, B. Primary inflammation in human cystic fibrosis small airways. **American journal of physiology: lung cellular and molecular physiology**, Bethesda, v.283, n.2, p.L445-51, aug. 2002.

TOWNSEND, D.M.; KENNETH, D.T.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine and pharmacotherapy**, Paris, v.57, n.3/4, p.145-55, may./jun. 2003.

TREHARNE, K.J.; CASSIDY, D.; GODDARD, C.; COLLEDGE, W.H.; CASSIDY, A.; MEHTA, A. Epithelial IgG and its relationship to the loss of F508 in the common mutant form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Febs letters**, Amsterdam, v.583, n.15, p.2493-9, aug. 2009.

TSUI, L.C.; BUCHWALD, M.; BARKER, D.; BRAMAN, J.C.; KNOWLTON, R.; SCHUMM, J.W.; EIBERG, H.; MOHR, J.; KENNEDY, D.; PLAVSIC, N. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. **Science**, Washington, v.230, n.4729, p.1054-7, nov. 1985.

VAISMAN, N.; CLARKE, R.; ROSSI, M.; GOLDBERG, E.; ZELLO, G.A.; PENCHARZ, P.B. Protein turnover and resting energy , expenditure in patients with undernutrition and chronic lung disease, **American journal of clinical nutrition**, Bethesda, v.55, n.1, p.63-9, jan. 1992.

VISCA, A.; BISHOP, C.L.; HILTON, S.C.; HUDSON, V.M. Improvement in clinical markers in CF patients using a reduced glutathione régime: an uncontrolled, observational study. **Journal of Cystic Fibrosis**, Amsterdam, v. 7, n.5, p.433-6, sep.2008.

WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; TAKASE, M. Lactoferrin research, technology and applications. **International dairy journal**, Barking, v.16, n.11, p.1241-51, nov. 2006.

WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical reviews in food science and nutrition**, Boca Raton, v.42, n.4, p.353-75, jul. 2002

WHEELER, W.B.; WILLIAMS, M.; MATTHEWS, W.J. Jr; COLTEN, H.R. Progression of cystic fibrosis lung disease as a function of serum immunoglobulin G levels: a 5-year longitudinal study. **Journal of pediatrics**, St. Louis, v.104, n.5, p.695-9, may. 1984.

WHITE, H.; MORTON, A.M.; PECKHAM, D.G.; CONWAY, S.P. Dietary intakes in adult patients with cystic fibrosis-do they achieve guidelines? **Journal of Cystic Fibrosis**, Amsterdam, v.3, n.1, p.1-7, mar. 2003

WHOAntro [programa de computador]. Version 3.0.1. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, 2006.

WHOAntroPLUS [programa de computador]. Version 1.0.2. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, 2007.

WOJNAROWSKI, C.; FRISCHER, T.; HOFBAUER, E.; GRABNER, C.; MOSGOELLER, W.; EICHLER, I.; ZIESCHE, R. Cytokine expression in bronchial biopsies of cystic fibrosis patients with and without acute exacerbation. **European respiratory journal: official journal of European Society for Clinical Respiratory Physiology**, Copenhagen, v.14, n. 5, p.1136-44, nov. 1999.

WOLTER, J.M.; RODWELL, R.L.; BOWLER, S.D.; MCCORMACK, J.G. Cytokines and inflammatory mediators do not indicate acute infection in CF. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v.6, n.2, p.260-5, mar. 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. DE ONIS, M.; ONYANGO, A.W.; BORGHI, E.; SIYAM, A.; NISHIDA, C.; SIEKMANN, J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.85, n.9, p.660-7, sep. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **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.

9 APÊNCICES

APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - 1

PROJETO: Suplementação de concentrado protéico do soro do leite bovino em pacientes pediátricos com fibrose cística

- Pesquisadores: Daniela Miotto Bernardi, prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri e prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro
- Paciente: _____ HC: _____
- Idade: _____
- Endereço: _____

Eu, _____, declaro por livre e espontânea vontade permitir a participação de _____ neste estudo assumindo que a suplementação com proteínas do soro de leite possa auxiliar no tratamento de e recuperação da criança sob minha responsabilidade. O risco que o paciente estará correndo, em decorrência da ingestão dessas proteínas é muito baixo, bem como o seu desconforto, por se tratar de um componente natural do leite especialmente preparado para ingestão via oral e freqüentemente consumido por crianças. Em caso de intolerância ou sintomas de alergia às proteínas do soro de leite a suplementação será imediatamente suspensa.

Declaro ainda que recebi esclarecimentos quanto aos objetivos e procedimentos que serão utilizados durante o estudo, tais como: entrevista com profissional da área de nutrição; coleta de sangue; coleta do escarro; exames antropométricos (peso, altura, circunferências e pregas cutâneas); ingestão do suplemento nutricional que foi proposto; orientações referentes à ingestão alimentar.

Como responsável pelo paciente em questão, comprometo-me a oferecer o suplemento alimentar fornecido, bem como, seguir as orientações recebidas quanto ao seu uso, tendo a garantia dos responsáveis pela pesquisa, de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida, acerca dos assuntos relacionados à pesquisa e a suplementação alimentar.

Afirmo ter sido esclarecido que não receberei remuneração em troca da participação, que posso desistir no momento em que desejar, mesmo após a assinatura deste termo. E que a desistência não acarretará em alteração nos cuidados médicos e orientações que meu/minha filho (a) vem recebendo. Receberei uma cópia deste termo assinado em três vias.

De acordo,

Pai ou responsável pelo participante: _____
Daniela Miotto Bernardi Tel.(19)8188-3894/(19)3521-8989: _____
Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro Tel. (19)3521-7861: _____
Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri Tel. (19) 3521-4059: _____
Comitê de Ética em Pesquisa Tel. (19) 3521- 8936.

_____, _____ de _____ de 2009.

APÊNDICE 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO - 2

Os pesquisadores responsáveis pela pesquisa citada abaixo, vêm por meio deste documento convidar crianças e adolescentes ou seus responsáveis a autorizarem a participação voluntária dos mesmos para fazerem parte de um grupo controle saudável que será comparado com os resultados dos pacientes com Fibrose Cística.

- **“Efeitos da suplementação com concentrado proteico do soro do leite bovino em pacientes pediátricos com fibrose cística”**, projeto de mestrado da aluna Daniela Miotto Bernardi, promovido pelo Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, sob orientação do Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, e co-orientação do Dr. Antonio Fernando Ribeiro;

Eu, _____, declaro por livre e espontânea vontade permitir a participação de _____ neste estudo. Declaro ainda que recebi esclarecimentos quanto aos objetivos e procedimentos que serão utilizados durante a coleta, tendo a garantia dos responsáveis pela pesquisa, de receber resposta a qualquer pergunta.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação e que os dados obtidos serão mantidos em sigilo. Para participação será necessária a coleta de material biológico, tais como:

- a) coleta de 12 mL de sangue para a realização de análises bioquímicas;
- b) coleta de 1,0mL de saliva;

De acordo,

Pai ou responsável pelo participante: _____

Daniela Miotto Bernardi Tel.(19)8188-3894/(19)3521-8989: _____

Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro Tel. (19)3521-7861: _____

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri Tel. (19) 3521-4059: _____

Comitê de Ética em Pesquisa Tel. (19) 3521- 8936.

_____, _____ de _____ de 2010.

APÊNDICE 3: MANUAL SOBRE O SUPLEMENTO

O SUPLEMENTO

É um suplemento alimentar feito a partir das proteínas do leite, que são separadas, secadas e concentradas. Ao preparar o suplemento é necessário ter muito cuidado, pois do contrário estas proteínas não conseguirão fazer o efeito esperado.



CUIDADOS BÁSICOS

- **NUNCA BATER O SUPLEMENTO NO LIQUIDIFICADOR**, ou seja, somente colocar o suplemento em vitaminas depois que elas foram batidas no liquidificador;
- **NUNCA AQUECER O SUPLEMENTO**, ou seja, somente colocar o suplemento nos alimentos depois que eles forem cozidos;
- Não se deve preparar o suplemento com antecedência, portanto, **PREPARAR SEMPRE NO MOMENTO EM QUE SERÁ TOMADO**;
- Manter sempre em local fresco;

COMO TOMAR O SUPLEMENTO

- O suplemento será entregue em pacotes que estarão divididos no meio. O paciente deverá **tomar 1 pacote inteiro por dia**, sendo que deverá ser tomado **2 vezes ao dia**, ou seja, **metade do pacote de manhã e a outra metade de tarde**.
- O suplemento poderá ser misturado em leite, sucos ou outras bebidas, podendo ainda ser consumido na forma original de pó misturado a cereais matinais, purês de frutas ou outros tipos de alimentos.

RECEITAS

Aqui temos algumas receitas que podem ser feitas para o preparo do suplemento.

SUPLEMENTO ORIGINAL

Ingredientes

- 100ml de água;
- Meio pacote de suplemento;
- Açúcar OU mel;



Modo de preparo:

Coloque o suplemento em um copo e adicione um pouquinho de água, misture bem até virar uma pasta uniforme. Em seguida, adicione o restante da água e misture. Adicione o Açúcar OU mel e sirva.

MINGAU DE AVEIA

Ingredientes

- 150ml (1 xícara) de leite de soja ou leite de vaca;
- 2 colheres de sopa de aveia em flocos;
- Açúcar OU mel à gosto;
- 1 pitada de canela;
- Meio pacote de suplemento;



Modo de preparo:

Misture o leite, a aveia, o Açúcar OU mel e a canela e leve ao fogo até engrossar. Em seguida coloque em um pote e espere esfriar. Por fim, coloque o SUPLEMENTO misture bem e sirva.

MINGAU DE MAISENA

Ingredientes

- 150ml (1 xícara) de leite de soja ou leite de vaca;
- 1 colher de sopa de Maisena;
- Açúcar OU mel à gosto;

1 pitada de canela;

- Meio pacote de suplemento;

Modo de preparo:

Misture o leite, a maisena, o Açúcar OU mel e a canela e leve ao fogo até engrossar. Em seguida coloque em um pote e espere esfriar. Por fim, coloque o SUPLEMENTO misture bem e sirva.

MINGAU DE ARROZINA

Ingredientes

- 150ml (1 xícara) de leite de soja ou água;
- 1 colher de sopa de Arrozina;
- Açúcar OU mel à gosto;
- Se preferir, um pouco de banana picada;
- Meio pacote de suplemento;



Modo de preparo:

Misture o leite, a arrozina, Açúcar OU mel e leve ao fogo até engrossar. Em seguida coloque em um pote e espere esfriar. Por fim, coloque a banana e o SUPLEMENTO e misture bem e sirva.

MINGAU DE MILHO

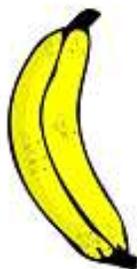
Ingredientes

- 150ml (1 xícara) de leite de soja;
- 3 colheres de sopa de mucilon® de milho;
- Açúcar OU mel OU cobertura de caramelo à gosto;
- Meio pacote de suplemento;



Modo de preparo:

Misture o leite, mucilon®, o açúcar (OU mel OU cobertura de caramelo) e leve ao fogo até engrossar. Em seguida coloque em um pote e espere esfriar. Por fim, coloque o SUPLEMENTO misture bem e sirva.



VITAMINA DE BANANA

Ingredientes:

- 200ml (1 copo) de leite de soja ou leite de vaca;
- Meia banana;
- Açúcar OU mel à gosto;
- Meio pacote de suplemento;

Modo de preparo:

Coloque o leite, a banana e o açúcar (OU mel) no liquidificador e bata bem. Em seguida coloque a vitamina em um copo e adicione o SUPLEMENTO, misture bem e sirva.

VITAMINA DE MAÇÃ

Ingredientes

- 200ml (1 copo) de leite de soja ou leite de vaca;
- Meia maçã pequena;
- Açúcar OU mel à gosto;
- Meio pacote de suplemento;



Modo de preparo:

Coloque o leite, a maçã e o açúcar (OU mel) no liquidificador e bata bem. Em seguida coloque a vitamina em um copo e adicione o SUPLEMENTO, misture bem e sirva.



VITAMINA DE ABACATE

Ingredientes

- 200ml (1 copo) de leite de soja ou leite de vaca;
- 1 colher de sopa de abacate;

- Açúcar OU Mel à gosto;
- Meio pacote de suplemento;

Modo de preparo:

Coloque o leite, o abacate e o açúcar (OU mel) no liquidificador e bata bem. Em seguida coloque a vitamina em um copo e adicione o SUPLEMENTO, misture bem e sirva.

VITAMINA DE MAMÃO

Ingredientes

- 200ml (1 copo) de leite de soja ou leite de vaca;
- 1 Fatia pequena de mamão;
- Açúcar OU mel à gosto;
- Meio pacote de suplemento;



Modo de preparo:

Coloque o leite, o mamão e o açúcar (OU mel) no liquidificador e bata bem. Em seguida coloque a vitamina em um copo e adicione o SUPLEMENTO, misture bem e sirva.

VITAMINA DE MORANGO

Ingredientes

- 200ml (1 copo) de leite de soja ou leite de vaca;
- 5 unidades pequenas de morango;
- Açúcar OU mel à gosto;
- Meio pacote de suplemento;



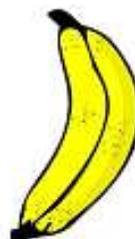
Modo de preparo:

Coloque o leite, a banana e o açúcar (OU mel) no liquidificador e bata bem. Em seguida coloque a vitamina em um copo e adicione o SUPLEMENTO, misture bem e sirva.

PAPINHA DE BANANA

Ingredientes

- 1 banana grande;
- Meio pacote de suplemento;
- Se preferir: 1 colher de sopa de neston;
- Se preferir: 1 colher de sopa de cobertura de caramelo;



Modo de preparo:

Amasse a banana e misture os demais ingredientes;

SUPLEMENTO COM SORVETE

Ingredientes

- 1 bola de sorvete
- Meio pacote de suplemento;

Modo de preparo:

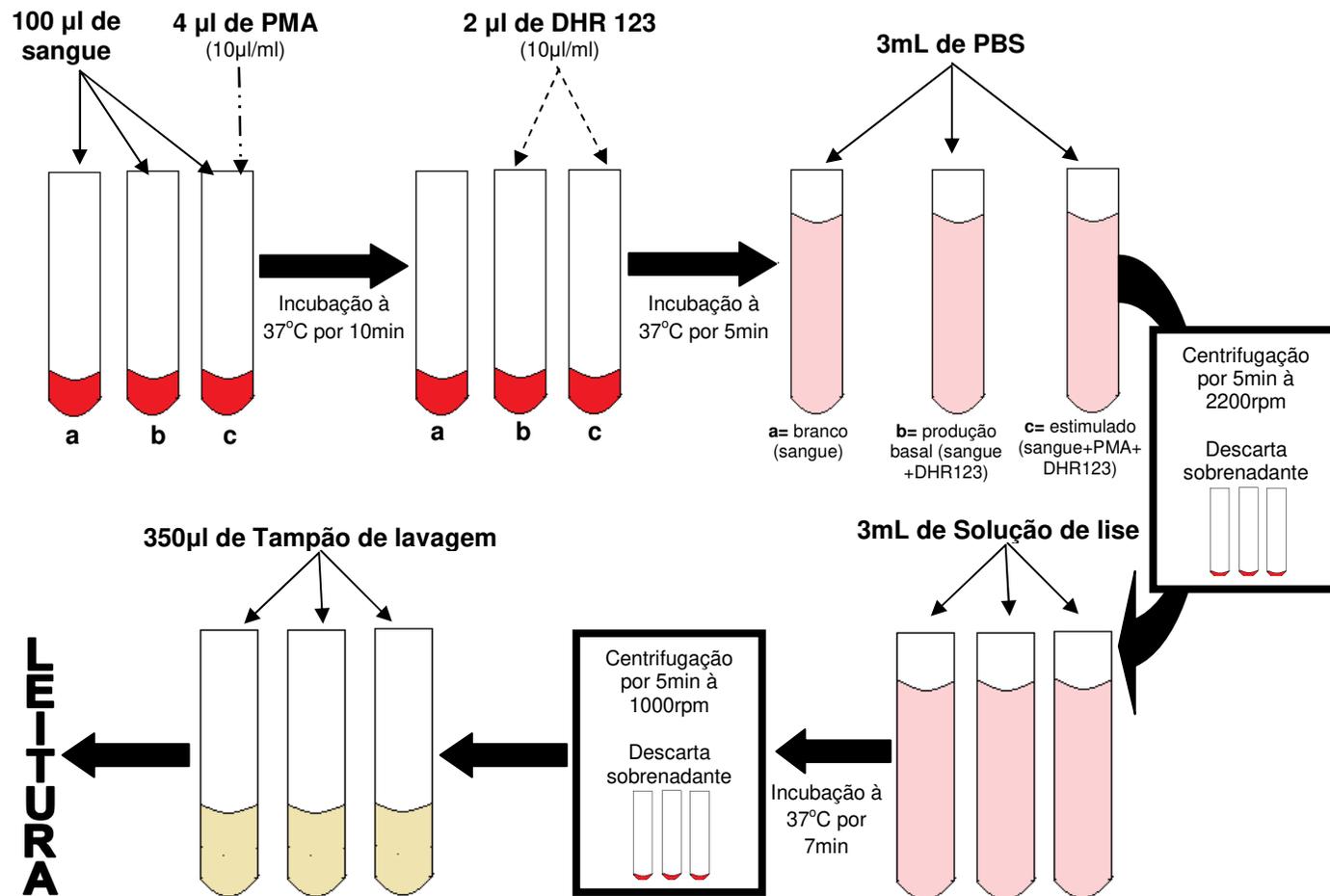
Misture bem a bola de sorvete com o suplemento e sirva.



Cabe lembrar que o suplemento pode ser misturado a outros alimentos, como:

- Purês de frutas;
- Sucos de frutas;
- Cereais matinais;
- Iogurte

APÊNDICE 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ANÁLISE DE LIBERAÇÃO DE RADICAIS INTERMEDIÁRIOS DE OXIGÊNIO PELOS GRANULÓCITOS



10 ANEXOS

ANEXO 1: ESCORE DE SHWACHMAN

Pontuação	Atividade geral	Exame físico
25	Atividade plena, tolerância ao exercício normal, boa disposição, desenvolvimento motor normal freqüência escolar normal.	Sem tosse; FC e FR normais; sem evidencias de enfisema; pulmões limpos na auscultação; boa postura; sem baqueteamento.
20	Leve limitação a atividade intensa, cansa ao final do dia ou após exercício prolongado, menos energético, limite ocasionalmente irritado ou apático, boa freqüência escolar.	Tosse seca ocasional; FC e FR normais no repouso; enfisema leve; MV rude, roncocal e TE prolongado ocasionais; boa postura; baqueteamento leve.
15	Descansa voluntariamente, cansa após exercício, moderadamente inativo, leve retardo motor, falta espontaneidade, passivo ou irritável, freqüência escolar regular.	Tosse leve e crônica matinal após o exercício/ choro e ocasionalmente durante o dia; sem tosse noturna; FC e FR levemente ↑; ↑ diâmetro AP e diafragma rebaixado; MV rude, crepitantes, roncocal; sibilocal; baqueteamento 1/2.
10	Atividade física e tolerância ao exercício limitadas, dispnéico após exercícios, retardo motor moderado, agitado ou irritado, preguiçocal ou abatido, freqüência escolar baixa.	Tosse crônica, freqüente, repetitiva, productiva, raramente paroxística; FC e FR ↑ moderadamente; enfisema moderado a grave, freqüentemente com deformidade ao RX; crepitantes, roncocal e sibilocal usualmente presentes e disseminados, baqueteamento 2/3
5	Limitação grave da atividade, dispnéia e ortopneia, inativo ou confinado a cama; marcado retardo motor; apático ou irritado; não pode assistir às aulas.	Tosse severa paroxística, freqüente, productiva, freqüente com vômitocal e hemoptise; tosse noturna; taquipneia e taquicardia; enfisema grave; crepitantes, roncocal e sibilocal generalizados expiraçocal audível; ma postura; ¾ baqueteamento; cianose freqüente
Pontuação	Nutriçocal	Achados Radiolocalgicos
25	Peso acima do %25 ou compatível com o padrocal familiar; tônus e massa muscular normais; gordura subcutânea normal; maturaçocal sexual normal; fezes quase normais; bom apetite.	Sem evidencia de enfisema; sem aumento na trama bronco vascular; sem infiltraçocal ou atelectasias;
20	Peso e altura acima do %10 ou levemente abaixo do padrocal familiar; tônus e massa muscular bons; tecido subcutâneo levemente diminuído; maturaçocal sexual levemente retardada; apetite normal e fezes mais freqüentes com leve alteraçocal;	Evidencias mínimal de enfisema; leve aumento da trama broncovascular; sem infiltrados ou atelectasias.
15	Peso acima do %3 ou moderadamente abaixo do padrocal familiar; peso usualmente deficiente para a altura; tônus e massa muscular regulares; gordura subcutânea deficiente, abdome pouco distendido; maturaçocal sexual retardada; apetite regular, fezes volumosas, flutuantes formadas.	Enfisema moderado, diâmetro AP aumentado; campos pulmonares mais radiolocalcentes, diagrama moderadamente rebaixado; trama broncovascular aumentada; atelectasias localizadas ou irregulares; infiltrado ocasional transitório
10	Peso acima do %3 e deficiêncocal para altura; tônus e massa muscular pobres; deficiêncocal marcada de gordura subcutânea; distensocal abdominal moderada; maturaçocal sexual deficiente, sem estirocal; mau apetite; fezes pouco formadas, volumosas, mau cheiro e gordurosas.	Enfisema marcado; aumento do diâmetro AP marcado; marcado rebaixamento do diafragma; silhueta cardíaca estreita; áreas de atelectasias disseminadas; atelectasias segmentares ou lobares ocasionais; fococal persistentes de infiltraçocal; cistocal localizados; aumento marcado na trama.
5	Mal-nutrido e baixo; músculos fracos, flácidos e pequenos; sem gordura subcutânea; perda de peso freqüente; fezes freqüentes, volumosas, mau cheiro e gordurosas; prolapso retal freqüente.	Alteraçocal extensivas; hiperinsulflaçocal grave; infiltrado e atelectasias disseminadas; formaçocal disseminada de cistocal; formaçocal de bronquiectasias e abscessocal; atelectasias lobares persistentes
Classificaçocal		Pontos
Grave		< 40
Moderado		55 – 41
Leve		70 – 56
Bom		85 – 71
Excelente		100 – 86

ANEXO 2: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



CEP, 22/07/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 538/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0432.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE BOVINO, NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM FIBROSE CÍSTICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Daniela Miotto Bernardi

INSTITUIÇÃO: Ambulatório Pediátrico de Fibrose Cística / Hospital das Clínicas / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/07/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 22/07/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar o efeito da suplementação do concentrado protéico do soro do leite bovino (whey protein concentrate - WPC) enriquecido com TGF-BETA e lactoferrina, na resposta inflamatória em pacientes pediátricos com diagnóstico de fibrose cística (FC).

III - SUMÁRIO

Estudo clínico não randomizado e observacional com caráter longitudinal. Participarão da pesquisa 40 pacientes com FC atendidos no Ambulatório Pediátrico de Fibrose Cística do HC - UNICAMP, com faixa etária entre 3 e 10 anos, com escore de Shwachman entre moderado e bom, que possuam tolerância ao WPC e cujos responsáveis tenham assinado o TCLE. Antes da suplementação, o WPC será submetido à análise centesimal e microbiológica. A suplementação será feita durante 6 meses, durante os quais os pacientes serão submetidos a 3 avaliações (T0, T1 e T2) onde serão verificados: os níveis de glutatona em sangue total, a liberação de radicais intermediários do oxigênio e quantificação de neutrófilos, imunoglobulinas séricas e imunoglobulina A da saliva, cultura do escarro, níveis de proteínas séricas, avaliação antropométrica e avaliação da ingestão alimentar. A suplementação do WPC será entregue ao paciente que deverá ingeri-lo misturado em bebidas, farinhas, purês ou sopas. Caso algum paciente apresente intolerância ao suplemento ou se sua aderência for menor que 50%, a suplementação será interrompida. Se na segunda análise bioquímica (T1) os resultados dos exames forem satisfatórios a pesquisa também poderá ser encerrada. Os dados serão tratados estatisticamente com nível de significância de 5%.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto está claro, é extremamente interessante, os critérios de inclusão e exclusão estão bem definidos.



Recomendamos que no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido seja substituído os termos “prometo-me” por “comprometo-me” e “sido esclarecendo” por “sido esclarecido”. Recomendamos também, que o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido seja em forma de anexo.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de julho de 2008.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 3: ADENDO 1 – COMITÊ DE ÉTICA



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index

CEP, 16/12/08.
(PARECER CEP: N° 538/2008)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE BOVINO, NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM FIBROSE CÍSTICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Daniela Miotto Bernardi

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a nova metodologia bem como a alteração do orientador, que passa a ser Valdemiro Carlos Sgarbieri e o co-orientador que passa a ser Antônio Fernando Ribeiro, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 16 de dezembro de 2008.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 4: ADENDO 2 – COMITÊ DE ÉTICA



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 27/04/10.
(PARECER CEP: Nº 538/2008)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE BOVINO, NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM FIBROSE CÍSTICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Daniela Miotto Bernardi

II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui o grupo controle, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de abril de 2010.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 5: LAUDOS MICROBIOLÓGICOS

LAUDO DE ANÁLISE Nº: CQ 13285/2008 MB

MATERIAL: Concentrado proteico de soro de leite 20und, fab.: 04/12/08

INTERESSADO: Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

ENDEREÇO: FEA-Unicamp

DATA DE ENTRADA DAS AMOSTRAS: 09/12/2008

DATA DE ANÁLISE: 10/12/2008

DATA DE EMISSÃO DO LAUDO: 18/12/2008

NATUREZA DAS ANÁLISES: Microbiológica

RESPONSÁVEIS: Maristela S. Nascimento, Dionir J. Baptista

1. MÉTODOS

DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.). 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C.

ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs *Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*, 4th ed. The International Organization for Standardization, 2002.

HORWITZ, W. & LATIMER, G.W. (eds.). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 13th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2005.

ISO 6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – *Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium*, 1st ed., 1999. Amendment 1:2003.

ISO 7251:2005. *Microbiology of food and animal stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli – Most probable number technique*. 3rd ed. The International Organization for Standardization, 2005.

2. RESULTADOS

Determinações	Resultados
<i>Salmonella</i>	Ausente
Coliformes totais (em 1g)	Ausentes
<i>Escherichia coli</i> (em 1g)	Ausente
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)*	10(est)**
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)*	<10

* Unidade Formadora de Colônia por grama, ** Contagem estimada, abaixo do limite de quantificação do método.

3. COMENTÁRIOS E/OU CONCLUSÃO

A amostra encontra-se de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos para o Grupo de Alimentos 27, Item a, da Resolução RDC Número 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

4. OBSERVAÇÕES

a) O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não foi responsável pela amostragem e coleta do material, cuja identificação foi fornecida pelo interessado. Os resultados aplicam-se exclusivamente à(s) amostra(s) analisada(s), sendo vedado o uso do nome do ITAL, sob pena de indenização, para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu controle. b) Este laudo/relatório só tem valor oficial quando impresso em papel com marca d'água, com assinaturas ou rubricas originais em todas as páginas. Sua reprodução só pode ser feita na íntegra, sendo requerida autorização formal deste laboratório para reprodução parcial. c) Quando aplicável, os comentários e conclusões não fazem parte do escopo de habilitação pela REBLAS.

Visto:

Valéria C. A. Junqueira
Vide-Diretor Técnico de Serviço
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia

Beatriz Thie Iamanaka
Pesquisador Científico
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia

LAUDO DE ANÁLISE Nº: **CQ 13284/2008 MB**
MATERIAL: **Caseína 20 und, fab.: 07/12/08**
INTERESSADO: **Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri**
ENDEREÇO: **DEPAN/FEA- UNICAMP**
DATA DE ENTRADA DAS AMOSTRAS: **09/12/2008**
DATA DE EMISSÃO DO LAUDO: **18/12/2008**
NATUREZA DAS ANÁLISES: **Microbiológica**
RESPONSÁVEIS: **Maristela S. Nascimento, Dionir J. Baptista**

DATA DE ANÁLISE: **10/12/2008**

1. MÉTODOS

- DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.). 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C.
- ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs *Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*, 4th ed. The International Organization for Standardization, 2002.
- HORWITZ, W. & LATIMER, G.W. (eds.). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2005.
- ISO 6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – *Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium*, 1st ed., 1999. Amendment 1:2003.
- ISO 7251:2005. *Microbiology of food and animal stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli – Most probable number technique*. 3rd ed. The International Organization for Standardization, 2005.

2. RESULTADOS

Determinações	Resultados
<i>Salmonella</i>	Ausente
Coliformes totais (em 1g)	Presentes
<i>Escherichia coli</i> (em 1g)	Ausente
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)*	10(est)**
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)*	<10

* Unidade Formadora de Colônia por grama, ** Contagem estimada, abaixo do limite de quantificação do método.

3. COMENTÁRIOS E/OU CONCLUSÃO

A amostra encontra-se de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos para o Grupo de Alimentos 27, Item a, da Resolução RDC Número 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

4. OBSERVAÇÕES

a) O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não foi responsável pela amostragem e coleta do material, cuja identificação foi fornecida pelo interessado. Os resultados aplicam-se exclusivamente à(s) amostra(s) analisada(s), sendo vedado o uso do nome do ITAL, sob pena de indenização, para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu controle. **b)** Este laudo/relatório só tem valor oficial quando impresso em papel com marca d'água, com assinaturas ou rubricas originais em todas as páginas. Sua reprodução só pode ser feita na íntegra, sendo requerida autorização formal deste laboratório para reprodução parcial. **c)** Quando aplicável, os comentários e conclusões não fazem parte do escopo de habilitação pela REBLAS.

Visto:

Valéria C. A. Junqueira
Vide-Diretor Técnico de Serviço
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia

Beatriz Thie Iamanaka
Pesquisador Científico
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia