

EMÍLIA TORRES COSTA MARQUES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
COM SIBILÂNCIA RECORRENTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

T

M357a
2017 Marques, Emília Torres Costa, 1981-
Avaliação do perfil oxidativo em pacientes pediátricos com
sibilância recorrente / Emília Torres Costa Marques. - Viçosa, MG,
2017.
xii, 56f : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Silvia Almeida Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Asma. 2. Sibilância. 3. Stress oxidativo. 4. Obesidade.
5. Sobrepeso. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.
II. Título.

CDD 22 ed. 616.238

EMÍLIA TORRES COSTA MARQUES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
COM SIBILÂNCIA RECORRENTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 21 de dezembro de 2017.

Rodrigo de Barros Freitas

Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)

Silvia Almeida Cardoso
(Orientadora)

Às minhas flores: Bruna, Fernanda e Marina.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus familiares, pelo apoio e palavras de incentivo.

Às minhas filhas Bruna, Fernanda e Marina, que alegram meus dias e, apesar da pouca idade souberam compreender meus momentos de ausência.

Ao Eduardo, um agradecimento em dose dupla: ao professor, pela grande contribuição para que eu alcançasse este objetivo e ao esposo, pelo apoio e carinho nos momentos mais difíceis e por cuidar de nossas filhas com tanta dedicação, amor e carinho quando eu precisava me ausentar.

A Sílvia, pelo apoio e amizade e por todos os ensinamentos neste período. Com ela aprendi questões que ultrapassam a vida acadêmica. Aprendi a ser mais paciente e que não precisamos trilhar nenhum atalho para alcançar nossos objetivos.

Ao professor Leandro, pelos ensinamentos e por disponibilizar seu laboratório para execução deste trabalho. Obrigada, também, por aceitar compor a banca.

Ao professor Luiz Sérgio, pela colaboração e disponibilidade.

Ao Rodrigo, pela ajuda e pelas risadas durante os experimentos. Obrigada, também, por aceitar compor a banca.

Ao Daniel e à Alessandra, por transmitirem seu conhecimento com desprendimento e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia, por me receberem com tanto carinho e amizade, me auxiliando sempre que necessário, até mesmo distraindo as crianças para que eu pudesse executar minhas tarefas no laboratório. Vocês são muito especiais. Obrigada por tudo, “coleguinhas”!

À Maria Clara e ao Ederson, pelo companheirismo. Nossas fermentações não foram em vão. Todo aprendizado é bem vindo.

Aos amigos que ganhei neste período, de modo especial Adriane, Mirna, Cássia, Renata, Maria Augusta, Pricila e Mariana. Vocês tornaram esta jornada mais leve e prazerosa.

Aos professores e alunos dos laboratórios de Imunovirologia e de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral, por disponibilizarem seus equipamentos para execução deste trabalho.

Aos pacientes voluntários, pela colaboração. Sem vocês este trabalho não existiria.

Aos funcionários da Divisão de Saúde que auxiliaram na coleta das amostras dos voluntários.

Aos alunos de graduação do curso de Medicina da UFV, que dedicaram seu tempo ajudando na coleta de dados junto aos voluntários.

Ao Departamento de Medicina, de modo especial aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação, pelo engajamento e comprometimento para que tudo desse certo.

À UFV, por agora fazer parte da minha história.

*“É graça divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa.
Mas graça das graças é nunca desistir.”*

Dom Helder Câmara

LISTA DE SIGLAS

EVW	Sibilância Viral Episódica
MTW	Sibilância de Múltiplos Desencadeantes
EISL	Estudo Internacional de Sibilância em Lactentes
RSV	Vírus Sincicial Respiratório
RV	Rinovírus
TLR	Receptores Tipo Toll
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
O ₂ ⁻	Superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
OH ⁻	Radicais Hidroxila
NO	Óxido Nítrico
NO ⁺	Cátion Nitrosil
ONO ₂ ⁻	Peroxinitrito
SOD	Superóxido Dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutathione Peroxidase
GST	Glutathione Transferase
NADPH	Hidrogênio Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione Dissulfídica
MDA	Malondialdeído
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
FRAP	Capacidade de Redução Férrica
CEP-UFV	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa
TALE	Termo de Assentimento Livre Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
NO ₂ ⁻	Nitrito
PC	Proteínas Carboniladas
TPTZ	2,4,6-Tris-triazina
BDH	Cloreto Férrico Hexahidratado

TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
BCA	Ácido Bicinconínico
DPNH	2,4 – Dinitrofenilhidrazina
HCl	Ácido Clorídrico
TCA	Ácido Tricloroacético
SDS	Lauril Sulfato de Sódio
IMC	Índice de Massa Corporal
EPO	Peroxidase Eosinofílica
MPO	Mieloperoxidase
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ILCs	Células Linfoides Inatas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Capacidade antioxidante total no soro de voluntários sibilantes.

Figura 2: Detecção de óxido nítrico no soro de voluntários sibilantes

Figura 3: Quantificação de marcadores de dano tecidual em voluntários sibilantes.

Figura 4: Porcentagem de pacientes sibilantes recorrentes obesos, com sobrepeso, eutróficos ou magreza, em relação à faixa etária (< 36, 36-72 e > 72).

Figura 5: Gráfico de dispersão e correlação de Spearman (r).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Regressão de Poisson, razão de incidência das variáveis obesidade e sobrepeso em relação à idade (meses).

RESUMO

MARQUES, Emília Torres Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2017. **Avaliação do perfil oxidativo em pacientes pediátricos com sibilância recorrente.** Orientadora: Silvia Almeida Cardoso. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira, Luciana Moreira Lima, Ana Vlândia Bandeira Moreira e Camilo Amaro de Carvalho.

O presente estudo tem por objetivo avaliar o perfil oxidativo de pacientes pediátricos sibilantes recorrentes, atendidos no Serviço de Pneumologia do município de Viçosa e relacioná-lo a fatores associados à asma. Contou com a participação de 109 pacientes que foram divididos em grupos de acordo com a faixa etária (< 36, 36-72 e > 72 meses). Os dados foram coletados por meio de um questionário semiestruturado e o soro obtido por punção venosa. A avaliação do perfil oxidativo foi realizada por meio das dosagens séricas da capacidade de redução férrica (FRAP) e óxido nítrico (NO) e marcadores de dano tecidual como peroxidação lipídica (MDA) e proteína carbonilada (PC). Crianças pertencentes ao grupo de 36-72 meses apresentaram uma menor capacidade antioxidante e menores dosagens de proteínas carboniladas quando comparadas aos demais grupos. Crianças acima de 72 meses de idade apresentaram maiores dosagens de peroxidação lipídica quando comparadas às crianças menores de 36 meses de idade e uma ampla dispersão para ambos marcadores de dano tecidual, com maior porcentagem de indivíduos obesos ou com sobrepeso. O Índice de Massa Corporal (IMC) mostrou-se diretamente relacionado aos níveis da capacidade antioxidante total e da proteína carbonilada. A dosagem de óxido nítrico não apresentou diferença significativa entre os grupos analisados. De acordo com esses resultados, podemos concluir que a obesidade, o excesso de peso e níveis alterados de alguns marcadores de dano oxidativo, em associação com o avanço da idade, podem ser considerados contribuintes para a recorrência da sibilância em crianças.

ABSTRACT

MARQUES, Emília Torres Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2017. **Evaluation of the oxidative profile in pediatric patients with recurring wheezing.** Advisor: Silvia Almeida Cardoso. Co-advisors: Leandro Licursi de Oliveira, Luciana Moreira Lima, Ana Vlândia Bandeira Moreira and Camilo Amaro de Carvalho.

In this study, we evaluate the oxidative profile of recurrent wheezing pediatric patients attended in the Pneumology Service of Viçosa city - Brazil, and related it to asthma related factors. The study was made using data from 109 patients, which were divided in three groups, according to the age ranges: < 36, 36 to 72 and > 72 months. Data were collected from a semi structured questionnaire. Serum was collected by venous puncture, and used to evaluate the oxidative profile by the quantification of Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP), nitric oxide (NO), and the tissue damage markers malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins (CP). Recurrent wheezing children from the group 36 to 72-month-old showed smaller antioxidative profile and PC levels when compared to the other groups. Children older than 72-month-old showed higher levels of lipid peroxidation (represented by higher MDA levels) and PC, whose data were distributed in a broad dispersion, and a higher percentage of fat and overweight subjects. The Body Mass Index (BMI) was directly related to the levels of CP and total antioxidative capacity. There were no differences in NO levels between the analyzed groups. Together, these results lead us to conclude that obesity, overweight and changed levels of some oxidative damage markers, in association to the advancement of age, may be considered contributors to wheezing recurrence and asthma in children.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Sibilância recorrente	2
1.2 Fatores de risco para a sibilância e a asma	2
1.3 Patogenia da asma	4
1.3.1 Agentes oxidantes	5
1.3.2 Mecanismo antioxidante	7
2 OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Amostragem	10
3.2 Avaliação do perfil oxidativo	10
3.2.1 Dosagem de FRAP	11
3.2.2 Dosagem de NO	11
3.2.3 Dosagem de MDA	12
3.2.4 Dosagem de PC	13
3.3 Análise estatística	14
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
5 RESULTADOS	20
5.1 Artigo	21
6 CONCLUSÃO	36
ANEXO A – Parecer Consubstancial do CEP	37
ANEXO B – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido	42
ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	45
ANEXO D – Questionário sobre sintomas respiratórios	49
ANEXO E – Confirmação de Submissão	55

1 INTRODUÇÃO

A sibilância caracteriza-se por um ruído semelhante a um assobio que se manifesta durante a respiração e resulta de alguma obstrução ou estreitamento das vias aéreas, decorrente de causas estruturais ou funcionais (não estruturais) (Ducharme *et al.*, 2014). As causas estruturais ocorrem quando existem anormalidades anatômicas das vias aéreas, como por exemplo, malácia da traqueia e brônquios ou estenose traqueal. As causas funcionais são representadas por situações onde anormalidades anatômicas estão ausentes e podem ocorrer devido à inalação de um corpo estranho, refluxo gastroesofágico ou distúrbios de deglutição (Celedon *et al.*, 2002). Em crianças, a asma e a bronquite, representam as causas mais frequentes de sibilância (Ducharme *et al.*, 2014), sendo que infecções virais também se destacam como causadoras, principalmente quando se trata de uma situação aguda. (Rosenthal *et al.*, 2010).

Com a intenção de melhorar e facilitar a prática clínica com crianças sibilantes, foi proposta por Martinez e colaboradores em 1995 uma classificação baseada no momento do aparecimento e na persistência do sintoma. Em um estudo prospectivo realizado de maio de 1980 a outubro de 1984, foram estabelecidos três fenótipos: sibilância transitória (crianças que sibilam nos primeiros três anos de vida e que não mais sibilam aos 6 anos de idade), sibilância persistente (crianças que sibilam nos primeiros três anos de vida e continuam sibilando aos 6 anos de idade) e sibilância de início tardio (crianças que não sibilam nos três primeiros anos, mas sibilam aos 6 anos) (Martinez *et al.*, 1995). Outra classificação incluindo fatores desencadeantes da sibilância define dois fenótipos: sibilância viral episódica (EVW) e sibilância de múltiplos desencadeantes (MTW). A EVW é definida como uma sibilância em discreto período de tempo associada a uma evidência clínica de infecção viral e ausência de sintomas entre os episódios, enquanto a MTW é uma sibilância com discreta exacerbação e persistência dos sintomas entre os episódios (Brand *et al.*, 2008). No entanto, estudos posteriores apontam que esta última classificação não é tão clara, uma vez que identificar os fatores desencadeantes da sibilância não é uma tarefa fácil de ser realizada na prática clínica (Savenije *et al.*, 2012).

Causas genéticas e ambientais são apontadas como fatores de risco para desenvolvimento de episódios de sibilância, e a sua identificação é fundamental para melhor compreensão dos diferentes fenótipos da doença, bem como para promover avanços no entendimento do desenvolvimento e progressão da asma (Moraes *et al.*, 2013).

1.1 Sibilância recorrente

A utilidade clínica destes fenótipos em predizer a possibilidade de ocorrência de asma entre crianças sibilantes ainda é incerta. Atualmente, o termo sibilância recorrente tem sido amplamente utilizado na prática clínica como um dos fatores sugestivos para o desenvolvimento da asma em crianças até 5 anos de idade, bem como para estratégias relacionadas ao tratamento. Entende-se por sibilância recorrente episódios tipicamente associados a infecções do trato respiratório superior que se repetem por 6 a 8 vezes por ano em crianças de até 5 anos de idade (Global Strategy, 2017), podendo, também, ser definida especificamente para crianças de até 1 ano de idade como episódios que se repetem 3 ou mais vezes neste período (Mallol *et al.*, 2010).

A sibilância recorrente representa uma grande causa de morbidade entre crianças (Ducharme *et al.*, 2014), levando à diminuição da qualidade de vida no núcleo familiar, o que a caracteriza como um problema de saúde pública tanto em países em desenvolvimento, quanto em países desenvolvidos. Devido sua significância no sistema de saúde, a sibilância recorrente foi tema de um importante estudo internacional intitulado EISL (Estudo Internacional de Sibilância em Lactentes), desenvolvido entre os anos de 2005 e 2007 com a participação de 30.093 crianças entre 12-15 meses de idade em 17 centros da América Latina e Europa. Os resultados apontam que 45,2% das crianças apresentaram ao menos 1 episódio de sibilância durante o primeiro ano de vida e que a prevalência de sibilância recorrente é alta (20,3%) e variável entre os países, sendo menor e menos severa nos países europeus. (Mallol *et al.*, 2010).

1.2 Fatores de risco para a sibilância e a asma

O sexo masculino tem sido identificado como fator de risco para sibilância transitória e recorrente em crianças até 8 anos de idade, sendo dois terços das crianças asmáticas representadas por meninos (Caudri *et al.*, 2013). Após a puberdade, este quadro se inverte, ocorrendo mais mulheres do que homens afetados (Miller *et al.*, 2014)

O nascimento prematuro também aumenta a chance de desenvolvimento de sibilância recorrente, mesmo quando não existe doença pulmonar crônica associada. A associação ocorre ainda entre o período de gestação e os distúrbios de sibilância, sendo que crianças nascidas muito prematuramente apresentam um risco três vezes maior de desenvolver sibilância que crianças nascidas a termo (Been *et al.*, 2014).

Alguns estudos apontam um aumento significativo da prevalência de sibilância em crianças com dermatite atópica precoce (início dos sintomas nos primeiros 2 anos de vida) (Illi *et al.*, 2004). Discute-se muito, também, o papel desempenhado pela dermatite atópica na marcha atópica, situação de progressão a outras doenças atópicas como asma e rinite alérgica a partir da dermatite atópica. Acredita-se que a dermatite atópica seja um pré-requisito para desenvolvimento de asma e rinite alérgica, embora mais evidências sejam necessárias para estabelecer uma relação causal entre estas desordens.(Zheng *et al.*, 2011).

Exposição materna ao tabaco durante a gravidez é outro fator de risco para desenvolvimento de sibilância recorrente, bem como para diagnóstico de asma até os dois anos de idade (Lannero *et al.*, 2006). Já é bem estabelecido que a exposição passiva ao tabaco exerce papel fundamental no desenvolvimento da asma (Ciaccio e Gentile, 2013), assim como na diminuição da qualidade de vida de pacientes asmáticos e aumento da gravidade da doença (Comhair *et al.*, 2011).

Outra condição que ganha destaque entre os fatores de risco para desenvolvimento de sibilância e asma são as infecções do trato respiratório, principalmente causadas pelo vírus sincicial respiratório (RSV) e pelo rinovírus (RV). Dentre muitos estudos que avaliam estas associações, Daniel J. Jackson e colaboradores em 2008 não só comprovaram esta relação como também demonstraram que a infecção por RV ocorrida em algum momento dos primeiros três anos de vida aumenta em quase 10 vezes o risco de desenvolvimento de asma em crianças até os 6 anos de idade, enquanto infecções por RSV estão associadas com um menor risco de asma neste mesmo grupo de crianças, quando comparadas a infecções por RV. (Jackson *et al.*, 2008).

Há bastante tempo o histórico familiar de asma vem sendo estabelecido como fator de risco para desenvolvimento da doença (Litonjua *et al.*, 1998), apresentando resultados satisfatórios quando utilizado em sistemas de índice clínico para definir risco de asma em crianças com sibilância recorrente (Castro-Rodriguez *et al.*, 2000). Devido à sua importância significativa, o histórico familiar também é utilizado como sinal sugestivo para diagnóstico de asma em crianças até os 5 anos de idade (Global Strategy, 2017).

Número de eosinófilos e níveis de vitamina D no sangue também aparecem na lista dos fatores associados ao desenvolvimento da asma. A ausência de eosinofilia vem sendo apontada, por exemplo, como um fator preditivo para remissão de sibilância entre crianças sibilantes (Just *et al.*, 2008). Ao mesmo tempo, contagens elevadas de

eosinófilos (superior a 400 células/ μ L) estão associadas com mais ataques de asma entre pacientes asmáticos (Zeiger *et al.*, 2014), e exacerbações mais severas com um menor controle da doença (Price *et al.*, 2015).

A vitamina D vem sendo associada à asma por sua capacidade de modular diversas vias imunológicas, regulando a ação de linfócitos, mastócitos e células apresentadoras de antígenos, desempenhando, desta forma, importante papel em processos inflamatórios (Pfeffer e Hawrylowicz, 2017). Estudos têm apontado que a deficiência de vitamina D favorece a exacerbação da asma e dificulta seu controle (Solidoro *et al.*, 2017), bem como a suplementação de vitamina D durante a gravidez leva a uma redução significativa do risco de asma e sibilância recorrente nos primeiros três anos de vida das crianças (Wolsk *et al.*, 2017).

Estudos epidemiológicos demonstram que o sobrepeso e a obesidade são, também, fatores de risco para ocorrência de asma em homens e mulheres (Beuther e Sutherland, 2007). Sugere-se que mecanismos imunológicos convergentes nessas patologias aumentam a inflamação de vias aéreas, alterando a resposta à farmacoterapia por induzir um fenótipo de difícil manejo (Sutherland, 2014), enquanto mediadores pró-inflamatórios produzidos pelo tecido adiposo causam, não somente danos endoteliais diretos, mas também formação de radicais livres.

1.3 Patogenia da asma

A patogenia da asma é bastante complexa e ainda não muito bem definida, apesar de muitos estudos serem conduzidos neste propósito. No entanto, por se tratar de uma doença crônica, já é bem estabelecido que a inflamação desempenha papel crucial na doença. Por muitos anos, os mecanismos referentes à imunologia da asma se basearam apenas no desequilíbrio entre as respostas imunes com prevalência de resposta tipo Th2, apesar deste fato não conseguir explicar todas as características inflamatórias que cercam a doença (Landgraf-Rauf *et al.*, 2016). Nesse contexto, muitos estudos demonstram ainda a participação de diversas células inflamatórias como mastócitos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos T auxiliar do tipo 2 na patogenia da asma (Mahajan e Mehta, 2006). Por outro lado, subtipos de células T auxiliares recentemente identificados como Th9 e Th17 têm sido apresentados como participantes na imunologia da asma, sendo suas principais funções produzir respectivamente IL-9 e IL-17, ambas citocinas pró-inflamatórias (Landgraf-Rauf *et al.*, 2016). Além destas células relacionadas diretamente com a inflamação, é reconhecido que células do epitélio das

vias aéreas, bem como células do músculo liso e fibroblastos também são capazes de sintetizar e liberar mediadores inflamatórios, mostrando-se importantes na asma (Mahajan e Mehta, 2006). Receptores tipo Toll (TLR) e fatores de transcrição como NF- κ B também têm sido relatados como mecanismos importantes nos processos inflamatórios, inclusive na patogenia da asma (Rahal *et al.*, 2014).

Os mediadores inflamatórios importantes em desencadear a asma e estabelecer o progresso da inflamação são as citocinas, quimiocinas e leucotrienos. Mais de 50 destes mediadores têm sido relacionados com a asma. No entanto, estudos em animais e humanos limitam-se a algumas citocinas e seus receptores como alvos de estudos direcionados principalmente ao tratamento da asma (Landgraf-Rauf *et al.*, 2016). A IL-5, por exemplo, desempenha importante papel na asma, uma vez que é a principal citocina responsável pela produção, maturação e recrutamento de eosinófilos. Como os eosinófilos estão intimamente relacionados com a fisiopatologia da asma, alguns inibidores ou anticorpos anti IL-5 vêm sendo testados como possíveis tratamentos da doença. Uma recente meta-análise concluiu que o uso de anticorpos monoclonais anti-IL-5 pode reduzir o risco de exacerbações em pacientes asmáticos de forma segura (Wang *et al.*, 2016). A IL-9 também se relaciona com a fisiopatologia da asma, pois além de exercer função pleiotrópica sobre diversas células envolvidas na patogênese da asma, como mastócitos e eosinófilos, atua principalmente aumentando a ação de outras citocinas e fatores, como pode ser visto no aumento da liberação de IL-8 induzida por TNF- α sob sua ação. Também tem ação demonstrada no processo de hiper-responsividade, na superprodução de muco e na remodelagem das vias aéreas em pacientes asmáticos (Hauber e Hamid, 2005). Dessa forma, uma neutralização desta citocina poderia trazer benefícios aos pacientes asmáticos, o que foi demonstrado por um estudo utilizando anticorpo anti-IL-9 como tratamento para pacientes adultos com asma leve a moderada (Parker *et al.*, 2011).

1.3.1 Agentes oxidantes

Além das células e citocinas, outros mediadores inflamatórios também podem estar relacionados com a fisiopatologia da asma. As espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), por exemplo, têm sido avaliadas em diversos estudos e relacionadas à patogenia da asma (Kleniewska e Pawliczak, 2017) e de outras doenças crônicas como diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas como doença de

Parkinson e Alzheimer, artrite reumatoide e doenças cardiovasculares (Phaniendra *et al.*, 2015).

As ROS são também conhecidas como agentes oxidantes e, dependendo da configuração de seus elétrons, podem ser divididas em dois grupos: radicais livres (moléculas contendo 1 ou mais elétrons não pareados) e formas não radicais (formadas pelo compartilhamento de elétrons entre dois radicais livres). As ROS podem ser originadas de fontes endógenas ou exógenas. Mitocôndrias, células fagocíticas, peroxissomos e enzimas do citocromo P450 se destacam na produção destas espécies. Durante o processo de respiração aeróbica realizada pelas células, as mitocôndrias promovem a redução do oxigênio produzindo água e gerando superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^-). As células fagocíticas, por sua vez, apresentam a capacidade de produzir O_2^- e H_2O_2 que são utilizados na destruição de células infectadas por vírus, bactérias e outros patógenos. Os peroxissomos, organelas celulares ricas em enzimas responsáveis pela degradação de ácidos graxos e outras moléculas, também produzem ROS como subprodutos de suas reações. E, finalmente, diversas reações mediadas pelas enzimas do citocromo P450 são capazes de gerar ROS (Ames *et al.*, 1993). Entre as fontes exógenas, podemos citar: fumaça de cigarro, luz ultravioleta, radiação ionizante, poluentes, solventes orgânicos, metais e alguns medicamentos como agentes quimioterápicos (Jesenak *et al.*, 2017).

As RNS, por sua vez, são compostos de nitrogênio que, assim como as ROS, apresentam alta reatividade química. São representadas por óxido nítrico (NO), cátion nitrosil (NO^+) e peroxinitrito (ONO_2^-) (Kleniewska e Pawliczak, 2017). O NO tem destaque entre as RNS sendo gerado em tecidos biológicos a partir da reação de oxidação da arginina a citrulina por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase. É uma espécie bem abundante e importante em diversas funções fisiológicas como neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa e regulação imunológica (Valko *et al.*, 2007).

Em concentrações adequadas, as ROS/RNS se mostram benéficas ao organismo e desempenham importante papel em diversos processos fisiológicos, atuando, por exemplo, na defesa contra organismos infecciosos ou em uma série de vias de sinalização celular (Valko *et al.*, 2007). Para a manutenção destas concentrações, o organismo apresenta um sistema antioxidante que neutraliza estas espécies reativas e promove um estado de equilíbrio redox. No entanto, quando existe um desequilíbrio entre a produção das ROS/RNS e a capacidade antioxidante do organismo, origina-se

um fenômeno denominado de estresse oxidativo/nitrosativo, que está amplamente relacionado a danos celulares. (Kurutas, 2016).

1.3.2 Mecanismo antioxidante

O mecanismo antioxidante responsável por equilibrar os efeitos das ROS/RNS pode ser representado por sistemas enzimáticos ou não enzimáticos. Os antioxidantes não enzimáticos derivam da dieta e são representados por moléculas de baixa massa molecular como vitaminas E e C, beta-caroteno e glutathione, e os enzimáticos são representados por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione transferase (GST) (Birben *et al.*, 2012). A SOD tem papel essencial no consumo dos radicais superóxido. Atua catalisando a reação de dismutação do O_2^- com formação de oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. (Perry *et al.*, 2010) A CAT se apresenta como um tetrâmero composto de 4 monômeros idênticos, cada um com um grupo heme em seu sítio ativo e atua como peroxidase, sendo responsável pela degradação de H_2O_2 em O_2 e H_2O em reação que envolve a participação de íons ferro e NADPH (Birben *et al.*, 2012). A GPx também converte H_2O_2 em O_2 e H_2O , mas por meio da oxidação de glutathione (GSH) a glutathione dissulfídica (GSSG). (Kleniewska e Pawliczak, 2017). A GST catalisa a conjugação de glutathione a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico e representa um dos principais mecanismos de eliminação de xenobióticos (Huber e Almeida, 2008). Por meio destas reações, as enzimas antioxidantes desempenham um papel crucial na proteção das células contra a ação maléfica do excesso das ROS/RNS.

O excesso de ROS no organismo gera danos a várias biomoléculas por promover alterações estruturais e/ou funcionais. Entre as principais biomoléculas que sofrem com a ação dos ROS podemos citar os lipídeos, as proteínas e o DNA. A peroxidação lipídica ocorre quando radicais livres reagem com lipídeos, sendo que principal dano celular resultante deste processo está relacionado com a membrana celular, uma vez que compromete sua permeabilidade podendo até mesmo causar o seu rompimento (Kleniewska e Pawliczak, 2017). Durante a peroxidação lipídica ocorre a formação de hidroperóxidos lipídicos e uma variedade de aldeídos, sendo o malondialdeído (MDA) o mais utilizado como biomarcador deste processo devido à facilidade de reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (Ayala *et al.*, 2014). Devido à sua abundância nos sistemas biológicos, as proteínas representam um alvo bem significativo das ROS. Na maioria

das vezes, a oxidação das proteínas é irreversível e as modificações são estruturais, o que pode gerar diminuição de sua função ou até mesmo desnaturação (Kleniewska e Pawliczak, 2017), podendo contribuir para uma variedade de patologias. Na molécula de DNA, as bases constituem o alvo das ROS e sua oxidação pode gerar mutações ou deleções tanto no DNA nuclear quanto no mitocondrial, podendo resultar em alterações funcionais de vários tipos de proteínas (Rahal *et al.*, 2014)

Concentrações elevadas de NO, por exemplo, também podem levar a alterações estruturais e funcionais de proteínas ou reagir com superóxido, levando à formação de outras moléculas, como o peróxido nítrico, um potente agente oxidante que pode atuar no DNA ou em lipídeos (Valko *et al.*, 2007).

A avaliação do poder antioxidante do organismo e a quantificação dos agentes oxidantes podem ser realizadas por diversos testes laboratoriais. Considerando estudos anteriores que relacionam o estresse oxidativo à patologia da asma, o presente estudo tem por objetivo avaliar o perfil oxidativo de crianças sibilantes atendidas no Centro de Atenção Especializada do município de Viçosa-MG e determinar sua relação com fatores associados ao desenvolvimento da sibilância.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil oxidativo de pacientes pediátricos sibilantes recorrentes, atendidos no Serviço de Pneumologia do município de Viçosa, em Minas Gerais.

2.2 Objetivos Específicos

- Categorizar dos pacientes atendidos no serviço especializado;
- Quantificar o óxido nítrico sérico;
- Determinar os marcadores séricos de dano tecidual (peroxidação lipídica e proteínas carboniladas);
- Verificar a capacidade antioxidante total no soro, através da avaliação da capacidade de redução férrica (FRAP);
- Determinar a relação entre o perfil oxidativo e fatores associados à sibilância.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

O estudo contou com a participação de 109 voluntários pediátricos que seguem em atendimento no Centro de Referência Estadual de Atenção Especializada do Serviço de Pneumologia do município de Viçosa, em Minas Gerais. Os participantes foram divididos em três grupos de acordo com a faixa etária: < 36, 36 a 72 e > 72 meses de idade. As amostras foram coletadas no período de novembro de 2016 a setembro de 2017, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (CEP-UFV), parecer número 1.713.903 (ANEXO A).

Os participantes e seus responsáveis foram esclarecidos sobre a pesquisa, aqueles que aceitaram participar, assinaram respectivamente, o Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE) (ANEXO B) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO C). Com o objetivo de categorizar os voluntários foram adotados os seguintes critérios de inclusão: pacientes sibilantes recorrentes de ambos os sexos, em seguimento no referido ambulatório com idade entre 0 e 18 anos, residentes em Viçosa ou região e que aceitaram a participação no estudo através da assinatura do TCLE e do TALE. Pacientes que se recusaram a participar do estudo ou apresentavam outras doenças associadas (cardiopatias, fibrose cística, doença do refluxo gastroesofágico, pneumonia, tuberculose pulmonar, displasia broncopulmonar, paralisia cerebral, malformações congênitas pulmonares, imunodeficiências e bronquiolite obliterante pós-infecciosa) foram excluídos do estudo.

Os dados do estudo foram obtidos pela aplicação de um questionário semiestruturado baseado no *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) (ANEXO D). A amostra sanguínea foi coletada por profissional habilitado no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde da UFV, em tubo sem anticoagulante para obtenção do soro utilizado nas dosagens relativas ao estresse oxidativo.

3.2 Avaliação do perfil oxidativo

A avaliação foi realizada por meio das dosagens séricas da Capacidade de Redução Férrica (FRAP) e óxido nítrico (NO) e marcadores de dano tecidual malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada (PC).

3.2.1 Dosagem de FRAP

A reação foi efetuada em microplaca de poliestireno utilizando solução FRAP, composta por 24 mL de tampão acetato, 2,5 mL de 2,4,6-Tris-triazina (TPTZ) 10 mmol.L⁻¹ e 2,5 mL de cloreto férrico hexahidratado (BDH) 20 mmol.L⁻¹. O tampão acetato foi preparado diluindo 3,1 g de acetato de sódio triidratado (C₂H₃NaO₂ • 3H₂O) em 16 mL de ácido etanoico (C₂H₄O₂), completando com água destilada até o volume final de 1000 mL. O TPTZ foi preparado em ácido clorídrico 40 mmol.L⁻¹ e o BDH em tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹. (Benzie e Strain, 1996)

Utilizou-se solução de Trolox como agente antioxidante para determinação da curva padrão, sendo realizadas 5 diluições seriadas de fator 2 em tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹, partindo da concentração de 2 mmol.L⁻¹.

10 µL de amostra/padrão foram adicionados a 220 µL de solução FRAP e a placa incubada no escuro por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofômetro Multiskan GO Microplate Spectrophotometer da Thermo Scientific em comprimento de onda de 593 nm e as concentrações relativas às amostras foram obtidas a partir da curva padrão, sendo os resultados expressos em µmol.L⁻¹.

3.2.2 Dosagem de NO

A dosagem de NO foi realizada pelo método de Griess (modificado), que se baseia na dosagem indireta de seu metabólito nitrito (NO₂⁻) através de reação em meio ácido com sulfanilamida e dicloridrato de N-1-naftil-etilenodiamida levando à formação de um complexo cromóforo que absorve fortemente em comprimento de onda de 540 nm (Romitelli *et al.*, 2007)

Este teste foi executado em microplaca de poliestireno, fazendo a amostra reagir com o reagente de Griess, obtido pela mistura em proporção 1:1 das soluções de Sulfanilamida 1% e N-1-naftil-etilenoamida 0,1%, ambas preparadas em ácido fosfórico 2,5%. A curva padrão foi realizada utilizando nitrito de sódio 2,5 mmol.L⁻¹ em 7 diluições seriadas de fator 2, sendo a concentração inicial de 125 µmol.L⁻¹.

Em cada poço da microplaca foi adicionado 50 µL de amostra/padrão e 100 µL do reagente de Griess, deixando a reação ocorrer por 10 minutos no escuro. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Multiskan GO Microplate Spectrophotometer da Thermo Scientific em comprimento de onda 570 nm e as concentrações relativas às

amostras foram obtidas a partir da curva padrão, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol.L}^{-1}$

3.2.3 Dosagem de MDA

As concentrações de MDA foram determinadas por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que se baseia na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o MDA em baixo pH e temperatura elevada, formando um composto cuja intensidade de coloração pode ser medida em 532 nm. (Buege e Aust, 1978).

A solução de TBARS utilizada no ensaio foi preparada a partir da mistura em proporção de 1:1:1 de soluções de ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e ácido clorídrico 0,25 mol.L^{-1} , respectivamente. Em microtubos de 2mL foram adicionados 200 μL de soro e 400 μL de solução TBARS, sendo estes tubos levados em vórtex por 10 segundos e, em seguida, submetidos a banho-maria – 90 °C por 40 minutos. Após o banho-maria, os microtubos foram colocados em banho de gelo por aproximadamente 5 minutos. A etapa seguinte foi a adição de 600 μL de n-Butanol em cada um dos microtubos que foram novamente levados em vórtex por 1 a 2 minutos. Em seguida, foram submetidos à centrifugação a 1200 x g em temperatura ambiente por 5 minutos e o sobrenadante resultante deste processo foi transferido para poços da microplaca de poliestireno e realizada leitura em espectrofotômetro Multiskan GO Microplate Spectrophotometer da Thermo Scientific em comprimento de onda de 532 nm. As absorbâncias obtidas foram divididas pelo coeficiente de extinção molar do TBA ($\epsilon=0,156 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e as concentrações de MDA expressas em nmol.L^{-1} .

A fim de se obter a concentração final de MDA nas amostras, foi realizada a dosagem de proteínas totais em cada uma das amostras pelo método do ácido bicinonínico (BCA). A solução de BCA foi preparada pela mistura dos reagentes A (Ácido Bicinonínico – Sigma Life Science) e B (BCA protein assay reagent – Thermo Scientific) na proporção de 50:1, respectivamente. Foram pipetados em microplacas de poliestireno 10 μL de soro previamente diluído 1:150 e 190 μL da solução BCA. Uma curva padrão foi realizada com solução de albumina bovina partindo de uma concentração inicial de 1,0 mg/ mL e seguida de 7 diluições seriadas de fator 2. A placa com as amostras e a curva padrão foi incubada a 37 °C por 30 minutos e realizada leitura em Multiskan GO Microplate Spectrophotometer da Thermo Scientific em 562 nm. As concentrações de proteína total foram obtidas a partir da construção de uma

regressão linear. A concentração final de MDA foi obtida pelo quociente entre as concentrações de MDA obtidas conforme descrito anteriormente e as concentrações de proteína total e os resultados foram expressos em nmol/mg.

3.2.4 Dosagem de PC

A dosagem de PC foi baseada no ensaio da 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) descrito por Titiporn Mekrungruangwong e colaboradores em 2013. Neste ensaio, as proteínas carboniladas reagem com o DNPH produzindo uma base de Schiff, que, por sua vez, produz um correspondente hidrazina que pode ser medido espectrofotometricamente. (Mekrungruangwong *et al.*, 2013).

Para cada amostra foram utilizados dois microtubos, sendo um deles correspondente ao branco da amostra e o outro à amostra propriamente dita. O soro foi previamente diluído na proporção de 1:10 em solução salina. Ao microtubo correspondente à amostra foram adicionados 200 μL do soro diluído e 800 μL de solução de DNPH 10 mmol.L^{-1} e ao microtubo correspondente ao branco da amostra foram adicionados 200 μL do soro diluído e 800 μL de ácido clorídrico (HCl) 2,5 mol.L^{-1} . Os microtubos foram incubados no escuro por 1 hora, sendo que a cada 15 minutos eram submetidos ao vórtex.

Após o período de incubação, foram adicionados 1 mL de Ácido tricloroacético (TCA) 20% em cada um dos microtubos e estes foram incubados por 5 minutos em gelo. Foi realizada centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C, descartando o sobrenadante resultante do processo. O precipitado formado foi lavado duas vezes com solução de acetato de etila/etanol 1:1 por centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Por fim, foi adicionado ao precipitado 500 μL de Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 6%, realizando nova centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos a 4 °C. Do sobrenadante formado, 200 μL foram adicionados em poços de microplacas para leitura da absorbância em comprimento de onda 370 nm no Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific). A concentração de PC foi calculada por meio da subtração da absorbância da amostra pela absorbância do branco da amostra, dividindo este valor por 0,011 (referente ao coeficiente de extinção do DNPH). O valor obtido foi multiplicado por 2,5 (fator de diluição) e o resultado final de proteína carbonilada expressa em nmol.L^{-1} . Os 300 μL restantes do sobrenadante do microtubo relativo à amostra foram utilizados para medida da concentração de proteína total na amostra por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis

da Thermo Scientific em 280 nm. As concentrações foram obtidas através da realização de curva padrão com solução de albumina bovina a partir de uma concentração inicial de 2 mg/mL e expressas em mg.

A concentração final da proteína carbonilada foi expressa em nmol.L^{-1} / mg de proteína total, obtida pelo quociente entre a concentração de proteína carbonilada dosada como descrito anteriormente e a concentração da proteína total.

3.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A variável idade (meses) não apresentou distribuição normal no teste de Shapiro-Wilk, portanto foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, para múltiplas comparações. A distribuição e correlação de Spearman foi realizada entre a variável IMC e as variáveis proteína carbonilada, peroxidação lipídica, óxido nítrico e capacidade antioxidante total (FRAP). A significância estatística foi considerada com $p < 0.05$. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

A razão de prevalência foi definida por regressão de Poisson, considerando diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa Stata Corp, College Station, TX, USA.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GLOBAL Strategy for Asthma Management and Prevention (2017). Disponível em: <<http://ginasthma.org/2017-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>>. Acesso em novembro 2017.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 17, p. 7915-22, Sep 1993.

BEEN, J. V. et al. Preterm birth and childhood wheezing disorders: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Med**, v. 11, n. 1, p. e1001596, Jan 2014.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem**, v. 239, n. 1, p. 70-6, Jul 15 1996.

BEUTHER, D. A; SUTHERLAND, E. R. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, p. 661-666, Jan 2007.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, n. 1, p. 9-19, Jan 2012.

BRAND, P. L. et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. **Eur Respir J**, v. 32, n. 4, p. 1096-110, Oct 2008.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978.

CASTRO-RODRIGUEZ, J. A. et al. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 162, n. 4 Pt 1, p. 1403-6, Oct 2000.

CAUDRI, D. et al. Perinatal risk factors for wheezing phenotypes in the first 8 years of life. **Clin Exp Allergy**, v. 43, n. 12, p. 1395-405, Dec 2013.

CELEDON, J. C. et al. Bottle feeding in the bed or crib before sleep time and wheezing in early childhood. **Pediatrics**, v. 110, n. 6, p. e77, Dec 2002.

CIACCIO, C. E.; GENTILE, D. Effects of tobacco smoke exposure in childhood on atopic diseases. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 13, n. 6, p. 687-92, Dec 2013.

COMHAIR, S. A. A. et al. Detrimental Effects of Environmental Tobacco Smoke in Relation to Asthma Severity. **PLoS ONE** v. 6, n. 5, 2011.

DUCHARME, F. M.; TSE, S. M.; CHAUHAN, B. Diagnosis, management, and prognosis of preschool wheeze. **Lancet**, v. 383, n. 9928, p. 1593-604, May 3 2014.

HAUBER, H. P.; HAMID, Q. The Role of Interleukin-9 in Asthma. **Allergology International**, v. 54, p. 71-78, 2005.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. GLUTATIONA E ENZIMAS RELACIONADAS: PAPEL BIOLÓGICO E IMPORTÂNCIA EM PROCESSOS PATOLÓGICOS. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

ILLI, S. et al. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 113, n. 5, p. 925-31, May 2004.

JACKSON, D. J. et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 178, n. 7, p. 667-72, Oct 1 2008.

JESENAK, M.; ZELIESKOVA, M.; BABUSIKOVA, E. Oxidative Stress and Bronchial Asthma in Children-Causes or Consequences? **Front Pediatr**, v. 5, p. 162, 2017.

JUST, J. et al. Lack of eosinophilia can predict remission in wheezy infants? **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 5, p. 767-73, May 2008.

KLENIEWSKA, P.; PAWLICZAK, R. The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma. **Biomed Pharmacother**, v. 94, p. 100-108, Oct 2017.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J**, v. 15, n. 1, p. 71, Jul 25 2016.

LANDGRAF-RAUF, K.; ANSELM, B.; SCHAUB, B. The puzzle of immune phenotypes of childhood asthma. **Mol Cell Pediatr**, v. 3, n. 1, p. 27, Dec 2016.

LANNERO, E. et al. Maternal smoking during pregnancy increases the risk of recurrent wheezing during the first years of life (BAMSE). **Respir Res**, v. 7, p. 3, Jan 5 2006.

LITONJUA, A. A. et al. Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, n. 1, p. 176-81, Jul 1998.

MAHAJAN, S.; MEHTA, A. A. Role of Cytokines in Pathophysiology of Asthma. **Iran Jour Pharm Ther**, v. 5, p. 1-14, 2006.

MALLOL, J. et al. International prevalence of recurrent wheezing during the first year of life: variability, treatment patterns and use of health resources. **Thorax**, v. 65, n. 11, p. 1004-9, Nov 2010.

MARTINEZ, F. D. et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. **N Engl J Med**, v. 332, n. 3, p. 133-8, Jan 19 1995.

MEKRUNGRUANGWONG, T. et al. The serum protein carbonyl content level in relation to exercise stress test. **International Journal of Health & Allied Sciences**, v. 1, n. 3, p. 200-203, 2013.

MILLER, E. K. et al. Wheezing exacerbations in early childhood: evaluation, treatment, and recent advances relevant to the genesis of asthma. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 2, n. 5, p. 537-43, Sep-Oct 2014.

MORAES, L. S. et al. Risk factors associated with wheezing in infants. **J Pediatr (Rio J)**, v. 89, n. 6, p. 559-66, Nov-Dec 2013.

PARKER, J. M. et al. Safety profile and clinical activity of multiple subcutaneous doses of MEDI-528, a humanized anti-interleukin-9 monoclonal antibody, in two randomized phase 2a studies in subjects with asthma. **BMC Pulm Med**, v. 11, p. 14, Feb 28 2011.

PERRY, J. J. P. et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochim Biophys Acta**, n. 2, p. 245-262, 2010.

PFEFFER, P. E.; HAWRYLOWICZ, C. M. Vitamin D in Asthma: Mechanisms of Action and Considerations for Clinical Trials. **Chest**, Sep 18 2017.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian J Clin Biochem**, v. 30, n. 1, p. 11-26, Jan 2015.

PRICE, D. B. et al. Blood eosinophil count and prospective annual asthma disease burden: a UK cohort study. **Lancet Respir Med**, v. 3, n. 11, p. 849-58, Nov 2015.

RAHAL, A. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 761264, 2014.

ROMITELLI, F. et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 851, n. 1-2, p. 257-67, May 15 2007.

ROSENTHAL, L. A. et al. Viral respiratory tract infections and asthma: the course ahead. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 6, p. 1212-7, Jun 2010.

SAVENIJE, O. E. et al. Predicting who will have asthma at school age among preschool children. **J Allergy Clin Immunol**, v. 130, n. 2, p. 325-31, Aug 2012.

SOLIDORO, P. et al. Asthmatic Patients with Vitamin D Deficiency have Decreased Exacerbations after Vitamin Replacement. **Nutrients**, v. 9, n. 11, Nov 11 2017.

SUTHERLAND, E. R. Linking obesity and asthma. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1311, p 31-41, 2014;

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

WANG, F. P. et al. Efficacy and Safety of Anti-Interleukin-5 Therapy in Patients with Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0166833, 2016.

WOLSK, H. M. et al. Prenatal vitamin D supplementation reduces risk of asthma/recurrent wheeze in early childhood: A combined analysis of two randomized controlled trials. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0186657, 2017.

ZEIGER, R. S. et al. High blood eosinophil count is a risk factor for future asthma exacerbations in adult persistent asthma. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 2, n. 6, p. 741-50, Nov-Dec 2014.

ZHENG, T. et al. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. **Allergy Asthma Immunol Res**, v. 3, n. 2, p. 67-73, Apr 2011.

5 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados a seguir em formato de artigo original, submetido ao Jornal Brasileiro de Pneumologia, sob o título “Avaliação do perfil oxidativo de pacientes pediátricos com sibilância recorrente”, conforme ANEXO E, em 12 de dezembro de 2017.

5.1 Artigo

AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM SIBILÂNCIA RECORRENTE

EVALUATION OF THE OXIDATIVE PROFILE IN PEDIATRIC PATIENTS WITH RECURRING WHEEZING

RESUMO

Objetivo: Avaliar o perfil oxidativo de pacientes pediátricos sibilantes recorrentes, atendidos no Serviço de Pneumologia do município de Viçosa e relacioná-lo a fatores associados à asma.

Métodos: O estudo contou com a participação de 109 pacientes que foram divididos em grupos de acordo com a faixa etária (< 36, de 36 a 72 e > 72 meses). Os dados foram coletados por meio de um questionário semiestruturado e o soro obtido por punção venosa. A avaliação do perfil oxidativo foi realizada por meio das dosagens séricas da capacidade de redução férrica (FRAP) e óxido nítrico (NO) e marcadores de dano tecidual como peroxidação lipídica (MDA) e proteína carbonilada (PC).

Resultados: Crianças sibilantes recorrentes pertencentes ao grupo de 36 a 72 meses apresentaram uma menor capacidade antioxidante e menor dosagem de proteína carbonilada quando comparadas aos demais grupos. Crianças > 72 meses de idade apresentaram maiores dosagens de peroxidação lipídica e proteína carbonilada e uma ampla dispersão para ambos marcadores de dano tecidual, assim como uma maior porcentagem de indivíduos obesos ou com sobrepeso. O Índice de Massa Corporal (IMC) está diretamente relacionado aos níveis da capacidade antioxidante total e da proteína carbonilada. A dosagem de óxido nítrico não apresentou diferença significativa entre os grupos analisados.

Conclusão: A obesidade, o excesso de peso e níveis alterados de alguns marcadores de dano oxidativo, em associação com o avanço da idade, podem ser considerados contribuintes para a sibilância recorrente em crianças.

Palavras chave: sibilância, estresse oxidativo, obesidade, sobrepeso.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the oxidative profile of recurrent wheezing pediatric patients attended in the Pneumology Service of Viçosa city - Brazil, and related it to asthma related factors.

Methods: The study was made using data from 109 patients, which were divided in three groups, according to the age ranges: <36, 36 to 72 and > 72 months. Data were collected from a semi structured questionnaire. Serum was collected by venous puncture, and used to evaluate the oxidative profile by the quantification of Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP), nitric oxide (NO), and the tissue damage markers malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins (CP).

Results: Recurrent wheezing children from the group 36 to 72-month-old showed smaller antioxidative profile and PC levels when compared to the other groups. Children older than 72-month-old showed higher levels of lipid peroxidation (represented by higher MDA levels) and PC, whose data were distributed in a broad dispersion, and a higher percentage of fat and overweight subjects. The Body Mass Index (BMI) was directly related to the levels of CP and total antioxidative capacity. There were no differences in NO levels between the analyzed groups.

Conclusion: Obesity, overweight and changed levels of some oxidative damage markers, in association to the advancement of age, may be considered contributors to wheezing recurrence and in children.

Keywords: wheezing, oxidative stress, obesity, overweight.

INTRODUÇÃO

A sibilância é um processo que pode ser acarretado por causas estruturais ou funcionais. Asma e bronquite são as causas mais frequentes em crianças, mas a doença pode também ser ocasionada por infecções virais (1).

Atualmente, a sibilância recorrente tem sido utilizada como um dos fatores sugestivos para o desenvolvimento de asma em crianças de até 5 anos de idade (2) e representa uma grande causa de morbidade (1). Isso leva à diminuição da qualidade de vida no núcleo familiar, o que a caracteriza como um problema de saúde pública tanto em países em desenvolvimento, quanto em países desenvolvidos (3). Entende-se por sibilância recorrente episódios tipicamente associados a infecções do trato respiratório

superior que se repetem por 6 a 8 vezes por ano em crianças de até 5 anos de idade (2), podendo, também, ser definida especificamente para crianças de até 1 ano de idade como episódios que se repetem 3 ou mais vezes neste período (3).

Causas genéticas e ambientais são apontadas como fatores de risco para o desenvolvimento de episódios de sibilância, e identificá-las é fundamental para melhor compreensão dos diferentes fenótipos da doença, bem como para promover avanços no entendimento do desenvolvimento e progressão da asma (4).

A patogenia da asma é bastante complexa e ainda não muito bem definida, mas, por se tratar de uma doença crônica, já é bem estabelecido que a inflamação desempenha papel crucial na doença. Estudos demonstram a participação de diversas células inflamatórias como mastócitos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos T auxiliares do tipo 2 na patogenia da asma, assim como também já é reconhecido que células do epitélio das vias aéreas, do músculo liso e fibroblastos são capazes de sintetizar e liberar mediadores inflamatórios importantes para a patogenia da asma (5). Dentre esses mediadores, destacam-se as citocinas IL-5 (6) e IL-9 (7) que, além das espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (8), indicam a ocorrência de processo inflamatório.

As ROS são também conhecidas como agentes oxidantes, que apresentam alta capacidade reativa e podem se originar de fontes endógenas ou exógenas. São representadas principalmente por superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^-) (9). As RNS também apresentam alta reatividade e são representadas principalmente por óxido nítrico (NO), cátion nitrosil (NO^+) e peroxinitrito (ONO_2^-) (8).

Em concentrações adequadas, as ROS/RNS se mostram benéficas ao organismo e desempenham importante papel em diversos processos fisiológicos (10). No entanto, quando existe um desequilíbrio entre a produção das ROS/RNS e a capacidade antioxidante do organismo, origina-se um fenômeno denominado de estresse oxidativo/nitrosativo, no qual biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA podem sofrer alterações estruturais e/ou funcionais (11). A peroxidação lipídica, por exemplo, compromete principalmente a membrana celular (8) e leva à formação de diferentes aldeídos, sendo o malondialdeído (MDA) o mais utilizado como biomarcador deste processo. Na maioria das vezes, a oxidação das proteínas gera modificações estruturais, o que pode causar diminuição de sua função ou até mesmo sua desnaturação (8). Já no DNA, o principal alvo são as bases nitrogenadas, podendo gerar mutações ou deleções tanto no DNA nuclear quanto no mitocondrial (12).

Considerando estudos anteriores que relacionam o estresse oxidativo à patologia da asma, o presente estudo tem por objetivo avaliar o perfil oxidativo de crianças sibilantes recorrentes atendidas no Centro de Atenção Especializada do município de Viçosa-MG e determinar sua relação com fatores associados ao desenvolvimento da sibilância.

MÉTODOS

Desenho do estudo

O estudo contou com a participação de 109 voluntários pediátricos que seguem em atendimento no Centro de Referência Estadual de Atenção Especializada do Serviço de Pneumologia do município de Viçosa, em Minas Gerais. As amostras foram coletadas no período de novembro de 2016 a setembro de 2017, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (CEP-UFV), parecer número 1.713.903.

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: pacientes sibilantes recorrentes de ambos os sexos, em seguimento no referido ambulatório com idade entre 0 e 18 anos, residentes em Viçosa ou região e que aceitaram a participação no estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e quando aplicável, do Termo de Assentimento (TA). Pacientes que se recusaram a participar do estudo ou apresentavam outras doenças associadas (cardiopatias, fibrose cística, doença do refluxo gastroesofágico, pneumonia, tuberculose pulmonar, displasia broncopulmonar, paralisia cerebral, malformações congênitas pulmonares, imunodeficiências e bronquiolite obliterante pós-infecciosa) foram excluídos.

Coleta de amostras

A coleta dos dados foi realizada pela aplicação de um questionário semiestruturado, baseado no *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC). A amostra sanguínea foi coletada por profissional habilitado no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde da UFV.

Avaliação do estresse oxidativo

A avaliação do perfil oxidativo foi realizada por meio das dosagens séricas da capacidade antioxidante total e óxido nítrico (NO) e marcadores de dano tecidual como peroxidação lipídica (MDA) e proteína carbonilada (PC).

A dosagem sérica da capacidade antioxidante total foi baseada no método da capacidade de redução férrica (FRAP), conforme descrito anteriormente (13) com as seguintes modificações: 10 µL de amostra/padrão foram adicionados a 220 µL de solução FRAP em microplacas de poliestireno, que foram incubadas no escuro por 30 minutos. Como agente oxidante foi utilizada solução de Trolox, partindo de uma concentração inicial de 2 mmol.L⁻¹.

A dosagem sérica de NO foi realizada pelo método de Griess modificado (14), procedendo a reação em uma microplaca de poliestireno por meio da adição de 50 µL de amostra/padrão e 100 µL do reagente de Griess. A placa foi deixada no escuro por 10 minutos. O reagente de Griess foi obtido pela mistura em proporção 1:1 das soluções de Sulfanilamida 1% e N-1-naftil-etilenoamida 0,1%, ambas preparadas em ácido fosfórico 2,5%. A curva padrão foi realizada utilizando nitrito de sódio 2,5 mmol.L⁻¹, sendo a concentração inicial de 125 µmol.L⁻¹.

As leituras dos testes apresentados anteriormente foram realizadas em espectrofotômetro Multiskan GO Microplate Spectrophotometer da Thermo Scientific em comprimento de onda 570 nm e 593 nm, respectivamente. As concentrações relativas às amostras foram obtidas a partir da curva padrão sendo os resultados expressos em µM.

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito anteriormente (15). Resumidamente, as amostras foram adicionadas à solução de TBARS na proporção de 1:2, agitadas por 10 minutos em vórtex e submetidas a banho-maria 90°C por 40 minutos. Após adição de 600 µL de N-Butanol, realizou-se centrifugação a 1200 x g em temperatura ambiente por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para leitura em espectrofotômetro Multiskan GO Microplate Spectrophotometer da Thermo Scientific em comprimento de onda de 532 nm. As absorbâncias obtidas foram divididas pelo coeficiente de extinção molar do TBA ($\epsilon=0,156 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e as concentrações de MDA foram expressas em nmol.L⁻¹. Foi ainda realizada dosagem de proteínas totais em cada uma das amostras pelo método do ácido bicinonínico (BCA). A concentração final de MDA foi obtida pelo quociente entre as concentrações de MDA e as concentrações de proteína total, sendo os resultados expressos em nmol/mg.

A concentração de proteína carbonilada foi baseada no ensaio da 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) conforme descrito previamente (16). A leitura das absorbâncias foi realizada em comprimento de onda 370 nm no Multiskan GO Microplate Spectrophotometer da Thermo Scientific. A concentração de proteína total

na amostra foi determinada por leitura da amostra em espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis da Thermo Scientific em 280 nm. A concentração final da proteína carbonilada foi expressa em nmol/mg de proteína total.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A variável idade (meses) não apresentou distribuição normal no teste de Shapiro-Wilk, portanto foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, para múltiplas comparações. A distribuição e correlação de Spearman foi realizada entre a variável IMC e as variáveis proteína carbonilada, peroxidação lipídica, óxido nítrico e capacidade antioxidante total (FRAP). A significância estatística foi considerada com $p < 0.05$. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

A razão de prevalência foi definida por regressão de Poisson, considerando diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa Stata Corp, College Station, TX, USA.

RESULTADOS

Iniciando a avaliação do perfil oxidativo no soro dos pacientes, foi determinada a capacidade antioxidante total. Os pacientes foram separados em 3 grupos de acordo com a idade em meses (< 36 , 36 a 72 e > 72 meses). Observa-se na figura 1 que os indivíduos pertencentes aos grupos < 36 e > 72 meses apresentam capacidade antioxidante sérica significativamente superior aos indivíduos do grupo intermediário.

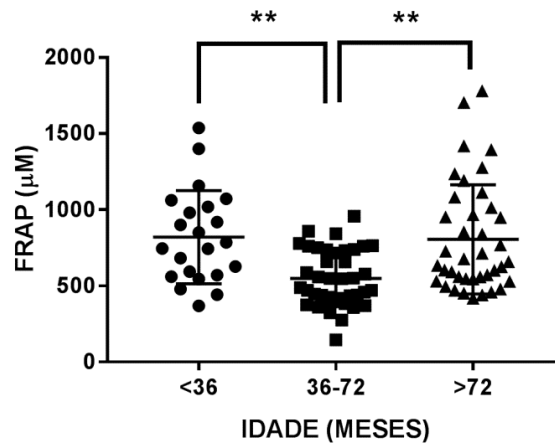


Figura 1: Capacidade antioxidante total no soro de voluntários sibilantes. Avaliação da capacidade de redução férrica (FRAP), em voluntários de diferentes idades: < 36 (n=22); 36-72 (n=42) e > 72 meses (n=39). **p<0,01 Kurskal-Wallis.

Posteriormente, foi realizada a quantificação sérica de óxido nítrico (NO). Não foi observada diferença significativa nos níveis de NO, entre os diferentes grupos avaliados (fig. 2).

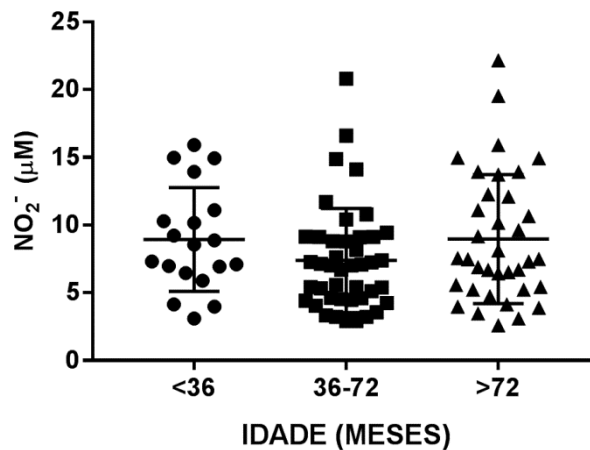


Figura 2: Detecção de óxido nítrico no soro de voluntários sibilantes. Quantificação de nitrito em voluntários de diferentes idades: <36 (n=20); 36-72 (n=43) e > 72 meses (n=36).

Em relação aos marcadores de dano tecidual, resultantes do estresse oxidativo, foram quantificados proteínas carboniladas (fig. 3A) e peroxidação lipídica (fig. 3B). O

grupo de 36 a 72 meses apresentou valores significativamente menores de proteínas carboniladas em relação aos outros dois grupos. A peroxidação lipídica apresentou dosagens significativamente superiores no grupo > 72 meses, em relação ao grupo de < 36 meses. Para ambos marcadores de dano, observou-se que o grupo de maior idade apresentou uma ampla dispersão.

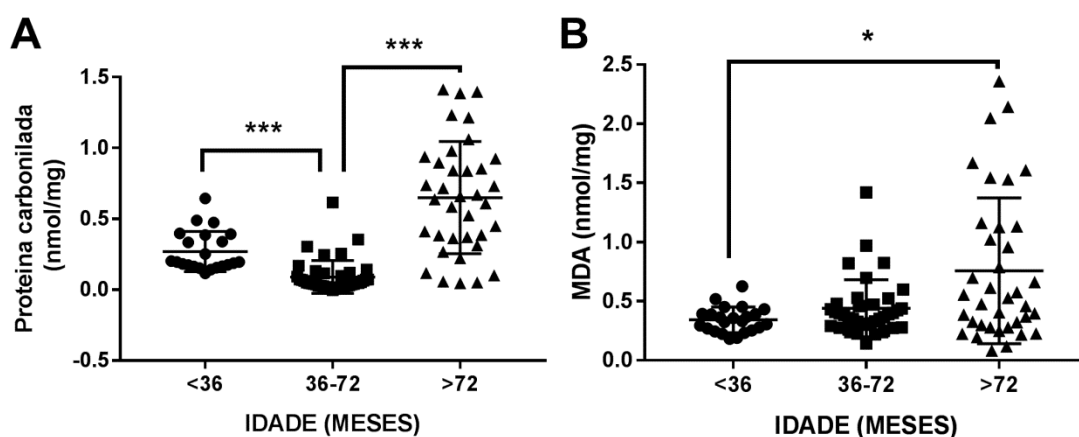


Figura 3: Quantificação de marcadores de dano tecidual em voluntários sibilantes. Avaliação de proteínas carboniladas (A) e peroxidação lipídica (B), em voluntários de diferentes idades: < 36 (n=23 em A e n= 22 em B); 36-72 (n=37 em A e n= 42 em B) e > 72 meses (n=37 em A e 36 em B). *p<0,05 e *** p<0,005 Kruskal-Wallis.

Os pacientes sibilantes recorrentes, previamente divididos em faixas etárias, foram classificados em magros, eutróficos, obesos ou com sobrepeso, através do índice de massa corporal (IMC) (fig. 4). Variações relevantes foram observadas, entre as diferentes faixas etárias, em relação à porcentagem de sibilantes obesos e com sobrepeso.

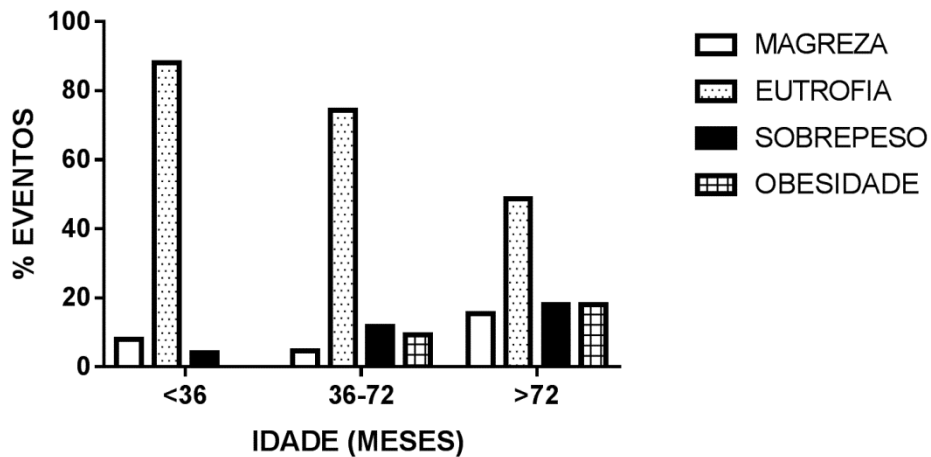


Figura 4: Porcentagem de pacientes sibilantes recorrentes obesos, com sobrepeso, eutróficos ou magreza, em relação à faixa etária (< 36, 36-72 e > 72).

Para avaliar a razão de prevalência entre as variáveis obesidade e sobrepeso e a variável idade, foi realizada uma regressão de Poisson. Observou-se que a variação da idade é diretamente proporcional a das variáveis analisadas, já que quanto maior a idade, maiores são os índices de obesidade e sobrepeso. A idade aumenta em cerca de 80% a incidência de sobrepeso e cerca de 59% de obesidade (tabela 1).

Tabela 1: Regressão de Poisson, razão de prevalência das variáveis obesidade e sobrepeso em relação à idade (meses).

Variável	IRR	[95% Intervalo de confiança]	
OBESIDADE	1.59157	1.48637	1.70422
SOBREPESO	1.80557	1.68528	1.93443

*IRR: razão de incidência

Utilizando a análise de Spearman foi determinada a correlação entre as medidas de IMC e as variáveis proteína carbonilada, peroxidação lipídica, óxido nítrico e FRAP (fig. 5). As medidas de IMC apresentaram correlação com proteína carbonilada, com $r = 0,3331$ (fig. 5A) e com a capacidade antioxidante total, com $r = 0,3039$ (fig. 5D).

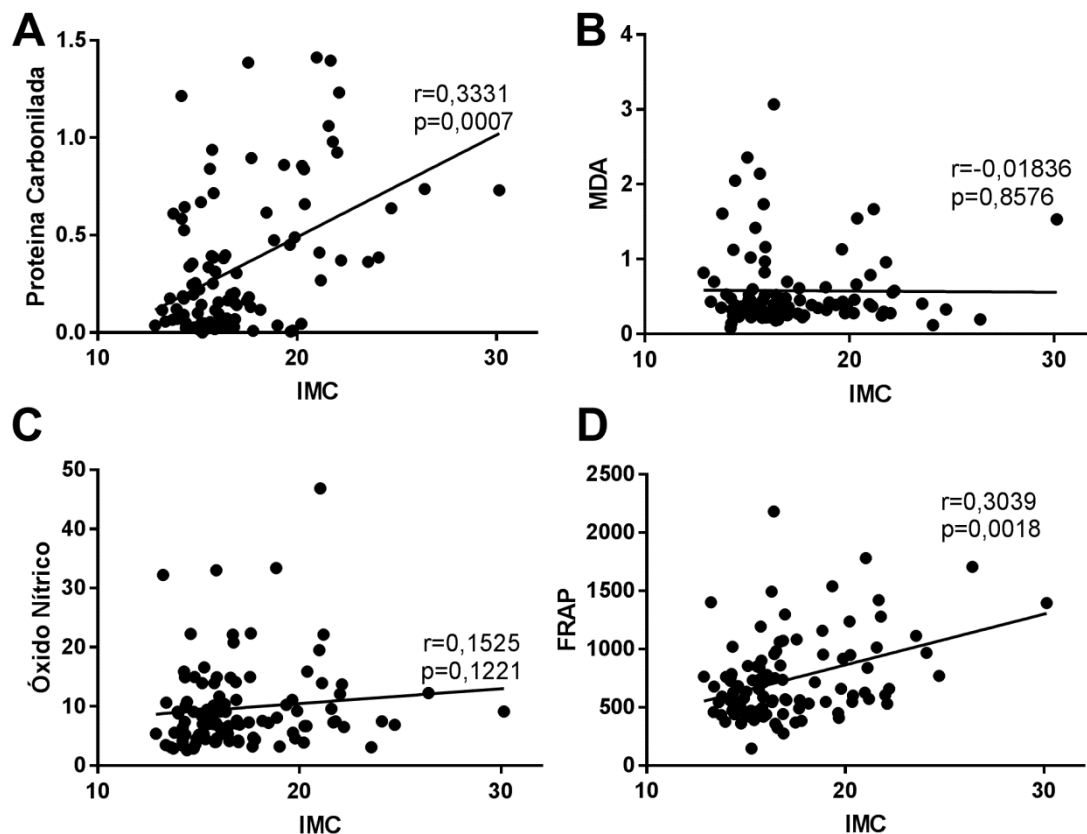


Figura 5: Gráfico de dispersão e correlação de Spearman (r), entre as variáveis IMC e Proteína carbonilada (A), peroxidação lipídica (B), Óxido nítrico (C) e capacidade antioxidante total (D). Estatisticamente significativa $p<0,005$.

DISCUSSÃO

O ambiente pulmonar contém altos níveis de oxigênio. Sua grande área de superfície e suprimento sanguíneo elevado tornam os pulmões susceptíveis a lesões mediadas pelo estresse oxidativo (17). O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a sobrecarga oxidante no organismo e os mecanismos de defesa antioxidante, com importante papel nas inflamações crônicas. Em virtude desse desequilíbrio, as espécies reativas podem interagir com proteínas, lipídios e DNA, levando a consequências patológicas (18). As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, produtos causadores de estresse oxidativo, podem ser produzidas diretamente pelas células pulmonares ou macrófagos residentes (19, 20) e sua associação com a patogênese da inflamação respiratória deve-se importantemente à oxidação do ácido araquidônico e formação de mediadores que podem exercer efeitos funcionais significativos como broncoconstrição e exsudação de plasma (21). No

pulmão humano os antioxidantes são expressos em níveis relativamente baixos e não são induzidos pelo estresse oxidativo, sendo esse papel desempenhado por antioxidantes extracelulares como os de origem dietética (vitaminas C e E), ou ainda do ácido úrico (22). Nosso estudo demonstra que crianças sibilantes apresentam capacidade antioxidante sérica em níveis distintos, nas diferenças faixas etárias avaliadas. Menores índices de capacidade antioxidante sérica foram observados nas crianças sibilantes recorrentes de 36 a 72 meses de idade.

Os pacientes sibilantes avaliados no presente estudo apresentaram detecções séricas distintas de marcadores de dano relacionados ao estresse oxidativo para as faixas etárias avaliadas. O grupo de 36 a 72 meses, que apresentou menor capacidade antioxidante total, apresentou, também, detecção significativamente menor de proteínas carboniladas do que os outros dois grupos. Considerando que o efeito antioxidante enzimático não é avaliado pelo teste de FRAP, a dosagem de enzimas específicas como dismutase oxidase ou glutathione transferase poderia nos fornecer dados que explicassem o resultado apresentado anteriormente.

Na asma, o óxido nítrico exalado, é utilizado com marcador de inflamação eosinofílica tanto em adultos como crianças. Podendo também ser utilizado como marcador de adesão ao tratamento com corticoides inalatórios, em pacientes sibilantes com inflamação eosinofílica (23). Entretanto não observamos diferença na quantificação sérica de óxido nítrico, para as três faixas etárias analisadas.

Níveis aumentados de peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO) são detectados no sangue, no escarro induzido e no lavado broncoalveolar de pacientes com asma estável. Assim como níveis elevados de muitos marcadores de estresse oxidativo diretos e indiretos, incluindo proteínas carboniladas, peroxidação lipídica, peróxido de hidrogênio e redução da capacidade antioxidante total (24-26). De forma similar, já foi descrito o desequilíbrio oxidativo em pacientes com doença obstrutiva pulmonar crônica (DPOC), com aumento dos níveis de marcadores de dano celular, como proteínas carboniladas e peroxidação lipídica e redução de enzimas antioxidantes no soro. Estas alterações permitem a associação do estresse oxidativo com a progressão e severidade da DPOC (27).

É interessante notar que os pacientes com mais de 72 meses de idade apresentaram maiores níveis de proteínas carboniladas e de peroxidação lipídica, porém com uma amplitude de dosagem bem distinta da observada para as outras duas faixas etárias. Esta última observação sugere que outros fatores podem estar relacionados com o aumento dos níveis desses marcadores de estresse oxidativo. Nesse contexto,

identificamos, neste grupo, uma maior porcentagem de indivíduos obesos ou com sobrepeso. Estudos epidemiológicos demonstram que o sobrepeso e a obesidade são fatores de risco para ocorrência de asma em homens e mulheres (28). Sugere-se que mecanismos imunológicos convergentes nessas patologias aumentam a inflamação de vias aéreas, alterando a resposta à farmacoterapia por induzir um fenótipo de difícil manejo (29). Dentre os mecanismos inatos, as células linfóides inatas (ILCs) foram recentemente relacionadas à patogênese da asma e da obesidade. As ILCs, de forma homóloga às células T auxiliares, são classificadas pelo padrão de produção de citocinas. Entretanto, as ILCs não expressam receptores específicos do antígeno, e respondem a sinais induzidos por danos (30).

Mediadores pró-inflamatórios produzidos pelo tecido adiposo causam, não somente danos endoteliais diretos, mas também formação de radicais livres. O dano oxidativo a estruturas celulares importantes é um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de complicações relacionadas à obesidade (31, 32). Estudo recente demonstrou que o tecido adiposo de crianças obesas apresenta desregulação de moduladores da biogênese mitocondrial e estrutura dessa organela, assim como descontrole do estado oxidativo (33). Nossos resultados demonstram que crianças sibilantes recorrentes com mais de 6 anos apresentam alterações significativas nos marcadores de estresse oxidativo em comparação a pacientes sibilantes menores. Interessantemente, foi identificado nesse grupo de sibilantes maiores de 6 anos uma porcentagem significativamente maior de crianças obesas ou com sobrepeso em relação às outras faixas etárias avaliadas. E, quando correlacionamos o IMC com os marcadores referentes ao estresse oxidativo, observamos uma correlação direta das medidas de IMC com as dosagens de capacidade antioxidante total e proteínas carboniladas, indicando que a obesidade pode contribuir para o desequilíbrio oxidativo. Dessa forma, podemos inferir que a obesidade, o sobrepeso e os níveis alterados de alguns marcadores de dano oxidativo, em associação com o avanço da idade, podem ser considerados contribuintes para a sibilância recorrente em crianças.

Deve-se destacar que a obesidade infantil é um dos graves desafios de saúde pública do século XXI, apresentando-se como um problema global, particularmente em ambientes urbanos. A prevalência de crianças obesas vem aumentando em ritmo alarmante e a Organização Mundial de Saúde estima que mais de 41 milhões de crianças com menos de cinco anos se encontravam acima do peso em 2016. Crianças com excesso de peso e obesidade tendem a permanecer obesas na idade adulta e mais

propensas a desenvolver doenças não transmissíveis como diabetes e doenças cardiovasculares em uma idade mais jovem (34).

De acordo com os resultados obtidos, podemos inferir que a obesidade, o excesso de peso e níveis alterados de alguns marcadores de dano oxidativo, em associação com o avanço da idade, podem ser considerados contribuintes para a recorrência da sibilância em crianças.

REFERÊNCIAS

1. Ducharme FM, Tse SM, Chauhan B. Diagnosis, management, and prognosis of preschool wheeze. *Lancet*. 2014;383(9928):1593-604.
2. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2017). Disponível em: <<http://ginasthma.org/2017-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>>. Acesso em novembro. 2017.
3. Mallol J, Garcia-Marcos L, Sole D, Brand P, Group ES. International prevalence of recurrent wheezing during the first year of life: variability, treatment patterns and use of health resources. *Thorax*. 2010;65(11):1004-9.
4. Moraes LS, Takano OA, Mallol J, Sole D. Risk factors associated with wheezing in infants. *J Pediatr (Rio J)*. 2013;89(6):559-66.
5. Mahajan S, Mehta AA. Role of Cytokines in Pathophysiology of Asthma. *Iran Jour Pharm Ther*. 2006;5:1-14.
6. Wang FP, Liu T, Lan Z, Li SY, Mao H. Efficacy and Safety of Anti-Interleukin-5 Therapy in Patients with Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166833.
7. Hauber HP, Hamid Q. The Role of Interleukin-9 in Asthma. *Allergology International*. 2005;54:71-8.
8. Kleniewska P, Pawliczak R. The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma. *Biomed Pharmacother*. 2017;94:100-8.
9. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(17):7915-22.
10. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
11. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J*. 2016;15(1):71.

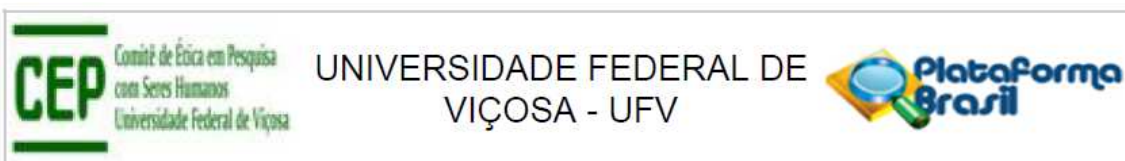
12. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int.* 2014;2014:761264.
13. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6.
14. Romitelli F, Santini SA, Chierici E, Pitocco D, Tavazzi B, Amorini AM, et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;851(1-2):257-67.
15. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
16. Mekrungruangwong T, Seenak P, Luangaram S, Thongsri T, Kumphune S. The serum protein carbonyl content level in relation to exercise stress test. *International Journal of Health & Allied Sciences.* 2013;1(3):200-3.
17. Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology.* 2009;14(1):27-38.
18. Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(3):456-68; quiz 69-70.
19. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(5):1720-45.
20. Riedla MA, Nel AE. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(1):49-56.
21. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ, 2nd. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 2004;18(15):1791-800.
22. Malhotra D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, Sandford A, Elliott M, Singh A, et al. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(6):592-604.
23. Payne DN. Nitric oxide in allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2003;3(2):133-7.
24. Aldridge RE, Chan T, van Dalen CJ, Senthilmohan R, Winn M, Venge P, et al. Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(6):847-56.

25. Jia Y, Fang X, Zhu X, Bai C, Zhu L, Jin M, et al. IL-13(+) Type 2 Innate Lymphoid Cells Correlate with Asthma Control Status and Treatment Response. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;55(5):675-83.
26. Pearson DJ, Suarez-Mendez VJ, Day JP, Miller PF. Selenium status in relation to reduced glutathione peroxidase activity in aspirin-sensitive asthma. *Clin Exp Allergy.* 1991;21(2):203-8.
27. Ahmad A, Shameem M, Husain Q. Altered oxidant-antioxidant levels in the disease prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17(8):1104-9.
28. Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(7):661-6.
29. Sutherland ER. Linking obesity and asthma. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1311:31-41.
30. Everaere L, Ait Yahia S, Boute M, Audousset C, Chenivresse C, Tsicopoulos A. Innate lymphoid cells at the interface between obesity and asthma. *Immunology.* 2018;153(1):21-30.
31. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Harmful and Beneficial Role of ROS. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7909186.
32. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1793-801.
33. Zamora-Mendoza R, Rosas-Vargas H, Ramos-Cervantes MT, Garcia-Zuniga P, Perez-Lorenzana H, Mendoza-Lorenzo P, et al. Dysregulation of mitochondrial function and biogenesis modulators in adipose tissue of obese children. *International Journal of Obesity.* 2017.
34. World Health Organization (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em dezembro. 2017.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos inferir que a obesidade, o excesso de peso e níveis alterados de alguns marcadores de dano oxidativo, em associação com o avanço da idade, podem ser considerados contribuintes para a recorrência da sibilância em crianças.

ANEXO A – Parecer Consubstancial do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fatores associados à sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de Pneumologia Pediátrica no Município de Viçosa.

Pesquisador: Sílvia Almeida Cardoso

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57579316.7.0000.5153

Instituição Proponente: Departamento de Medicina e Enfermagem

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.713.903

Apresentação do Projeto:

Conforme resumo apresentado no formulário online da Plataforma: "Trata-se de um estudo transversal realizado em pacientes pediátricos, encaminhados para seguimento em Serviço de Pneumologia, no Centro de Referência Estadual de Atenção Especializada no município de Viçosa em Minas Gerais no qual o presente trabalho visa identificar fatores associados a sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço."

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com os pesquisadores,

Objetivo primário: "Identificar fatores associados com sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de pneumologia pediátrica no município de Viçosa"

Objetivo secundário: - Avaliação do perfil de exposição aos fatores de risco, dos pacientes atendidos no Centro Estadual de Atenção especializada no município de

Viçosa. - Dosagem de vitamina D no soro. - Quantificação de metabólitos de nicotina na urina. -

Determinação do perfil de citocinas e óxido nítrico no soro. - Imunofenotipagem de células sanguíneas. -

Identificação dos antígenos mais prevalentes na população estudada".

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 36.570-900
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 1.713.903

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores apresentam no formulário online da Plataforma os seguintes Riscos: "Todos os procedimentos (questionário, coleta de amostra biológica e teste de sensibilidade cutânea) serão realizados no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa em dia e horário previamente estabelecido, em local adequado que preserva a intimidade e tranquilidade do paciente. Questionário Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em constrangimento ao responder o questionário, e para minimizar tal constrangimento o questionário será aplicado em local adequado e individualmente e a mãe será informada que poderá se recusar a responder uma ou mais perguntas. O tempo de aplicação do questionário é de 15 minutos Coleta de material biológico: Na coleta de uma amostra de sangue é possível que ocorram os seguintes desconfortos ou riscos: no momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele; complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte; se houver pequena perda de sangue no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Para minimizar o risco desse procedimento, a coleta de sangue será feito por profissional treinado para esses procedimentos e para orientação de possíveis complicações. No exame de urina: A coleta de uma amostra da urina será realizada pelo responsável legal da criança, após orientações por profissional treinado. O risco na coleta desse material é o constrangimento da criança. Para tal, a coleta é feita por seu responsável legal ou pelo mesmo (crianças com capacidade para tal), em banheiro compatível para a criança (o local possui banheiro masculino, feminino e para portadores de necessidades especiais). As amostras biológicas (sangue e urina) serão codificadas para garantir o anonimato e descartadas após análise. Teste de Sensibilidade Cutânea: Será realizado um Teste de Sensibilidade Cutânea para cada paciente. Os riscos desses exames, apesar de causarem algum desconforto são raros. As complicações sistêmicas do procedimento são raras. Para minimizar tal risco, o procedimento será realizado por médico treinado e a criança deverá permanecer no serviço 60 minutos após o teste cutâneo de sensibilidade. O Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências, pois presta atendimento a uma população de risco (cardiopatas, hipertensos, diabéticos, nefropatas e etc...) além do próprio profissional que realiza o exame ser treinado para socorro nesse tipo de eventos. Os exames complementares utilizados para a pesquisa serão realizados em laboratórios vinculados a Universidade Federal de Viçosa.

e os seguintes Benefícios: "Como benefícios da pesquisa, espera-se a detecção precoce de fatores

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário CEP: 36.570-900
UF: MG Município: VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 E-mail: cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 1.713.903

associados a sibilância recorrente permitindo seu diagnóstico, acompanhamento, prevenção e tratamento adequados e visando melhorias na qualidade de vida dos pacientes pediátricos, para possibilitar que o Sistema Único de Saúde realize ações que possam ajudar a melhorar o atendimento destes pacientes com doenças respiratórias. "

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo pretende realizar um estudo transversal no qual será aplicado um questionário estruturado, que contempla tanto dados das características gerais da sibilância recorrente e de variáveis como: fatores biológicos gerais, sociodemográficos, ambientais e relacionados à atopia. Também será coletado amostras biológicas de sangue e urina, para análise de vitamina D, marcadores inflamatórios e metabólitos de nicotina respectivamente. Também será realizado Teste de sensibilidade cutânea.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentaram os seguintes documentos:

- 1-PB informações
- 2- carta resposta
- 3-autorização modificada
- 4-Termo de assentimento
- 5-TCLE modificado
- 6-Projeto modificado
- 7-questionário
- 8-declaração instituição
- 9- declaração de manuseio biológico
- 10-TCLE

Considerações sobre os documentos:sem pendências

Recomendações:

Quando da coleta de dados, o TCLE deve ser elaborado em duas vias, rubricado em todas as suas páginas e assinado, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa ou responsável legal, bem como pelo pesquisador responsável, ou pessoa(s) por ele delegada(s), devendo todas as assinaturas constar na mesma folha.

Não é necessário apresentar os TCLEs assinados ao CEP/UFV. Uma via deve ser mantida em arquivo pelo pesquisador e a outra é do participante da pesquisa.

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 36.570-900
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 1.713.903

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao término da pesquisa é necessário apresentar, via notificação, o Relatório Final (modelo disponível no site www.cep.ufv.br). Após ser emitido o Parecer Consubstanciado de aprovação do Relatório Final, deve ser encaminhado, via notificação, o Comunicado de Término dos Estudos.

Projeto analisado durante a 6ª reunião de 2016, realizada no dia 04 de agosto de 2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_745400.pdf	25/08/2016 14:12:26		Aceito
Outros	cartaresposta.doc	25/08/2016 14:09:28	Mima Peçanha Brito	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	autorizacaomodificada.pdf	22/08/2016 09:51:14	Mima Peçanha Brito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeassentimentolivreeesclarecido.docx	22/08/2016 09:31:55	Mima Peçanha Brito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclemodificado.docx	22/08/2016 09:31:17	Mima Peçanha Brito	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetomodificado.docx	22/08/2016 09:27:24	Mima Peçanha Brito	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	questionario.docx	30/06/2016 16:04:41	Mima Peçanha Brito	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declacaodeinstituicaoefraestrutura.pdf	30/06/2016 16:03:20	Mima Peçanha Brito	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracaodemanuseiobiologico.pdf	30/06/2016 16:02:24	Mima Peçanha Brito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	tcle.docx	30/06/2016 16:01:30	Mima Peçanha Brito	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
 Bairro: Campus Universitário CEP: 36.570-900
 UF: MG Município: VICOSA
 Telefone: (31)3899-2492 E-mail: cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 1.713.903

Ausência	tcle.docx	30/06/2016 16:01:30	Mima Peçanha Brito	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodetalhado.docx	30/06/2016 16:01:01	Mima Peçanha Brito	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	30/06/2016 16:00:13	Mima Peçanha Brito	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VICOSA, 06 de Setembro de 2016

Assinado por:

HELEN HERMANA MIRANDA HERMSDORFF
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário CEP: 36.570-900
UF: MG Município: VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 E-mail: cep@ufv.br

ANEXO B – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

Você _____ está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Fatores associados à sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de Pneumologia Pediátrica no Município de Viçosa, sendo que seu representante legal, Sr (a) _____ autorizou sua participação.**”

Nesta pesquisa pretendemos detectar os fatores que podem provocar chiado no peito.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: avaliação dos prontuários das crianças acompanhadas no ambulatório de Pneumologia Infantil, responder um questionário e realizar exames (de sangue, urina e teste alérgico).

O questionário será realizado no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa. O tempo de aplicação do questionário é de 15 minutos. A coleta do material biológico (sangue e urina) e o teste alérgico serão feitos por profissionais treinados para esses procedimentos e para orientação de possíveis complicações. Todos os exames serão realizados no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa em dia e horário previamente estabelecido, em local adequado que preserve a sua intimidade e tranquilidade. O referido serviço tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências. Será coletado apenas uma amostra de sangue e uma amostra de urina bem como também será realizado somente um teste alérgico.

Como benefícios da pesquisa, espera-se a detecção precoce de problemas de saúde associados ao chiado no peito, permitindo seu diagnóstico, acompanhamento, prevenção e tratamento adequados e visando melhorias na qualidade de vida das crianças.

O motivo que nos leva a estudar estes fatores é para possibilitar que o Sistema Único de Saúde realize ações que possam ajudar a melhorar o atendimento das crianças que tem chiado no peito.

Um dos riscos envolvidos na pesquisa consiste em constrangimento ao responder o questionário, e para minimizar tal constrangimento o questionário será aplicado em local adequado e individualmente e você poderá se recusar a responder uma ou mais perguntas, sem que isso implique em qualquer alteração na forma como você será atendido (a) na unidade.

No exame de sangue é possível que ocorram os seguintes desconfortos ou riscos:

no momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele; complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte; se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias, mas os profissionais estão aptos a resolver o problema e prestar as devidas orientações.

No exame de urina: A coleta de uma amostra da urina será realizada por você ou pelo seu responsável legal, após orientações por profissional treinado. O risco na coleta desse material é o seu constrangimento. Para tal, a coleta é feita por seu responsável legal ou por você mesmo, em banheiro compatível para você. (o local possui banheiro masculino, feminino e para portadores de necessidades especiais).

No teste alérgico: será realizado, por médico treinado, um teste chamado de “teste alérgico”, onde colocamos uma gota (no braço ou nas suas costas) do que poderá ser um dos causadores de alergia e será procedida uma pequena puntura com uma lanceta estéril (algo semelhante a uma picada de muriçoca) para verificarmos se você tem ou não alergia ao que está sendo pesquisado. Os riscos desses exames, apesar de causarem algum desconforto, são raros. É muito raro a criança ter uma crise de chiado devido à realização do teste alérgico. Você deverá permanecer no serviço 60 minutos após o teste alérgico. O Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências, além do próprio profissional que realiza o exame ser treinado para socorro nesse tipo de eventos. Os exames complementares utilizados para a pesquisa serão realizados em laboratórios vinculados a Universidade Federal de Viçosa e as amostras biológicas (sangue e urina) serão descartadas após análise.

Você continuará recebendo o acompanhamento no ambulatório de pneumologia mesmo após o encerramento e /ou interrupção da pesquisa.

Não haverá nenhum custo para você participar deste estudo e nem você receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, diante de eventuais danos, identificados e comprovados, decorrentes da pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Você tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou o retirar seu consentimento e interromper a sua participação, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a) pelo pesquisador. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar. O seu nome ou o material que indique a sua participação não serão liberados

sem a sua permissão. Este termo de assentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no “Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa” e a outra será fornecida a você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, e depois desse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Nesta pesquisa não será necessário a utilização de recursos como filmagens, fotos ou gravações.

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Eu, _____ e meu responsável legal _____, fomos informados (a) dos objetivos da pesquisa “**Fatores associados à sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de Pneumologia Pediátrica no Município de Viçosa**” de maneira clara e detalhada, esclarecemos nossas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Recebi uma via original deste termo de assentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas, bem como ao meu responsável legal.

Nome do participante _____

Nome do Pesquisador Responsável: _____

Endereço: Departamento de Medicina e Enfermagem Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário Cep: 36570-900 Viçosa/MG

Telefone: (31) 3899-3176

Email: mirnabrito966@gmail.com

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá consultar: CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Universidade Federal de Viçosa Edifício Arthur Bernardes, piso inferior Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário Cep: 36570-900 Viçosa/MG Telefone: (31)3899-2492
Email: cep@ufv.br www.cep.ufv.br

Viçosa - MG, _____ de _____ de 20____

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O (A) participante _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Fatores associados à sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de Pneumologia Pediátrica no Município de Viçosa**

Nesta pesquisa pretendemos detectar os fatores que podem provocar chiado no peito.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: avaliação dos prontuários das crianças acompanhadas no ambulatório de Pneumologia Infantil, responder um questionário e realizar exames (de sangue, urina e teste alérgico).

O questionário será realizado no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa. O tempo de aplicação do questionário é de 15 minutos. A coleta do material biológico (sangue e urina) e o teste alérgico serão feitos por profissionais treinados para esses procedimentos e para orientação de possíveis complicações. Todos os exames serão realizados no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa em dia e horário previamente estabelecido, em local adequado que preserva a intimidade e tranquilidade do paciente. O referido serviço tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências. Será coletado apenas uma amostra de sangue e uma amostra de urina bem como também será realizado somente um teste alérgico.

Como benefícios da pesquisa, espera-se a detecção precoce de problemas de saúde associados ao chiado no peito, permitindo seu diagnóstico, acompanhamento, prevenção e tratamento adequados e visando melhorias na qualidade de vida das crianças.

O motivo que nos leva a estudar estes fatores é para possibilitar que o Sistema Único de Saúde realize ações que possam ajudar a melhorar o atendimento das crianças que tem chiado no peito.

Um dos riscos envolvidos na pesquisa consistem em constrangimento ao responder o questionário, e para minimizar tal constrangimento o questionário será aplicado em local adequado e individualmente e a mãe será informada que poderá se recusar a responder uma ou mais perguntas, sem que isso implique em qualquer alteração na forma como ela e sua criança é atendida na unidade.

No exame de sangue é possível que ocorram os seguintes desconfortos ou riscos:

no momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele; complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte; se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias, mas os profissionais estão aptos a resolver o problema e prestar as devidas orientações ao paciente.

No exame de urina: A coleta de uma amostra da urina será realizada pelo responsável legal da criança, após orientações por profissional treinado. O risco na coleta desse material é o constrangimento da criança. Para tal, a coleta é feita por seu responsável legal ou pelo mesmo (crianças com capacidade para tal), em banheiro compatível para a criança (o local possui banheiro masculino, feminino e para portadores de necessidades especiais).

No teste alérgico: será realizado, por médico treinado, um teste chamado de “teste alérgico”, onde colocamos uma gota (em um dos braços ou nas costas da criança) do que poderá ser um dos causadores de alergia na sua criança e será procedida uma pequena puntura com uma lanceta estéril (algo semelhante a uma picada de muriçoca) para verificarmos se a sua criança tem ou não alergia ao que está sendo pesquisado. Os riscos desses exames, apesar de causarem algum desconforto, são raros. É muito raro a criança ter uma crise de chiado devido à realização do teste alérgico. A criança deverá permanecer no serviço 60 minutos após o teste alérgico. O Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências, além do próprio profissional que realiza o exame ser treinado para socorro nesse tipo de eventos.

Os exames complementares utilizados para a pesquisa serão realizados em laboratórios vinculados a Universidade Federal de Viçosa e as amostras biológicas (sangue e urina) serão descartadas após análise.

O seu filho (a) continuará recebendo o acompanhamento no ambulatório de pneumologia mesmo após o encerramento e /ou interrupção da pesquisa.

Não haverá nenhum custo para seu filho participar deste estudo e nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, diante de eventuais danos, identificados e comprovados, decorrentes da pesquisa, ele tem assegurado o direito à indenização. O (a) participante tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou o (a) Sr.(a) de retirar seu consentimento e interromper a participação do voluntário sob sua responsabilidade, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A participação dele (a) é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a) pelo pesquisador.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição e do participante quando finalizada. O (a) participante não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar. O nome ou o material que indique a participação do voluntário não serão liberados sem a sua permissão. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no “Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa” e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, e depois desse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a identidade do participante com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Nesta pesquisa não será necessário a utilização de recursos como filmagens, fotos ou gravações.

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá consultar: CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Universidade Federal de Viçosa Edifício Arthur Bernardes, piso inferior Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário Cep: 36570-900 Viçosa/MG Telefone: (31)3899-2492 Email: cep@ufv.br www.cep.ufv.br

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Eu, _____, c o n t a t o
_____, responsável pelo participante
_____, autorizo sua participação e
declaro que fui informado(a) dos objetivos da pesquisa “**Fatores associados à sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de Pneumologia Pediátrica no Município de Viçosa**” de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

Nome do Pesquisador Responsável: _____

Endereço: Departamento de Medicina e Enfermagem Av. PH Rolfs, s/n – Campus
Universitário Cep: 36570-900 Viçosa/MG

Telefone: (31) 3899-3176

Email: mirnabrito966@gmail.com

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa,
você poderá consultar: CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Universidade Federal de Viçosa Edifício Arthur Bernardes, piso inferior Av. PH Rolfs,
s/n – Campus Universitário Cep: 36570-900 Viçosa/MG Telefone: (31)3899-2492
Email: cep@ufv.br www.cep.ufv.br

Viçosa - MG, _____ de _____ de 20____.

ANEXO D – Questionário sobre sintomas respiratórios

Questionário sobre sintomas respiratórios

Prezada(o) Mãe (Pai ou responsável): Por favor, preencha (responda) o questionário abaixo sobre problemas respiratórios da sua criança.

Pedimos para que NÃO deixe quadradinhos em branco.

RESPONDENTE Pessoa que irá preencher os dados: <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Outro (nome/parentesco): _____
DATA (HOJE): ___/___/___ CODIGO _____
NOME Nome da criança: _____ ID Idade atual(meses): _____ SEXO <input type="checkbox"/> Fem <input type="checkbox"/> Masc
LUGAR Município: _____ FONE Telefone para contato: (____) _____
ENDEREÇO: _____
DN Data de nascimento (DD/MM/AAAA): ___/___/___ PN Peso ao nascer (kg): _____
PA Peso atual (kg): _____ EN Estatura ao nascer (cm): _____ EA Estatura atual (cm): _____

Por favor, coloque um X no quadradinho que corresponda a sua resposta correta ou preencha os espaços:

- 1** **1º CHIADO** Com que idade sua criança teve o primeiro episódio de chiado no peito Idade (meses): _____
- primeira bronquite?
- 2** **CHIADO 12ºMESES** Sua criança teve chiado no peito, bronquite ou sibilância SIM NÃO
nos seus primeiros 12 meses de vida?
- 3** **QTOS CHIADOS 1º ANO** Quantos episódios de chiado no peito (bronquite Nenhum
ou sibilância) ele teve no primeiro ano de vida? Menos de 3 episódios
 3 a 6 episódios
 Mais de 6 episódios
- 4** **TRAT. ALIVIO** Sua criança recebeu tratamento com medicamentos inalados SIM NÃO NÃO SEI
para aliviar o chiado no peito (broncodilatadores) por nebulizadores ou inaladores
(bombinhas), ex: Salbutamol, Aerolin®, Berotec®, Brycanil®?
- 5** **TTO PROFILÁTICO** Sua criança recebeu tratamento com Corticóides SIM NÃO NÃO SEI
(cortisonas) inalados (bombinhas), ex: Symbicort®, Flixotide®, Seretide®,
Clenil®, Beclazol®, Budesonida, Busonid®, Pulmicort®,
Beclometasona/Fluticasona etc?

- 6 **TTO.ANTILEUCO** Sua criança recebeu tratamento com Antileucotrienos (Singulair®, Montelair®, Piemont®)? 1= SIM 2= NÃO 3= NÃO SEI
- 7 **TTO.PROFILATCOATUAL** Atualmente, sua criança está recebendo tratamento anti-inflamatório? Ex: Corticoides: Symbicort®, Flixotide®, Seretide®, Clenil®, Beclosol®, Budesonida, Busonid®, Pulmicort®, Beclometasona, Fluticasona ou Antileucotrienos, Singulair®, Montelair®, Piemont® 1= SIM 2= NÃO 3= NÃO SEI
- 8 **CHIADO.ULTIMAS.4SEM.** Se respondeu sim à pergunta de número 7, sua criança apresentou chiado nas últimas 4 semanas? 1= SIM 2= NÃO 3= NÃO SEI
- 9 **DEPERTARNOTURNO12M** Nestes últimos doze meses quantas vezes você acordou durante a noite devido à tosse, ou chiado no peito da sua criança? 1= Nunca
2= Raras vezes (<1x ao mês)
3= Algumas vezes (algumas semanas em alguns meses)
4= Frequentemente (>= 2 noites por semana, quase todos os meses)
- 10 **EMERGENCIA12M** Nestes últimos doze meses o chiado no peito (sibilância) da sua criança foi tão forte a ponto de ser necessário levá-lo a um serviço de emergência (Hospital, Clínica ou Posto de Saúde)? 1= SIM 2= NÃO
- 11 **CHIADOINTENSO12M** Nestes últimos doze meses o chiado no peito (sibilância) da sua criança foi tão intenso a ponto de você vê-lo com muita dificuldade para respirar (com falta de ar)? 1= SIM 2= NÃO
- 12 **INTERNAÇÃO** Sua criança já foi hospitalizado (internado em hospital) por bronquite? 1= SIM 2= NÃO
- 13 **DIAG.ASMA** Algum médico lhe disse alguma vez que sua criança tem asma? 1= SIM 2= NÃO
- 14 **PNM** Sua criança já teve pneumonia? 1= SIM 2= NÃO
- 15 **INTERNAÇÃO.PNM** Sua criança já foi hospitalizado por pneumonia? 1= SIM 2= NÃO
- 16 **FUMO.CASA** Alguma pessoa que a criança tem contato fuma (pai, mãe, avós, tios)? 1= NÃO
2= SIM (MÃE)
3= SIM (PAI)
4= SIM (OUTROS)

- 17 **CIGARROSDIA** Quantos cigarros essa pessoa fuma por_dia ?
 1 ½ maço
 2 1 maço
 3 acima de 1 maço
- 18 **CIGARROSTEMPO** Quanto tempo sua criança_fica em contato com essa pessoa?
 1 Diário
 2 Semanal
 3 Mensal
- 19 **VC. FUMA** Você fuma?
 1 SIM 2 NÃO
- 20 **MAE.FUMA** A mãe da criança fumou durante a gravidez?
 1 SIM 2 NÃO
- 21 **HE.ASMA** Sua criança tem familiares com asma?
 1 NÃO
 2 SIM (MÃE)
 3 SIM (PAI)
 4 SIM (OUTROS)
- 22 **HF. RINITE** Sua criança tem familiares com alergia no nariz ou rinite alérgica?
 1 NÃO
 2 SIM (MÃE)
 3 SIM (PAI)
 4 SIM (OUTROS)
- 23 **HP.DERM.AT.** Sua criança tem alergia de pele (dermatite alérgica)?
 1 SIM 2 NÃO
- 24 **CESAREA** Sua criança nasceu por cesariana (parto cesárea)?
 1 SIM 2 NÃO
- 25 **CRECHE** A sua criança está frequentando escola ou creche este ano?
 1 SIM 2 NÃO
- 26 **IDADE.CRECHE** Com que idade sua criança entrou na creche?
 Idade (meses): _____
- 27 **ALIMENTOS.IND.** Com que frequência você dá à sua criança algum dos seguintes produtos (não feitos em casa): iogurte, pudim, salgadinhos (chips), chocolate, refrigerantes, suco de frutas de caixinha ou de garrafa, geleia artificial?
 1 Nunca
 2 Uma vez por semana
 3 Uma vez ao mês
 4 Todos os dias da semana

- 28 **COMBUST.DOMEST.** Que tipo de combustível você usa para cozinhar na sua casa?
 1 Gás encanado 2 carvão
 3 gás de bujão
 4 eletricidade
 5 fogão a lenha
 6 outro
- 29 **AR COND** Você tem ar condicionado em sua casa?
 1 SIM 2 NÃO
- 30 **PET.NASC** Você tinha algum animal de estimação (cachorro, gato, passarinho, coelho) em sua casa quando sua criança nasceu?
 1 NÃO
 2 SIM
 CACHORRO/GATO
 3 SIM (OUTROS)
- 31 **PET.ATUAL** Você tem algum bicho de estimação na sua casa atualmente? (cachorro, gato, passarinho, coelho)?
 1 NÃO
 2 SIM
 CACHORRO/GATO
 3 SIM (OUTROS)
- 32 **OBJETOSPOEIRA** Você tem na sua casa objetos que acumulam poeira tais como: almofadas, carpete, cortinas e bichos de pelúcia?
 1 SIM 2 NÃO
- 33 **BANHO.CASA** Você tem banheiro com pia, chuveiro e vaso sanitário dentro de casa?
 1 SIM 2 NÃO
- 34 **COZINHA.INTERNA** A cozinha da sua casa (ou o lugar onde a comida é preparada) é dentro da casa?
 1 SIM 2 NÃO
- 35 **VC.ESCOLARIDADE** Marque qual o seu grau de escolaridade:
 1 Educação básica, primária ou nenhuma (8 anos ou menos)
 2 Educação média ou secundária incompleta (nove a 11 anos).
 3 Educação média ou secundária completa e nível superior (doze ou mais anos)
- 36 **ESCOLARIDADE.MAE** Marque qual o grau de escolaridade da mãe da criança:
 1 Educação básica, primária ou nenhuma (8 anos ou menos)
 2 Educação média ou secundária incompleta (nove a 11 anos).
 3 Educação média ou secundária completa e nível superior (doze ou mais anos)

- 37 ESCOLARIDADE,PAI** Marque qual o grau de escolaridade do pai da criança:
- 1 Educação básica, primária ou nenhuma (8 anos ou menos)
- 2 Educação média ou secundária incompleta (nove a 11 anos).
- 3 Educação média ou secundária completa e nível superior (doze ou mais anos)
- 38 LM,EXCLUSIVO** Por quantos meses a mãe deu somente leite do peito para esta criança (sem dar sucos, papinhas ou outro tipo de leite)? Idade (meses): _____
- 39 RESFRIADOS1^{os} 12MESES** Quantos resfriados (episódios de espirros, tosse e secreção nasal com ou sem febre) sua criança no primeiro ano de vida? Nº de episódios : _____
- 40 ID,1^oRESFRIADO** Com que idade sua criança se resfriou pela primeira vez? Idade (meses): _____
- 41 ALERGIAPele,1^{os} 12MESES** Sua criança tem ou teve alguma alergia de pele durante o primeiro ano de vida? (manchas vermelhas na pele com coceira, alergia à fralda, alergia à picada de mosquito, comida, metais, etc.) 1 SIM 2 NÃO
- 42 POLUIÇÃO** Você considera que o lugar onde você vive é um lugar com poluição atmosférica (fumaça de fábricas, alto tráfego de veículos, etc.)? 1 NÃO
2 SIM MUITO
3 SIM MODERADO
4 SIM POUCO
- 43 MOFO** Existe mofo (bolor) ou manchas de umidade em sua casa? 1 SIM 2 NÃO
- 44 VACINAÇÃO DIA** Sua criança tem as vacinas em dia? 1 SIM 2 NÃO
- 45 IRMÃOS** Quantos irmãos ou irmãs sua criança tem? Nº: _____
- 46 PESSOAS,CASA** Quantas pessoas (adultos e crianças) vivem atualmente na sua casa? Nº: _____
- 47 TRAB,MÃE** A mãe da criança tem atualmente um trabalho remunerado? 1 SIM 2 NÃO
- 48 TRAB,PAI** O pai da criança tem atualmente um trabalho remunerado? 1 SIM 2 NÃO
- 49 RENDA,FAM.** Qual a renda atual da família (em salários mínimos)? Nº salários: _____

- 50 **RAÇA** Qual é a raça da sua criança?
- 1= Branca
2= Não branca
Negro
Mulato
pardo
3 = Asiática (japonês, chinês)
4= Indígena
- 51 **CORT.ORAL** Sua criança recebeu tratamento com corticóides orais para controlar as crises de chiado? (Predsim®, Prelone®, Decadron®)? 1= SIM 2= NÃO 3= NÃO SEI
- 52 **VITD.2ANOS** Sua criança recebeu suplementação de vitamina D até 2 anos de idade (ADERA, AD-TIL, PROTOVIT). 1= SIM 2= NÃO 3= NÃO SEI
- 53 **VITD.ATUAL** Sua criança está recebendo atualmente suplementação de vitamina D (ADERA, AD-TIL, PROTOVIT) 1= SIM 2= NÃO 3= NÃO SEI

ANEXO E - Confirmação de Submissão

12/12/2017

ScholarOne Manuscripts

 [Jornal Brasileiro de Pneumologia](#)

[Home](#)

[Author](#)

[Review](#)

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Jornal Brasileiro de Pneumologia

Manuscript ID

JBPNEU-2017-0454

Title

EVALUATION OF THE OXIDATIVE PROFILE IN PEDIATRIC PATIENTS WITH RECURRING WHEEZING.

Authors

Marques, Emilia

Peçanha, Milma

Freitas, Rodrigo

Bastos, Daniel

Silva, Luiz Sergio

da Silva, Eduardo

Oliveira, Leandro

Cardoso, Silvia

Date Submitted

12-Dec-2017

[Author Dashboard](#)

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2017. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,757 and #7,253,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

