

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

Camila Tomio

**RELAÇÃO ENTRE A MUTAÇÃO Δ F508 E OS
MICROORGANISMOS *EUBACTERIUM RECTALE*,
FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII E *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* COM O MARCADOR INFLAMATÓRIO
INTESTINAL CALPROTECTINA EM CRIANÇAS E
ADOLESCENTES COM FIBROSE CÍSTICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Emilia Addison Machado Moreira, Dr^a

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através
do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Tomio, Camila

Relação entre a mutação $\Delta f508$ e os microorganismos *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Pseudomonas aeruginosa* com o marcador inflamatório intestinal calprotectina em crianças e adolescentes com fibrose cística
/ Camila Tomio: orientadora, Emilia Addison Machado Moreira. Florianópolis, SC, 2017.

145 p.

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

Inclui referências.

1. Nutrição. 2. Fibrose Cística. 3. Estado Nutricional. 4. Calprotectina. 5. Microorganismos Intestinais. I. Moreira, Emilia Addison Machado. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

Camila Tomio

**RELAÇÃO ENTRE A MUTAÇÃO $\Delta F508$ E OS
MICROORGANISMOS *EUBACTERIUM RECTALE*,
FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII E *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA COM O MARCADOR INFLAMATÓRIO
INTESTINAL CALPROTECTINA EM CRIANÇAS E
ADOLESCENTES COM FIBROSE CÍSTICA**

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

Florianópolis, 26 de outubro de 2018

Prof^ª. Patrícia Faria Di Pietro, Dra.
Coordenadora do PPGN

Prof^ª. Emilia Addison Machado Moreira, Dra.
Orientadora e Presidente da banca
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof^ª. Daniela Barbieri Hauschild, Dra.
Membro Externo ao PPGN
Centro Universitário Estácio de Santa Catarina - UESC

Prof^ª. Tânia Silvia Fröde, Dra.
Membro Externo ao PPGN
PPGF e PPCM - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª Júlia Dubois Moreira, Dra.
Membro Interno ao PPGN
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à todos que fizeram parte dessa jornada junto comigo e, em especial, aos pacientes que em seu momento de fragilidade aceitaram fazer parte deste estudo, sem eles não teria chegado até aqui!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por mais esta oportunidade de crescimento e aprendizado. Obrigada por estar comigo em cada momento e não permitir que eu desista em cada obstáculo. Obrigada por me mostrar que seria possível e pelo amor sem limites.

Aos meus pais, **Cátia e Cláudio**, por me proporcionarem chegar até aqui e não medir esforços para que eu tivesse aquilo que vocês não tiveram **estudo!** Mãe, meu espelho e minha base, obrigada por me incentivar a buscar sempre o melhor. Amo vocês, serei eternamente grata pelo esforço e dedicação a mim desprendidos!

Ao meu amor e companheiro, **Thiago**, por me dar suporte e permitir que eu realize esse sonho. Obrigada por ter aceitado entrar nessa aventura comigo e por toda dedicação e compreensão nos momentos mais difíceis. À minha sogra querida, **Iara** pela torcida de sempre e pelo apoio.

À minha orientadora **Emilia Addison Machado Moreira**, por toda dedicação e paciência durante essa jornada. Cada encontro, cada orientação, cada detalhe, quanto aprendizado. Serei eternamente grata pela oportunidade que me deste e por me fazer acreditar que eu seria capaz!

À **Vilma Simões Pereira Panza**, que prontamente aceitou em colaborar com a realização deste trabalho, cedendo seu precioso tempo para nos enriquecer com sua experiência e conhecimento sobre estatística.

Aos **pacientes e familiares** pela confiança, carinho e comprometimento com o trabalho. Cada conversa, cada sorriso entre uma consulta e outra só me fortaleceram para seguir em frente. Acreditem sem vocês este trabalho não seria possível.

À **Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)**, pela oportunidade de estudo e ao **Programa de Pós-Graduação em Nutrição (PPGN)** e todos os docentes por permitir e incentivar a parceria e a troca de experiências entre alunos e professores.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo Apoio Financeiro e pela Bolsa de Produtividade e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo suporte ao PPGN/UFSC.

Ao **Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG)** e toda equipe multidisciplinar de Fibrose Cística e do laboratório Ciência,

que nos acolheu e permitiu a realização deste trabalho. Ao Dr. **Norberto Ludwig Neto**, chefe da equipe, pela confiança e parceria neste trabalho. Obrigada pelos incentivos e oportunidades concedidas.

À **Associação Catarinense de Assistência ao Mucoviscidótico de Santa Catarina**, SC pelo apoio.

À **Universidade Frederico II (Nápoles/Itália)** pela parceria em realizar as análises bioquímicas do material e em especial a professora **Vittoria Buccigrossi**, pela disponibilidade e dedicação com que me recebeu em seu laboratório e por compartilhar detalhadamente cada etapa do processo da técnica realizada neste trabalho.

Às minhas queridas companheiras de jornada **Cândice, Anice e Thais**, a presença de vocês deixou essa caminhada mais leve. Cândice querida, obrigada por todas as conversas, pelos conselhos e angústias compartilhado e pela amizade que construímos. As demais colegas da **turma de mestrado de 2016**, obrigada por todas as discussões e conquistas.

Às minhas amigas/irmãs, **Suelen, Pâmela, Déia, Tamara e Bruna** por terem me escutado, apoiado e incentivado a seguir em frente, mesmo quando o esgotamento era visível. Obrigada por cada encontro, conselho e pela paciência gigante nesse processo. A torcida de vocês foi fundamental!

À **Suellen Guesser Homem**, presente que o mestrado me deu. Amiga obrigada pela sua amizade, palavras de apoio e carinho e por permitir que eu pudesse compartilhar essa trajetória contigo. Poder dividir todas as angústias e conquistas com você, tornou esse processo mais leve. À **Maiara Brusco de Freitas**, idealizadora desse trabalho, obrigada pelos ensinamentos. À doutora e amiga **Diane de Lima Oliveira**, por toda sua dedicação em ajudar com dicas e sugestões, obrigada por dispor do seu tempo quando precisei. Às doutorandas e amigas **Gabriela Barni**, pelos momentos compartilhados em sala de aula, grupo de pesquisa, em casa, você sempre muito leve e alto astral e à **Alice de Freitas** pelas conversas, auxílios e ensinamentos. Obrigada ainda a todas as colegas do Grupo de Pesquisa em Nutrição Clínica e Aplicada pelo apoio e auxílio.

Às professoras **Débora Kurrle Rieger Venske** e **Yara Franco Moreno** e a doutora **Diane de Lima Oliveira** por participarem da banca examinadora da qualificação e contribuírem para a elaboração desse trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora **Daniela Barbieri Hauschild, Tânia Silvia Fröde, Júlia Dubois Moreira, Rozangela Curi Pedrosa, Débora Kurrle Rieger Venske** por aceitarem fazer parte da minha banca examinadora e colaborar com a melhora deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos, que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui, sozinha eu jamais teria conseguido.

Muito obrigada!

RESUMO

TOMIO, Camila. **Relação entre a mutação $\Delta F508$ e os microorganismos *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Pseudomonas aeruginosa* com o marcador inflamatório intestinal calprotectina em crianças e adolescentes com fibrose cística.** Florianópolis, 2018. 145 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

Introdução: A Fibrose Cística (FC) é uma doença de origem genética, resultante de mutações no gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR), as complicações da FC estão relacionadas com o tipo da mutação da proteína CFTR sendo a mutação $\Delta F508$ a mais conhecida. No intestino uma das consequências da FC é afetar a microbiota intestinal, as evidências mostram que pacientes com FC têm um padrão de microbiota intestinal que se diferencia quando comparado com um grupo controle sem FC. **Objetivo:** Avaliar a relação entre os microrganismos *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* com a presença da mutação DF508 e a resposta inflamatória intestinal medida pela calprotectina (CLP) fecal em crianças e adolescentes com FC. **Métodos:** Estudo clínico transversal com pacientes com FC, realizado entre março/2016 a dezembro de 2016, no Hospital Infantil Joana de Gusmão do estado de Santa Catarina (HJIG/SC) em Florianópolis, e inscritos na Associação Catarinense de Assistência ao Mucoviscidótico (ACAM), com 120 sujeitos compostos por crianças e adolescentes distribuídos em Grupo Controle (GC, n = 48, sem FC, atendidos no ambulatório de puericultura), e Grupo FC (GFC, n = 72, atendidos no ambulatório de Fibrose Cística). Dados com distribuição normal foram apresentados em média \pm desvio padrão e os assimétricos em mediana e intervalo interquartil: 25° - 75°. O teste “t” Student e Mann Whitney foram utilizados quando apropriado para verificar a diferença das médias. Análise de regressão linear univariada e multivariada foi realizada entre os GC, GFC, GFCDF508-Homo e GFCDF508-Hetero e as variáveis de ajuste foram idade e sexo. Para avaliar o tamanho do efeito destes dados, foi aplicada a estatística de Cohen. **Resultados:** A microbiota intestinal avaliada pela técnica de FISH revelou diferença estatisticamente

significativa para os microrganismos *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* ($p < 0,05$). As bactérias *E. rectale*, e *F. prausnitzii* tiveram sua concentração aumentada no GC quando comparadas aos grupos de FC ao passo que a *P. aeruginosa* mostrou-se elevada nos grupos com FC quando comparada ao GC, com destaque para o GFCDF508-Hetero que apresentou a maior mediana de concentração de *P. aeruginosa* ($1,77 \times 10^9$ mL fezes) e o GFCDF508-Homo que apresentou a menor mediana de concentração da *F. prausnitzii* ($0,0 \times 10^9$ mL fezes) a nível intestinal quando comparados com o GC. Em relação a inflamação intestinal avaliada pela CLP fecal foi significativamente maior para todos os grupos da FC ($p < 0,05$). O GFC apresentou a mediana de concentração da CLP fecal 231,3% maior em relação à mediana de concentração do GC, sendo que o maior aumento foi de 325,8% no GFCDF508-Homo. **Conclusão:** A FC pode contribuir para o comprometimento do estado nutricional, para a alteração da microbiota intestinal e para a presença da inflamação intestinal e quando os pacientes com FC apresentam a mutação DF508-Homozigoto, todas essas alterações parecem estar exacerbadas.

Palavras-chave: Fibrose Cística. Mutação $\Delta F508$. Microbiota Intestinal. *Eubacterium rectale*. *Faecalibacterium prausnitzii*. *Pseudomonas aeruginosa*. Inflamação Intestinal. Calprotectina Fecal.

ABSTRACT

TOMIO, Camila. **Relationship between the Δ F508 mutation and the *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Pseudomonas aeruginosa* microorganisms with the intestinal inflammatory marker calprotectin in children and adolescents with cystic fibrosis.** Florianópolis, 2018. 145 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

Background: Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disease, resulting from mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) gene, CF complications are related to the mutation type of the CFTR protein, the Δ F508 mutation is the most known. In the intestine one of the consequences of CF is to affect the gut microbiota, the evidence shows that patients with CF have a pattern of intestinal microbiota that differs when compared to a control group without CF. **Objective:** To evaluate the relationship between the *E. rectale*, *F. prausnitzii* and *P. aeruginosa* microorganisms with the presence of the DF508 mutation and the intestinal inflammatory response measured by fecal calprotectin (CLP) in children and adolescents with CF. **Subjects and Methods:** A cross-sectional clinical study with patients with CF, conducted between March 2016 and December 2016, at the Joana de Gusmão Infant Hospital in the state of Santa Catarina (HIJG / SC) in Florianópolis, and enrolled in the Catarinense Association for Mucovisoid Care (ACAM) with 120 subjects composed of children and adolescents distributed in the Control Group (CG, n = 48, without CF, attending the child care clinic), and FC Group (GFC, n = 72, attended at the Cystic Fibrosis outpatient clinic). Data with normal distribution were presented in mean \pm standard deviation and asymmetric in median and interquartile range: 25 ° - 75 °. The Student t test and Mann Whitney test were used when appropriate to verify the difference of means. Univariate and multivariate linear regression analysis was performed between GC, GFC, GFCDF508-Homo and GFCDF508-Hetero and adjustment variables were age and sex. To evaluate the size of the effect of these data, Cohen's statistic was applied. **Results:** The intestinal microbiota evaluated by the FISH technique revealed a statistically significant difference for the *E. rectale*, *F. prausnitzii* and *P. aeruginosa* (p < 0.05)

microorganisms. The bacteria *E. rectale*, and *F. prausnitzii* had their concentration increased in the GC when compared to the groups of FC whereas the *P. aeruginosa* showed to be elevated in the groups with CF when compared to the GC, emphasizing the GFCDF508-Hetero that presented the highest median concentration of *P. aeruginosa* (1.77x10⁹mL feces) and GFCDF508-Homo, which presented the lowest median concentration of *F. prausnitzii* (0.0x10⁹mL feces) at intestinal level when compared to the CG. In relation to intestinal inflammation evaluated by fecal CLP was significantly higher for all CF groups (p < 0.05). The GFC presented the median fecal CLP concentration 231.3% higher than the median CG concentration, with the highest increase being 325.8% in GFCDF508-Homo. **Conclusion:** The CF can contribute to impaired nutritional status, altered intestinal microbiota and the presence of intestinal inflammation, and when the patient has the homozygous DF508 mutation, all of these changes appear to be exacerbated.

Keywords: Cystic fibrosis. Mutation Δ F508. Gut Microbiota. *Eubacterium rectale*. *Faecalibacterium prausnitzii*. *Pseudomonas aeruginosa*. Intestinal Inflammation. Calprotectin Fecal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classes I, II, III, IV, V e VI de mutações da proteína CFTR.....	31
Figura 2 -	Estágios da colonização da microbiota intestinal (MI).....	42
Figura 3 -	Fluxograma do recrutamento das crianças e adolescentes com controle (GC) e os grupos fibrose cística (GFC).....	66
Figura 4 -	Concentração da <i>E. rectale</i> entre os GC, GFC, GFCDF508-Homo e o GFCDF508- Hetero.....	80
Figura 5 -	Concentração da <i>F. prausnitzii</i> entre os GC, GFC, GFCDF508-Homo e o GFCDF508-Hetero.....	81
Figura 6 -	Concentração da <i>P. aeruginosa</i> entre os GC, GFC, GFCDF508-Homo e o GFCDF508-Hetero.....	82
Figura 7 -	Concentração da CLP fecal entre os GC, GFC, GFCDF508-Homo e o GFCDF508- Hetero.....	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos sobre a composição da microbiota intestinal (fezes) em pacientes com fibrose cística.....	49
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização demográfica, estado nutricional e clínico, entre o grupo controle (GC) com o grupo fibrose cística (GFC), GFCDF508-Homozigoto (GFCDF508-Homo) e GFCDF508-Heterozigoto (GFCDF508-Hetero).	77
Tabela 2 -	Caracterização da bacteriologia pulmonar, microrganismos e inflamação intestinal do grupo controle (GC), grupo fibrose cística (GFC), GFCDF508-Homozigoto (GFCDF508-Homo) e GFCDF508-Heterozigoto (GFCDF508-Hetero).....	85
Tabela 3 -	Estado nutricional, microrganismos e inflamação intestinal entre os grupos controle (GC), grupo fibrose cística (GFC).....	89
Tabela 4 -	Estado nutricional, microrganismos e inflamação intestinal entre os grupos controle (GC), grupo fibrose cística (GFC): GFCDF508-Homozigoto (GFCDF508-Homo).....	90
Tabela 5 -	Estado nutricional, inflamação intestinal e microbiota intestinal entre os grupos controle (GC), grupo fibrose cística (GFC):GFCDF508-Heterozigoto (GFCDF508-Hetero).....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácido Graxo de Cadeia Curta
ACAM	Associação Catarinense de Assistência ao Mucoviscidótico
CB	Circunferência Braquial
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i> (Reguladora da Transmembrane da Fibrose Cística)
CLP	Calprotectina
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
E/I	Estatutura-para-Idade
<i>E. rectale</i>	<i>Eubacterium rectale</i>
<i>F. prausnitzii</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
FC	Fibrose Cística
FISH	<i>Fluorescent in Situ Hybridization</i> (Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência)
GC	Grupo Controle
GFC	Grupo Fibrose Cística
GFCDF508-Homo	Grupo Fibrose Cística DF508 Homozigoto
GFCDF508-Hetero	Grupo Fibrose Cística DF508 Heterozigoto
HIJG	Hospital Infantil Joana de Gusmão
<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
IG	Imunoglobulina
IL	Interleucina
M	Molar
IMC/I	Índice de Massa Corporal-para-Idade
N	Normal
NaCl	Cloreto de Sódio
NF-κB	Fator Nuclear-KappaB
NaN ₃	Trinitreto de Sódio
P/I	Peso-para-Idade
%GC	Percentual de Gordura Corporal
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

LPS	Lipopólissacarídeos
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
SIOD	Síndrome Obstrutiva Intestinal Distal
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> (Pacote Estatístico para Ciência Social)
S100A12	Calgranulina
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
Tris-HCL	Cloridrato de Tris
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

SUMÁRIO	23
1 INTRODUÇÃO	26
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	29
2.1 FIBROSE CÍSTICA E SUA RELAÇÃO COM A MUTAÇÃO GENÉTICA.....	29
2.2 FIBROSE CÍSTICA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	33
2.3 FIBROSE CÍSTICA: INFECÇÃO E INFLAMAÇÃO.....	36
2.4 FIBROSE CÍSTICA: MICROBIOTA INTESTINAL E A MUTAÇÃO GENÉTICA DF508.....	40
2.5 FIBROSE CÍSTICA: RELAÇÃO ENTRE MICROBIOTA INTESTINAL E A CALPROTECTINA FECAL.....	54
2.6 MICROBIOTA INTESTINAL, INDICADORES NUTRICIONAIS, FIBROSE CÍSTICA E A MUTAÇÃO GENÉTICA DF508.....	56
3 JUSTIFICATIVA.....	60
4 OBJETIVOS.....	63
4.1 OBJETIVO GERAL.....	63
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
5 SUJEITOS E MÉTODOS	65
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	65
5.2 SUJEITOS.....	65
5.2.1 Grupo Controle	67
5.2.2 Grupo FC.....	67
5.3 Protocolo de Pesquisa.....	68

5.4 AVALIAÇÃO DOS INDICADORES NUTRICIONAIS.....	68
5.5 SHWACHMAN-KULCZYCKI SCORE (S-K ESC.....)	69
5.6 VOLUME EXPIRATÓRIO FORÇADO NO PRIMEIRO SEGUNDO (FEV1).....	69
5.7 DETERMINAÇÃO BACTERIOLÓGICA.....	69
5.8 ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL.....	70
5.8.1 Coleta e armazenamento das amostras de fezes.....	70
5.8.2 Análise dos Microrganismos pela <i>Fluorescent in Situ</i> <i>Hybridization</i>.....	71
5.8.3 Calprotectina fecal.....	72
5.9 Análise Estatística.....	73
6 RESULTADOS	75
7 DISCUSSÃO.....	93
9 PONTOS FORTES E LIMITAÇÕES.....	100
APÊNDICES	119
APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	120
Declaração de consentimento.....	122
Declaração de assentimento de participação do sujeito.....	123
APÊNDICE B: Termo de Assentimento de Participação do Sujeito.....	124
APÊNDICE C: Nota de imprensa.....	126
ANEXOS.....	129
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética Hospital infantil Joana de Gusmão.....	130
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina.....	134

ANEXO C - Termo de concessão e aceitação de apoio financeiro a projeto – CNPq.....	137
ANEXO D - Escore de Shwachman-Kulczycki.....	140
ANEXO E – Curvas de crescimento da World Health Organization (2006, 2007).....	141
ANEXO F: IMC/I para meninos de 0-5 anos e 5-19 anos.....	Erro! Indicador não definido. 142
ANEXO G: IMC/I para meninas de 0-5 anos e 5-19 anos.....	143
ANEXO H: E/I para meninos de 0-5 anos e 5-19 anos.....	143
ANEXO I: E/I para meninas de 0-5 anos e 5-19 anos.....	145

1 INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença de origem genética, autossômica recessiva, resultante de mutações no gene *Cystic Transmembrane Regulator* (CFTR). No núcleo celular é sintetizada a proteína CFTR e, esta é transportada para as organelas citoplasmáticas para então sofrer a maturação e ser expressa nas membranas apicais das células epiteliais (ROSA et al., 2008). A proteína CFTR é composta por 1.480 aminoácidos, e até o momento já foram identificadas aproximadamente 2.000 mutações desta proteína (MARSON et al., 2015; SIH et al., 2012). A mutação mais prevalente se caracteriza pela perda do aminoácido essencial, fenilalanina na posição 508 do códon, e pode ser chamada de F508del, Δ F508 ou DF508 (DAVIES; ALTON; BUSH, 2007; O'SULLIVAN; FREEDMAN, 2009).

Os pacientes com FC apresentam baixa expressão ou funcionalidade da proteína CFTR na membrana apical das células epiteliais, o que afeta o transporte de fluidos e eletrólitos e consequentemente pode levar à produção de um muco desidratado e viscoso (GARCIA; YANG; QUINTON, 2009; LI; SOMERSET, 2014a). A doença se manifesta em vários órgãos, como as vias aéreas superiores e inferiores, pâncreas, sistema reprodutivo masculino e intestino (DAVIES; ALTON; BUSH, 2007; HAMOSH et al., 1998; ROSENSTEIN; CUTTING, 1998).

No intestino uma das consequências da FC é afetar a microbiota intestinal, a qual é colonizada por uma complexa comunidade bacteriana que traz ao hospedeiro benefícios como fermentação metabólica de componentes alimentares não digeríveis, produção e absorção de gordura, regeneração do epitélio intestinal, resistência a colonização de patógenos e o desenvolvimento e homeostase do sistema imune (DUYTSCHAEVER et al., 2011; ENDO et al., 2014; PALMER et al., 2007).

As evidencias mostram que pacientes com FC têm um padrão de microbiota intestinal que se diferencia quando comparado com um grupo controle sem FC (BRUZZESE et al., 2014; DEL CAMPO et al., 2014; HOEN et al., 2015).

A inflamação intestinal na FC parece ser estreitamente associada à ocorrência do desequilíbrio da microbiota normal (disbiose) do intestino (LI; SOMERSET, 2014a). O comprometimento da integridade intestinal pode prejudicar a

absorção de nutrientes, o que pode seletivamente favorecer a proliferação de bactérias pró-inflamatórias, além de afetar o estado nutricional (MANOR et al., 2016; MUNCK, 2014).

Nos pacientes com FC, o intestino é um local de processos inflamatórios e o biomarcador, calprotectina (CLP), têm sido utilizados para detectar a inflamação intestinal (BRUZZESE et al., 2014), que é uma característica em pacientes com FC e pode afetar negativamente a função pulmonar e o estado nutricional (LEE et al., 2012).

As bactérias intestinais benéficas *Eubacterium rectale* (*E. rectale*) e a *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*) pertencem ao filo *Firmicutes* e são produtoras de butirato, um ácido graxo de cadeia curta que serve como fonte de combustível dos colonócitos e tem ação anti-inflamatória na mucosa do cólon (BRUZZESE et al., 2014; CAO; SHEN; RAN, 2014; COCKBURN et al., 2015). A sobrevivência deste filo no trato intestinal está ligada ao fato de ser capaz de usar os carboidratos provenientes da alimentação do hospedeiro (COCKBURN et al., 2015).

A colonização intestinal elevada pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), uma bactéria Gram-negativa oportunista, é observada frequentemente em indivíduos com a imunidade comprometida, como os pacientes com FC. A translocação de *P. aeruginosa*, bem como de seus metabólitos, através da barreira intestinal pode causar acentuada inflamação e infecções sistêmicas, inclusive nos pulmões (MARKOU; APIDIANAKIS, 2014; VALENZA et al., 2015).

A composição da microbiota intestinal na FC tem sido investigada, no entanto, pouco se sabe ainda quanto a presença dos microrganismos *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* no intestino dos pacientes com FC, bem como as relações desses microrganismos com a mutação DF508 e a inflamação intestinal nesses indivíduos.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 FIBROSE CÍSTICA E SUA RELAÇÃO COM A MUTAÇÃO GENÉTICA

A FC foi descrita pela primeira vez em 1938 pela Dra. Dorothy Hansine Andersen, e evoluiu de uma doença caracterizada por desnutrição e morte na primeira infância para uma doença com expectativa de vida de aproximadamente 50 anos em 2015(MASSIE; ROBINSON; COOPER, 2016). O diagnóstico precoce com acompanhamento clínico e terapias adequadas com objetivo de restabelecer o transporte de cloro tem alterado a epidemiologia da FC (BREWINGTON; CLANCY, 2016).

A incidência e a prevalência da FC variam de acordo com a etnia. A prevalência nas populações caucasianas com ascendência europeia aproxima-se de um a cada 2.500 nascidos vivos, sendo menos frequente na população africana e asiática onde atinge um entre 30.000 nascidos vivos e um a cada 90.000 nascidos vivos respectivamente. No Brasil, as estimativas sugerem que a FC afeta um entre 1.600-14.000 nascidos vivos variando entre descendentes europeus e afro-brasileiros (EGAN, 2016; SILVA FILHO; CASTAÑOS; RUÍZ, 2016).

De acordo com o Registro Brasileiro de Fibrose Cística de 2014, dos 3.511 pacientes com FC incluídos nesse registro, 21% se encontram na região Sul do país e destes, 4,9% estão em Santa Catarina (SILVA FILHO et al., 2014). Ainda sobre a incidência da FC, Raskin et al. (2008) e Sih et al. (2012) relatam que entre os estados brasileiros, a incidência é respectivamente de um para cada nascido vivo de: 8.700 em Santa Catarina, 9.500 no Paraná e 10.000 em Minas Gerais.

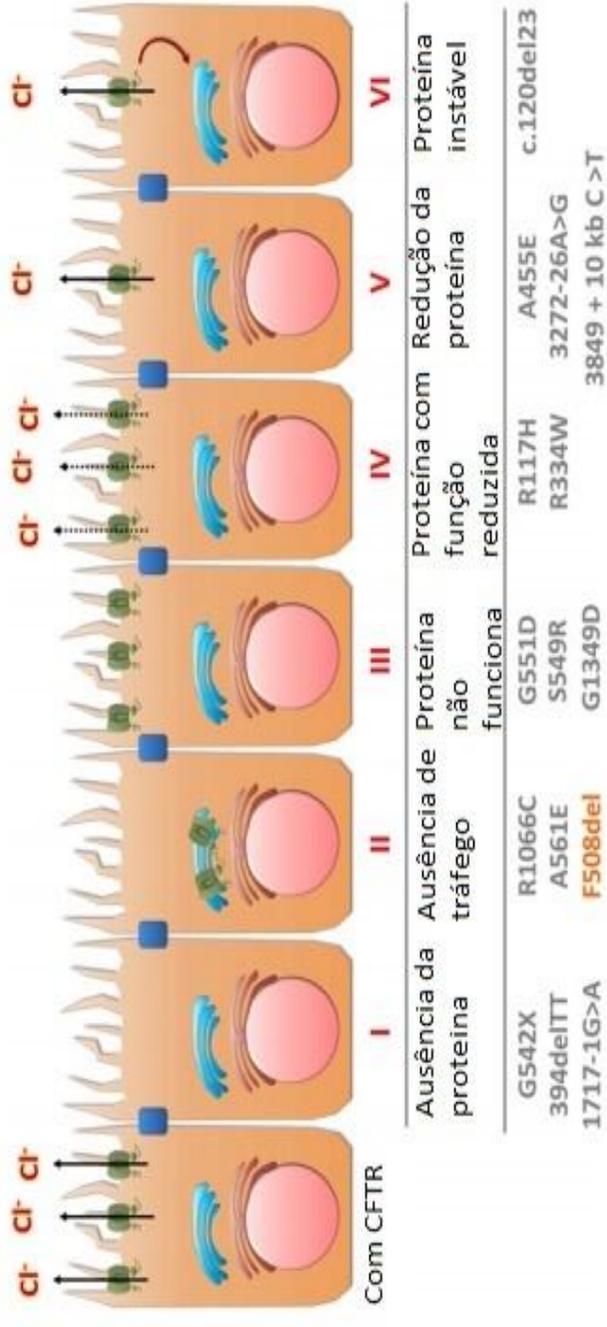
A FC é uma doença genética, autossômica, recessiva que se caracteriza por mutações no gene que codifica a proteína reguladora da transmembrana da fibrose cística (do inglês – *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* - CFTR) (EGAN, 2016). A CFTR atua como um canal de cloro e interage com o canal de sódio, sua disfunção resulta em um transporte anormal de cloro e sódio através da membrana apical de células epiteliais do trato respiratório, glândulas exócrinas e digestivas. O fluxo anormal de cloro e sódio dificulta o fluxo de água e leva à desidratação dos fluidos das glândulas exócrinas e a uma alteração nas propriedades

visco elásticas das mucinas (MARSON et al., 2015; SIH et al., 2012; SPOONHOWER; DAVIS, 2016).

A proteína CFTR é composta por 1.480 aminoácidos, e até o momento já foram identificadas aproximadamente 2.000 mutações desta proteína (MARSON et al., 2015; SIH et al., 2012). Sendo que, a mutação mais comum ocorre pela perda do aminoácido essencial, a fenilalanina no cromossomo 7 na posição 508 do códon. Sendo esta mutação, conhecida como F508del, Δ F508 ou DF508 a mais representativa, pois nenhuma outra mutação representa mais de 5% de todas as mutações (DAVIES; ALTON; BUSH, 2007; O'SULLIVAN; FREEDMAN, 2009; SIH et al., 2012).

As mutações da proteína CFTR, estão agrupadas em 6 classes com base em seus efeitos funcionais. As mutações das classes I, II e III são caracterizadas por nenhuma resposta em relação ao funcionamento da CFTR na superfície celular (EGAN, 2016). Portadores homozigotos destas mutações expressam um fenótipo mais grave da doença (DOULL, 2001), associado com insuficiência pancreática, deterioração da função pulmonar, desnutrição e mortalidade prematura (CASTELLANI et al., 2008). E as mutações das classes IV, V e VI expressam um fenótipo mais leve da doença (DOULL, 2001), pois existe alguma resposta no funcionamento da CFTR na superfície celular (EGAN, 2016) (Figura 1).

Figura 1. Classes I, II, III, IV, V e VI de mutações da proteína CFTR.



Legenda: I, II e III: Classes - que não apresentam funcionamento da proteína CFTR. IV, V e VI: Classes - que apresentam algum funcionamento da proteína CFTR. Fonte: Adaptado de Bell; De Boeck; Amaral (2015).

As mutações da classe II, em particular, afetam a maturação, a estabilidade e o direcionamento da proteína CFTR para a membrana plasmática, resultando na ausência da proteína CFTR na membrana apical (PRANKE; SERMET-GAUDELUS, 2014; WELSH; SMITH, 1993).

A síntese da proteína CFTR ocorre no retículo endoplasmático e apenas 30% de todas as cadeias polipeptídicas nascentes de CFTR atingem a membrana plasmática em um “estado completamente maduro”. A proteína CFTR sai do retículo endoplasmático e entra nas vesículas de Golgi para a maturação final e permanece estável por 16-24 horas em vesículas pós-Golgi antes de migrar para a membrana plasmática (CANT; POLLOCK; FORD, 2014). Na mutação de classe II, a proteína CFTR não consegue sair do retículo endoplasmático e é degradada pelo mecanismo de controle de qualidade celular. O controle de qualidade celular evita que o acúmulo de proteínas malformadas e que são potencialmente tóxicas para a célula, alcancem a membrana apical celular. (DOULL, 2001; PRANKE; SERMET-GAUDELUS, 2014). A mutação resulta então, na degradação da proteína CFTR ainda no retículo endoplasmático e portadores desta mutação expressam a forma mais grave da doença (DOULL, 2001).

A mutação DF508 consiste no principal representante da classe II e é a mutação de maior frequência mundial, estando presente em mais de 85% dos pacientes com CF (CFMD, 2011).

O aparecimento das complicações da FC está relacionado com o tipo da mutação da proteína CFTR. Entre as complicações tem-se o diabetes *mellitus* (DM) relacionado à FC, com aumento na prevalência de 6,5% em crianças *versus* a 34,3% em indivíduos com idade ≥ 18 anos (SPOONHOWER; DAVIS, 2016).

Na FC o DM difere do DM tipo 1 e do DM tipo 2, pois estes tendem a ter sensibilidade normal à insulina, porém produção reduzida. No DM tipo 1, a hiperglicemia é devido à ausência completa ou quase completa de células produtoras de insulina nas ilhotas Langerhans. No DM tipo 2, a hiperglicemia é devido a uma combinação de sensibilidade reduzida à insulina e produção insuficiente de insulina. Entretanto, o DM relacionado à FC pode causar as mesmas complicações observadas nas outras formas de DM, como retinopatia, nefropatia e neuropatia (BLACKMAN; TANGPRICHA, 2016; ELBORN, 2016).

A DM relacionada à FC é prevalente em pacientes que apresentam o fenótipo mais grave da doença, a mutação DF508,

além da insuficiência pancreática. Por se tratar de insuficiência de insulina, o tratamento que melhor responde é a reposição de insulina. Não há recomendações gerais de restrição na quantidade de carboidrato, como visa as recomendações gerias para o tratamento do DM tipo 2, apenas que carboidratos complexos sejam incluído em todas as refeições, e produtos como açúcar, refrigerante e doces não sejam incentivados (BLACKMAN; TANGPRICHA, 2016).

A insuficiência pancreática está fortemente associada às mutações da proteína CFTR de classe I, II e III, enquanto que as mutações de classes IV, V e VI, um fluxo mínimo de enzimas pancreáticas está presente (SATHE; FREEMAN, 2016). O diagnóstico para insuficiência pancreática pode ser obtido pela medição da elastase fecal, que quantifica a enzima protease nas fezes. Valores inferiores a 100 mg de elastase/g de fezes é sugestivo de insuficiência pancreática (ASSIS; FREEDMAN, 2016). Ainda, a esteatorreia pode se desenvolver em cerca de 85% a 90% das crianças com FC durante no primeiro ano de vida, e esta pode levar a deficiência das vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e, em casos extremos a desnutrição (O'SULLIVAN; FREEDMAN, 2009). Cerca 90% dos pacientes com síndrome obstrutiva intestinal distal (SOID), podem ter insuficiência hepática, o que é igualmente observado naqueles pacientes que apresentam o genótipo grave da FC como a mutação DF508 (KELLY; BUXBAUM, 2015).

2.2 FIBROSE CÍSTICA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

A proteína CFTR está distribuída em superfícies epiteliais como a das vias aéreas, seios paranasais, árvore biliar, pâncreas, ductos deferentes, glândulas de suor e no intestino (SPOONHOWER; DAVIS, 2016).

A CFTR também conduz bicarbonato através da membrana apical e a sua disfunção pode mudar o pH do líquido das vias aéreas. A redução do pH resulta em prejuízo na imunidade inata, pois reduz a função dos peptídeos antimicrobianos o que deixa o hospedeiro vulnerável a infecções. O muco das vias aéreas depende da presença do bicarbonato para a sua função normal. Concentrações reduzidas deste ânion têm relação com o aumento da viscosidade do muco (ELBORN, 2016).

Desta forma, defeitos na CFTR produzem um muco espesso, o que pode contribuir para a origem de infecções

pulmonares, bronquiectasias, insuficiência respiratória e pancreática, doença hepática, infertilidade masculina e obstrução intestinal, (SPOONHOWER; DAVIS, 2016).

Os sinais e sintomas da FC incluem principalmente manifestações pulmonares e gastrointestinais. Nas manifestações pulmonares ocorre a tosse crônica, produção e expectoração de muco, sibilância crônica, bronquiectasia, atelectasia e infiltrado em radiografia de tórax. E nas manifestações gastrointestinais, encontra-se o íleo meconial no período neonatal, SOID e prolapso retal. As manifestações pancreáticas, entre elas a pancreatite crônica, são caracterizadas por má absorção principalmente de lipídeos, o que pode levar a presença de esteatorreia, e consequente deficiência de crescimento (SPOONHOWER; DAVIS, 2016).

O diagnóstico da FC consiste em associar os sinais e sintomas com marcadores bioquímicos ou genéticos da alteração da proteína CFTR (MARSON et al., 2015).

Programas de triagem do recém-nascido têm sido utilizados em várias partes do mundo. O rastreio inicial tem o objetivo de medir a concentração da tripsina imunorreativa (IRT) no sangue, um marcador da função pancreática (DAVIES; ALTON; BUSH, 2007). Concentrações elevadas da IRT (>70 ng/mL) sugerem lesão pancreática que pode indicar que o indivíduo é portador de FC. Porém, por não ser um marcador específico da FC, os lactentes que apresentam uma concentração de IRT elevada nos testes iniciais, repetem o exame entre a primeira e a terceira semana após a realização do primeiro teste (O'SULLIVAN; FREEDMAN, 2009). Os bebês que apresentarem dois testes positivos para alteração de IRT são encaminhados para o teste de suor (DAVIES; ALTON; BUSH, 2007).

O teste laboratorial de referência para sugerir uma anormalidade na proteína CFTR, é o teste de suor, onde valores de cloro de ≥ 60 mmol/L sugerem diagnóstico de FC. Crianças com idade ≥ 6 meses, que apresentam valores entre >40 a ≤ 59 mmol/L e crianças com idade < 6 meses com valores entre >30 a ≤ 59 mmol/L necessitam de mais avaliações (MARSON et al., 2015; O'SULLIVAN; FREEDMAN, 2009).

Apesar de o diagnóstico da FC precoce ser realizado na triagem neonatal ou pré-natal, cerca de 10% dos pacientes ainda são diagnosticados com a idade acima dos 18 anos. Provavelmente porque estes pacientes apresentam uma forma mais leve da doença, com função pancreática preservada e doença pulmonar leve. Ou

ainda, devido ao tipo de protocolo de triagem neonatal, a presença destas alterações não foram suficientes para o diagnóstico da FC no início da vida(SPOONHOWER; DAVIS, 2016).

A manifestação gastrointestinal precoce da FC é o íleo meconial, que é uma obstrução intestinal geralmente presente em 10-20% dos recém-nascidos (BOROWITZ; GELFOND, 2013). Este se desenvolve quando as secreções grossas obstruem o lúmen gastrointestinal, ao nível do íleo terminal (KELLY; BUXBAUM, 2015), e apresenta-se dentro das primeiras 48 horas após o nascimento. O tratamento geralmente é feito com enemas hiperosmolares, descompressão nasogástrica, antibióticos e hidratação intravenosa e em últimos casos opta-se pelo procedimento cirúrgico. As crianças que apresentam íleo meconial ao nascer apresentam grandes chances de ter FC(KELLY; BUXBAUM, 2015).

As secreções intestinais espessas, a má absorção e a diminuição da motilidade intestinal podem levar a constipação crônica ou SOID em 16-21% dos pacientes com FC em todas as idades. E em até 50% daqueles com SOID tiveram íleo meconial quando crianças (KELLY; BUXBAUM, 2015; O’SULLIVAN; FREEDMAN, 2009).

Clinicamente, a presença da SOID completa ou parcial ocorre quando há dor abdominal, cólica, distensão e vômitos (BOROWITZ; GELFOND, 2013; KELLY; BUXBAUM, 2015) e o tratamento é com hidratação intravenosa, soluções de polietilenoglicol e laxantes orais, para a obstrução parcial. Na obstrução completa uma sonda nasogástrica pode descomprimir o estomago em últimos casos opta-se pelo tratamento cirúrgico (SATHE; FREEMAN, 2016).

A insuficiência pancreática deve ser tratada com terapia de reposição enzimática e adequado manejo nutricional (ELBORN, 2016). A terapia de reposição enzimática contém amilase, protease e lipase. A dosagem é baseada em unidades de lípase por kg de refeição (lipase/g do total da refeição) ou por gramas de gorduras ingeridas. Para pacientes <4 anos de idade recomenda-se 1.000-2.500 unidades de lípase/kg/refeição e para >4 anos de idade, recomenda-se 500-2.500 unidades de lípase/kg/refeição. O monitoramento da eficácia da terapia de reposição enzimática é verificado pela variação do: peso, altura e índice de massa corporal (IMC), e se necessário a dose de reposição enzimática pode ser aumentada de acordo com os sintomas (SATHE; FREEMAN,

2016).

Outras comorbidades que também tem aumentado incluem a osteopenia e a osteoporose, além da depressão que aumentou de 5% em 2003 para 12,3% em 2013 (SPOONHOWER; DAVIS, 2016). A osteoporose secundária à deficiência de vitamina D, inflamação sistêmica crônica e uso intermitente de corticosteroides é cada vez mais reconhecida como complicação da FC. A osteopenia começa na infância, mas geralmente se manifesta na idade adulta. Os pacientes com FC apresentam menor densidade mineral óssea do que o grupo controle sem FC devido ao atraso puberal, inflamação crônica e sedentarismo que contribuem para a osteopenia (ELBORN, 2016; O’SULLIVAN; FREEDMAN, 2009).

Em consequência destas complicações relacionadas à FC, os pacientes são frequentemente expostos a medicamentos, principalmente os antibióticos. E ainda sofrem com as alterações impostas à dieta (dietas ricas em gorduras e de alto valor calórico) a fim de garantir aporte calórico e estado nutricional adequado. O impacto desses fatores sobre o microambiente intestinal associado à redução da diversidade bacteriana, podem induzir desenvolvimento de inflamação intestinal na FC (GARG; OOI, 2017; MIRAGOLI et al., 2017).

O transplante pulmonar é a opção terapêutica final para pacientes com doença pulmonar terminal. O transplante possibilita estender e melhorar a qualidade de vida nos pacientes. Porém a sobrevivência por um período de 5 anos de pós-transplante para crianças é inferior a 50%, nos adultos, o resultado é um pouco melhor, 50% dos beneficiários estão vivos 6 anos após o transplante (O’SULLIVAN; FREEDMAN, 2009).

2.3 FIBROSE CÍSTICA: INFECÇÃO E INFLAMAÇÃO

As infecções são caracterizadas por organismos que penetram as barreiras naturais do corpo e se multiplicam provocando sintomas que podem variar de leve a severo. A maneira mais comum de penetração dos organismos infecciosos é através do rompimento da barreira cutânea (traumatismos, fissuras, micoses), inalação de bactérias no ar, ingestão de alimentos ou água contaminados, mordidas de vetores como carrapatos ou mosquitos que transmitem estes organismos, contato sexual e transmissão de mãe para filho via canal de parto. A infecção muitas vezes é o

principal ativador da resposta inflamatória (IDSA, 2017).

À medida que a doença evolui, os pulmões dos pacientes com FC, tornam-se infectados e inflamados. Isto ocorre devido ao volume reduzido e desidratado de líquido na superfície das vias aéreas que prejudica a depuração mucociliar, mecanismo de defesa inato dos pulmões (DAVIES; ALTON; BUSH, 2007; SPOONHOWER; DAVIS, 2016). A disfunção mucociliar na FC significa que não se consegue eliminar com eficiência as bactérias inaladas, predispondo a infecções bacterianas e desencadeando um processo inflamatório, que exacerbado, provoca a progressiva deterioração da função pulmonar, o que pode resultar no aumento da mortalidade de indivíduos com FC (GELLATLY; HANCOCK, 2013; PISI; CHETTA, 2009).

A inflamação é uma resposta protetora do organismo contra uma infecção ou lesão tecidual. A resposta do hospedeiro à infecção ou lesão tecidual denomina-se resposta inflamatória. Os efeitos mais comuns da resposta inflamatória são edema devido ao aumento do líquido intersticial, rubor e calor ocorrido pelo aumento do fluxo sanguíneo na região lesionada e dor devido à distensão dos tecidos e a ação de substâncias químicas sobre as terminações nervosas. A resposta inflamatória tem como objetivo remover a causa da lesão e iniciar o processo de recuperação tecidual local. Contudo, uma resposta inflamatória exacerbada, ao invés de auxiliar na proteção do organismo pode trazer prejuízos severos como doenças autoimunes e estados de hipersensibilidade e doença inflamatória crônica como a asma (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

O muco espesso permite a fixação de bactérias inaladas como *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) e/ou *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), e/ou *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) ou ainda *P. aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) (O'SULLIVAN; FREEDMAN, 2009). Bactérias como a do complexo de *B. cepacia*, particularmente *Burkholderia cenocepacia* (*B. cenocepacia*), assim como a *P. aeruginosa* predominam as infecções pulmonares na FC (ELBORN, 2016).

A *P. aeruginosa* é uma bactéria ambiental, oportunista, Gram-negativa em forma de bastonete. É um patógeno humano capaz de causar infecções como pneumonias e afecções cutâneas, principalmente em imunodeprimidos os quais possuem deficiência na defesa celular contra o patógeno invasor como os pacientes com FC, pacientes com queimaduras graves e ainda pacientes que

recebem cuidados intensivos (MARKOU; APIDIANAKIS, 2014).

Na infecção pulmonar aguda a *P. aeruginosa* utiliza diferentes fatores de virulência que podem danificar células epiteliais, como enzimas (proteases e elastases), toxinas, adesinas, flagelos e sistemas de secreção de proteínas (MARKOU; APIDIANAKIS, 2014).

Esses fatores de estresse ambiental induzem a expressão de diferentes conjuntos de genes que permitem que *P. aeruginosa* se adapte e mude para fenótipos persistentes e resistentes (infecção crônica), tornando-se menos virulentos, como a formação de biofilmes mucoide (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

O biofilme microbiano é definido como um agregado de células microbianas cercadas por uma matriz polimérica extracelular autoproduzida (HØIBY, 2017). As substâncias poliméricas extracelulares são polissacarídeos, proteínas, *Deoxyribonucleic acid* (DNA) extracelular e lipídios (MORADALI; GHODS; REHM, 2017). Estas substâncias extracelulares desempenham um papel importante na resistência física e química à contaminação bacteriana, resistindo a forças mecânicas (fluido da água) e reduzindo a penetração de produtos químicos (antibióticos e moléculas de defesa do hospedeiro) (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Tais agregados microbianos podem aderir a uma superfície natural ou artificial, por exemplo, nos dentes, nas células epidérmicas ou em próteses articulares ou podem estar localizados, por exemplo, no tecido de feridas crônicas no muco das membranas celulares ou no escarro (HØIBY et al., 2017).

As bactérias que crescem do biofilme são mais tolerantes aos antibióticos e aos mecanismos de defesa inatos. A *P. aeruginosa* tem a capacidade de sobreviver e persistir durante anos nos pulmões devido ao seu mecanismo de adaptação, como o desenvolvimento de biofilme que tem como função proteger essas bactérias contra os antibióticos e fagocitose (GASPAR et al., 2013). As infecções de biofilme são infecções crônicas e a expressão da doença é a inflamação crônica mediada por complexo imune assim como a resposta de anticorpos contribui para a patogênese da infecção (HØIBY et al., 2017).

O transporte intestinal de *P. aeruginosa* é provavelmente uma consequência da natureza oportunista desta espécie. A maioria das infecções por *P. aeruginosa* é secundária a uma deficiência nas defesas do hospedeiro. A imunidade do hospedeiro quando

comprometida, observa-se que a microbiota intestinal passa a atuar na defesa intestinal contra a infecção. Assim, a exposição sistêmica aos antibióticos, que altera a microbiota intestinal, reduzindo a quantidade de bactérias benéficas ao hospedeiro cria a oportunidade para o crescimento intestinal de *P. aeruginosa* (MARKOU; APIDIANAKIS, 2014; VALENZA et al., 2015).

A translocação endógena intestinal de *P. aeruginosa* é um importante fenômeno que pode causar infecções sistêmicas, especialmente em pacientes com a imunidade comprometida (VALENZA et al., 2015). Durante o processo de translocação, as bactérias atravessam a barreira intestinal, o que permite que circule entre ou através das células do epitélio intestinal e causem a infecção e a inflamação intensa (MARKOU; APIDIANAKIS, 2014).

Infecções pulmonares causadas por *P. aeruginosa* são frequentes na FC e podem ocorrer pela contaminação direta dos pulmões, pela microbiota gastrointestinal ou por disseminação hematogênica do intestino para os pulmões. A sepse e a mortalidade em pacientes imuno comprometidos são o resultado da presença de cepas altamente virulentas de *P. aeruginosa* dentro do trato intestinal e da capacidade do microrganismo de aderir à barreira epitelial intestinal (MARKOU; APIDIANAKIS, 2014).

Markou e Apidianakis (2014) em um estudo descritivo, concluíram que *P. aeruginosa* é um colonizador comum do intestino humano após imunossupressão, que geralmente é decorrente de cirurgia, trauma severo, câncer ou de tratamento com antibióticos. Além disso, as bactérias tornaram-se mais virulentas e prejudiciais ao epitélio intestinal.

As infecções por *P. aeruginosa* causadas por cepas multirresistentes aos antibióticos como os beta lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas atinge cerca de 13% dos infectados (GASPAR et al., 2013; MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

O paciente com FC, além de apresentar uma resposta inflamatória excessiva aos agentes patógenos, poderá ter até 10 vezes mais inflamação do que um indivíduo sem FC. Com o passar dos anos, os danos causados pelas infecções e inflamações das vias aéreas são irreversíveis, sendo a insuficiência pulmonar responsável por pelo menos 80% das mortes relacionadas à FC (DAVIES; ALTON; BUSH, 2007; O'SULLIVAN; FREEDMAN, 2009)

Os mecanismos que levam a inflamação intestinal na FC

ainda não estão bem elucidados (MADAN, 2016). Mas é observada mesmo na ausência de sintomas gastrointestinais evidentes, tais como as alterações na motilidade intestinal, no pH luminal, na produção de enzimas digestivas e na produção excessiva de muco, os quais podem estar relacionados às complicações gastrointestinais na FC (MIRAGOLI et al., 2017).

A disfunção da proteína CFTR interfere no transporte de bicarbonato que é importante para solubilidade do muco intestinal e regulação do pH luminal, essa disfunção resulta em acúmulo de muco hiperviscoso e acidez intestinal (GARG; OOI, 2017). A microbiota intestinal está diretamente envolvida na metabolização de componentes dietéticos não digeridos (MIRAGOLI et al., 2017). A alteração da microbiota intestinal tem consequências negativas tanto na digestão como na absorção de nutrientes, o que pode levar à desnutrição (LI; SOMERSET, 2014a).

A desnutrição está associada à maior morbidade e mortalidade entre os pacientes com FC, assim como o adequado estado nutricional tem influência positiva na saúde pulmonar e sobrevida do paciente com FC (SOLOMON; BOZIC; MASCARENHAS, 2016). Desta forma, a microbiota intestinal deve ser avaliada no tratamento da FC de forma contínua, a fim de contribuir para atender às necessidades nutricionais específicas, de acordo com a mutação e manifestação clínica.

2.4 FIBROSE CÍSTICA: MICROBIOTA INTESTINAL E A MUTAÇÃO GENÉTICA DF508

O desenvolvimento do ser humano no período intrauterino ocorre em um ambiente estéril. A colonização do trato gastrointestinal inicia-se durante o nascimento ao entrar em contato com o meio externo. Na ausência dos mecanismos imunológicos do adulto, o trato digestivo do recém-nascido é um ambiente permissivo, no qual os colonizadores iniciais alcançam rapidamente níveis de 10^{11} bactérias por grama de fezes (DORÉ; CORTIER, 2010; TIHONEN; OUWEHAND; RAUTONEN, 2010).

A colonização segue um esquema organizado sob o controle de fatores exógenos e endógenos. Fatores exógenos incluem o tempo de gestação (pré-termo ou a termo), o tipo de parto (vaginal ou cesariana), a exposição à micro-organismos de origem materna (fecal, vaginal e cutânea), a dieta infantil (amamentação exclusiva e/ou fórmula infantil), o ambiente de

nascimento, e ocasionalmente a própria antibioticoterapia, que podem induzir perturbações significativas. Os fatores endógenos incluem secreções do trato digestivo e também produtos dos primeiros microrganismos colonizadores (DORÉ; CORTIER, 2010; GOULET, 2015).

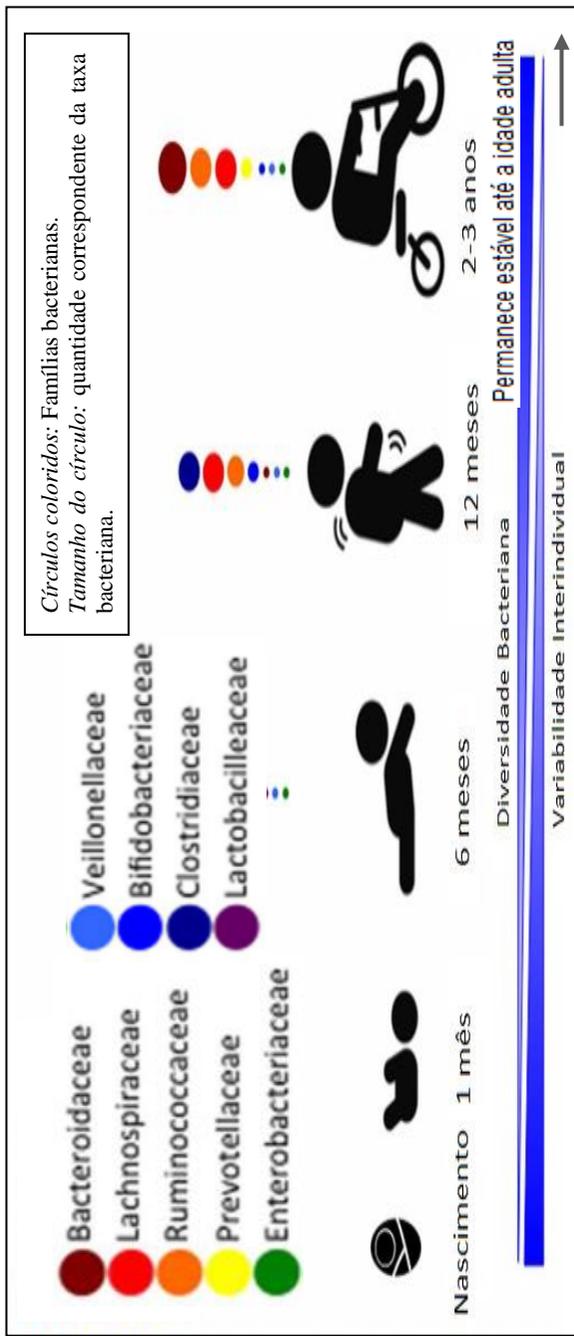
A taxonomia é o nome que se dá para a classificação, nomenclatura e identificação das bactérias. Classificação é o agrupamento de bactérias divididas em categorias com base nas semelhanças genéticas e fenotípicas. A nomenclatura é a designação de uma bactéria por regras internacionais de acordo com suas características. E a identificação é o processo de verificar se uma amostra desconhecida pertence à determinada espécie ou categoria taxonômica. As categorias taxonômicas são: reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie, sendo a espécie o grupo fundamental na classificação bacteriológica (JAWETZ et al., 2009; TRABULSI et al., 1998).

Os primeiros colonizadores do intestino são anaeróbios facultativos da família *Enterobacteriaceae* e dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*. A medida que o oxigênio é consumido, os anaeróbios estritos do gênero *Eubacteria* e *Clostridia*, proliferam (BRANDT et al., 2012).

O número e a complexidade dos microrganismos aumentam gradualmente a partir do estômago para o cólon e pode atingir níveis de até 10^{11} células por grama de conteúdo intestinal. Cerca de 100 trilhões (10^{14}) de microrganismos habitam o intestino humano, o que representa 10 vezes o número de células eucarióticas no corpo e contribui 1,5-2,0 kg de peso corporal total (TOJO et al., 2014).

As alterações na composição da microbiota intestinal ocorrem principalmente na infância. Durante os primeiros dias de vida, o intestino torna-se habitado por microrganismos e é caracterizado pela instabilidade. Na sequência a microbiota se estabiliza durante o aleitamento materno exclusivo e/ou com o uso de fórmula infantil. Em seguida novas alterações acontecem como desmame e a introdução de alimentos sólidos (TIIHONEN; OUWEHAND; RAUTONEN, 2010) (Figura 2).

Figura 2. Estágios da colonização da microbiota intestinal (MI).



Legenda: Ao **Nascimento**: MI é colonizada por *Enterobactérias*. Com **1 mês**: MI têm espécies de *Bifidobacterias* (bactérias anaeróbias estritas) prevalentes. Com **6 meses**: - com a introdução de alimentos sólidos a MI têm outras espécies: *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, e *Ruminococcaceae*. Com **12 meses**: a Família *Ruminococcaceae* tem um aumento. De **2-3 anos**: a *Bacteroidaceae*, *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* são prevalentes. Fonte: Adaptado de Arrieta et al. (2014).

A estabilização da microbiota intestinal diverge entre os autores, para Hopkins, Sharp, Macfarlane (2002) e Brandt et al. (2012) a microbiota intestinal se estabiliza por volta dos 2 anos de idade. Para Taddei et al. (2014) a microbiota intestinal atinge a sua maturação no final do primeiro ano de vida. E para de Tojo et al. (2014) a maturação ocorre por volta dos 3 anos de idade, onde a microbiota intestinal atinge uma composição semelhante à do adulto e permanece mais ou menos estável ao longo da vida adulta.

Desde o nascimento a microbiota intestinal normal contribui para a formação e maturação do sistema imunológico e fornece resistência a colonização de patógenos (GOULET, 2015; TADDEI et al., 2014). Desempenha ainda um importante papel nos processos metabólicos, nutricionais e fisiológicos, extraindo energia de polissacarídeos dietéticos não digeríveis como o amido resistente e fibras dietéticas e produzem ainda ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), além das vitaminas como, a vitamina K, vitamina B₁₂ e ácido fólico (GERRITSEN et al., 2011; TOJO et al., 2014).

A maioria das espécies microbianas dão origem a interações simbióticas entre hospedeiros e bactérias que são fundamentais para a saúde humana. A interrupção do estabelecimento de uma microbiota intestinal normal pode estar associada, ou contribuir para o surgimento de doenças. Alterações desfavoráveis na composição da microbiota intestinal, denominada disbiose, podem estar associadas a diversas condições clínicas como doença inflamatória intestinal, obesidade, doenças autoimunes e alergias (GOULET, 2015; RODRIGUEZ et al., 2015).

Atualmente se aceita que os pacientes com FC têm um padrão de bactérias intestinais que se diferem quando comparados a controles saudáveis (sem FC). Acredita-se que essa situação ocorra devido ao mau funcionamento ou baixa concentração da proteína CFTR, uso frequente de antibióticos, inibidores da bomba de prótons e suplementação de enzimas pancreáticas (BRUZZESE et al., 2014).

Os inibidores da bomba de próton também conhecidos como antiácidos podem alterar a microbiota intestinal aumentando a passagem de bactérias do estômago para o duodeno devido a redução do meio ácido. As dietas ricas em gordura e de alto teor calórico têm sido associadas com menor diversidade bacteriana em populações com FC, que também podem contribuir para a disbiose

bacteriana nessa população (DE LISLE; BOROWITZ, 2013; GARG; OOI, 2017).

O acúmulo de muco no intestino do paciente com FC, cria um ambiente para colonização bacteriana anormal, o que pode levar ao supercrescimento bacteriano intestinal, também chamado de disbiose, que associado à inflamação intestinal pode provocar diarreia, distensão abdominal, flatulência, esteatorréia e perda de peso. O supercrescimento bacteriano intestinal pode interferir diretamente na absorção de nutrientes ou indiretamente causando sintomas gástricos e anorexia (DE LISLE; BOROWITZ, 2013; SOLOMON; BOZIC; MASCARENHAS, 2016)

A disbiose intestinal e o supercrescimento bacteriano comprometem a função de barreira da mucosa do intestino, o que pode resultar no aumento da permeabilidade intestinal (LISLE; MUELLER; BOYD, 2012). A barreira intestinal preservada é fundamental para a manutenção do meio interno do lúmen intestinal, onde ocorre a absorção e secreção de nutrientes, e ainda restringe quase que completamente a passagem de moléculas que podem causar prejuízos ao organismo como antígenos, bactérias e vírus (JOHN; FROMM; AL, 2011).

A barreira intestinal tem influência sobre a imunidade sistêmica, em situações de inflamação intestinal como ocorre na FC, quando a barreira intestinal está prejudicada, pode haver um aumento da permeabilidade intestinal. Isto pode permitir a passagem de substâncias pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral- α (do inglês TNF- α), e lipopolissacarídeos (LPS) de componente bacteriano contribuindo para reações inflamatórias, principalmente a inflamação das vias aéreas que é a doença mais grave na FC (LISLE, 2015; PEUHKURI; VAPAATALO; KORPELA, 2010).

Além da barreira física que é composta pelo epitélio do revestimento e a produção de muco que ocorre pelas células epiteliais, há ainda outro mecanismo que contribui para a função da barreira da mucosa, é a enzima fosfatase alcalina intestinal que protege contra os LPS de componente de bactérias Gram negativas. Porém, no intestino de pacientes com FC esta enzima parece estar reduzida em cerca de 20-60% o que compromete a eliminação dos LPS (LISLE; MUELLER; BOYD, 2012).

O aumento da permeabilidade intestinal influenciado pelas citosinas pró-inflamatórias como Interleucina (IL)- β contribui para o edema local e leva a redução da função da barreira e disfunção das

proteínas de transporte. Além disso, o possível efeito da medicação em longo prazo também pode contribuir para o aumento da permeabilidade intestinal. Alterações na função da barreira intestinal podem ter implicações na absorção de nutrientes, bem como estar associado a falência múltipla de órgãos devido a distribuição sistêmica de endotoxinas luminal (PEUHKURI; VAPAATALO; KORPELA, 2010).

O microambiente intestinal na FC é único e parece estar relacionado com a mutação da proteína CFTR. A CFTR é um canal de cloro, localizado na membrana apical das células epiteliais, e está envolvido na regulação do transporte de íons (como o canal de cloro, sódio e transporte de bicarbonato). O bicarbonato é essencial para a solubilidade do muco e regula o pH luminal. A disfunção do CFTR causa secreções espessas com redução do bicarbonato do epitélio, o que acarreta uma hiperacidez no intestino delgado, o que pode resultar padrões alterados de colonização de microrganismos nos pacientes com FC (GARG; OOI, 2017; MADAN, 2016).

A mutação DF508 pertencente à segunda classe de mutações CFTR, apresenta redução na secreção de cloreto, que pode levar a uma maior espessura e viscosidade da camada de muco e gerar um habitat intestinal peculiar. Essa situação favorece a adesão de determinadas espécies bacterianas patogênicas, como *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Escherichia biforme* (*E. biforme*), cepas que são encontradas nas doenças inflamatórias intestinais (SCHIPPA et al., 2013).

Em um estudo recente com camundongos, foi possível verificar que, alterações na proteína CFTR, acarretavam em uma microbiota gastrintestinal diferente (mesmo na ausência de exposição aos antibióticos), aumento na carga bacteriana e na redução da diversidade de micro-organismos. Além disso, apresentaram diferenças estruturais como hiperplasia de células caliciformes e espessura externa da mucosa (LYNCH et al., 2013).

Uma comparação transversal (n= 45) e longitudinal (n= 4) da microbiota intestinal de crianças com FC e seus irmãos saudáveis (sem FC) identificou instabilidade e diminuição da diversidade de gêneros, como a de *Clostridium* e de *Bifidobacterium* em pacientes com FC (DUYTSCHAEVER et al., 2011).

Os *Firmicutes* e *Bacteroidetes* são os dois filamentos bacterianos dominantes no intestino, e compõe respectivamente 75% e 16% dos micróbios totais do trato gastrointestinal

(GOULET, 2015; MÄKIVUOKKO et al., 2012; ROBLES-ALONSO; GUARNER, 2013), seguido dos filamentos *Actinobactérias*, *Proteobactérias*, *Verrucomicrobia* e *Fusobactérias* presentes em quantidades reduzidas (GUINANE; COTTER, 2013).

Os quatro filamentos bacterianos dominantes: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobactérias* e *Proteobacteria* são os grupos mais estudados no microbioma, seu estudo é necessário para uma melhor compreensão da relação entre o microbioma e o hospedeiro (BAKHTIAR et al., 2013).

O filo *Firmicutes* é um dos filos dominantes na microbiota intestinal. É composto por espécies pertencentes aos gêneros *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* (DORÉ; CORTIER, 2010). A sobrevivência deste filo no trato intestinal está ligada ao fato dele ser capaz de usar os carboidratos provenientes da alimentação do hospedeiro (COCKBURN et al., 2015).

O *E. rectale* pertencente ao filo *Firmicutes*, classe *Clostridia*, e família *Eubacteriaceae*, é uma bactéria anaeróbia Gram-positiva com formato de bastonete. É um membro comum da microbiota intestinal humana produtor de butirato (JAWETZ et al., 2009; LOUIS; FLINT, 2009).

O butirato não é apenas a principal fonte de combustível dos colonócitos no trato intestinal, mas também uma potente molécula anti-inflamatória e antitumorigênica que atua na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias intestinais (BRUZZESE et al., 2014; COCKBURN et al., 2015).

Os níveis de colonização de *E. rectale* e a produção de butirato são afetados pela dieta do hospedeiro, ou seja, indivíduos que apresentam dietas deficientes de polissacarídeos como o amido e a fibra dietética apresentam quantidades reduzidas de bactérias intestinais produtoras de butirato (MAHOWALD et al., 2009).

Além disso, Mahowald et al. (2009) relatam que a abundância de organismos produtores de butirato está reduzida em indivíduos que sofrem de várias doenças intestinais e sistêmicas, sugerindo que há contribuição deste microrganismo na manutenção da microbiota intestinal e conseqüentemente na saúde do hospedeiro.

Estima-se que tanto a *E. rectale* quanto a *F. prausnitzii* representem cerca de 5-10% do total de bactérias detectáveis em amostras fecais de adultos saudáveis (LOUIS; FLINT, 2009). A

espécie *F. prausnitzii* é um importante representante do filo *Firmicutes*, da classe *Clostridium* e da família *Ruminococcaceae*. É uma bactéria Gram-positiva em formato de bastonetes (MIQUEL et al., 2013).

Entre as bactérias anaeróbias a *F. prausnitzii* está em quantidade elevada na microbiota intestinal humana, aproximadamente 5% da microbiota fecal total em adultos saudáveis, podendo chegar a 20% em alguns indivíduos (KHAN et al., 2012).

A colonização da *F. prausnitzii* ao longo do trato gastrointestinal resulta de uma combinação de fatores ambientais, como a presença de outras espécies bacterianas comensais, concentração de oxigênio, camada de muco no trato gastrointestinal e pH intestinal. Na infância a *F. prausnitzii* apresenta-se em quantidade reduzida, e se eleva após o estabelecimento dos primeiros colonizadores bacterianos (MIQUEL et al., 2015).

A *F. prausnitzii* é uma bactéria sensível ao oxigênio, difícil de cultivar mesmo em condições anaeróbias (MIQUEL et al., 2013). Os principais produtos finais da fermentação da glicose, frutose, fruto-oligossacarídeos e moléculas complexas como pectina e N-acetilglucosamina por cepas de *F. prausnitzii* são o formato, pequenas quantidades de D-lactato e quantidades significativas de butirato (RAJILIC-STOJANOVIC; VOS, 2014).

A dieta afeta significativamente a quantidade de butirato produzido. O consumo de alimentos ricos em amido e fibra aumenta tanto a concentração de butirato produzido quanto o número de *F. prausnitzii* (GAŁĘCKA et al., 2013).

O butirato desempenha efeitos benéficos para a saúde através da proteção contra invasão de patógenos, modulação do sistema imunológico e redução da progressão do câncer (MIQUEL et al., 2013). É a principal fonte de energia para as células epiteliais intestinais e ainda tem ação anti-inflamatória na mucosa do cólon, ou seja, a *F. prausnitzii* gera impacto nas funções fisiológicas para manter a saúde o hospedeiro (CAO; SHEN; RAN, 2014).

A abundância de *F. prausnitzii* na microbiota é um bom indicador da saúde intestinal. Sua proporção se correlaciona negativamente com a presença de inflamação intestinal aguda ou moderada (MIQUEL et al., 2013). Quantidades reduzidas de *F. prausnitzii* têm sido correlacionadas com vários distúrbios patológicos, como a doença de Crohn, colite ulcerativa (QUÉVRAIN et al., 2017).

O Estudo de Desenvolvimento Longitudinal Infantil Canadense (CHILD), é um estudo multicêntrico que avaliou uma coorte de indivíduos da gestação até 5 anos de idade. A amostra foi de 319 indivíduos e o objetivo foi avaliar se a disbiose intestinal nos primeiros 100 dias de vida caracterizada por reduções em quatro gêneros bacterianos (*Lachnospira*, *Veillonella*, *Faecalibacterium* e *Rothia*) estavam associados com o desenvolvimento da asma. Os achados mostraram que de fato a redução na quantidade dos quatro gêneros bacterianos avaliados nos primeiros 100 dias de vida estava associada com a presença da asma e doença alérgica. O estudo sugere ainda o efeito protetor destes gêneros bacterianos e o uso deles como terapias para prevenir a asma e outras doenças alérgicas (ARRIETA et al., 2015).

O quadro 1 resume os principais estudos que avaliaram a microbiota intestinal (fezes) de indivíduos com e sem FC e a mutação genética (BRUZZESE et al., 2014; BURKE et al., 2017; DUYSCHAEVER et al., 2011, 2013; FREITAS et al., 2018; HOFFMAN et al., 2014; MIRAGOLI et al., 2017; SCHIPPA et al., 2013).

Quadro 1 – Estudos sobre a composição da microbiota intestinal (fezes) em pacientes com fibrose cística (continua).

Autores/Ano /País	Amostra	Idade	Metodologia Tipo do estudo	Principais achados
de Freitas, et al., 2018 Brasil	n = 36 Controles (s/FC): 17 FC: 19 DF508ho: 06 DF508he: 07	Controle: 3 anos (IQR: 0,60;7 anos) FC: 4 anos (IQR: 1,10; 9,50 anos)	FISH Transversal	- <i>Bacteriodes</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>E. rectale</i> e <i>F. prausnitzii</i> estavam reduzidos no grupo FC comparado aos controles. - <i>C. difficile</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> apresentaram-se elevados no grupo FC comparados ao grupo controle.
Miragoli et al., 2017 Itália	n = 38 Controles (s/FC): 08 FC: 30 DF508ho: 14 DF508he: 14	14,54 anos Min: 10anos Máx: 22 anos	PCR-DGGE Transversal	-Maior diversidade bacteriana intestinal – FC comparado aos controles e ainda: - <i>R. gnavus</i> , <i>B. luti</i> , <i>E. rectale</i> e <i>Bl. Glucerasea</i> - quantidade < na FC comparado aos controles. - <i>D. invisus</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. spp</i> , <i>C. aerofaciens</i> , <i>F. prausnitzii</i> , <i>E. rectale</i> , <i>Blautiaspp</i> e a família <i>Ruminococcaceae</i> - apresentaram < valores em quantidade significativa nos pacientes com FC comparado aos controles.

Burke et al., 2017 Irlanda	n = 112 Controles (s/FC): 69 FC: 43 Mutação severa (Classe I, II e III): 34 Mutação leve (Classe IV, V e VI): 09	Controle: 32 ± 8,1 anos FC: 29 ± 8,3 anos	Seq. rDNA 16S Transversal	-A diversidade microbiota intestinal dos pacientes com FC foi significativamente < comparado com controles e ainda: <i>-Bacteroidetes, Proteobacteria, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Tenericutes e Lentisphaerae</i> - quantidade significativamente < com FC comparado com controle. - O filo <i>Firmicutes</i> e <i>Actinobactérias</i> - estavam significativamente > na FC comparado com indivíduos sem FC. -E. coli - estava em quantidade > nos pacientes com FC comparado com controles.
Hoffman et al., 2014 México	n = 24 Controles (s/FC): 12 FC: 12 DF508ho: 11 DF508he: 00	Controle: 55 dias a 3,6 anos FC: 15 dias a 3,5 anos	PCR-DGGE Longitudinal	

s/= Sem. IRQ= Intervalo interquartil (25°-75° percentil). Min.= mínimo. Max.= máximo. DF508ho= DF508 homozigoto; DF508he= DF508 heterozigoto. PCR-DGGE = *Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis*. Seq.rDNA 16S = Sequenciamento ribossomal *Deoxyribonucleic acid* 16S. *E. rectale*: *Eubacterium rectale*; *F. prausnitzii*: *Faecalibacterium prausnitzii*; *C. difficile*: *Clostridium difficile*; *E. coli*: *Escherichia coli*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *R. gnavus*: *Ruminococcus gnavus*; *B. luti*: *Blautia luti*; *Bl. glucerasea*: *Blautia glucerasea*; *D. invisus*: *Dialister invisus*; *B. adolescentis*: *Bifidobacterium adolescentis*; *B. spp*: *Bifidobacterium spp*; *B.C. aerofaciens*: *Collinsella aerofaciens*.

Quadro 1 – Estudos sobre a composição da microbiota intestinal (fezes) em pacientes com fibrose cística (continuação).

Autores/Ano/País	Amostra	Idade	Metodologia Tipo de estudo	Principais achados
Hoffman et al., 2014 México	n = 24 Controles (s/FC): 12 FC: 12 DF508ho: 11 DF508he: 00	Controle: 55 dias a 3,6 anos FC = 15 dias a 3,5 anos	PCR-DGGE Longitudinal	- <i>E. coli</i> - estava em quantidade > nos pacientes com FC comparado com controles.
Bruzzese et al., 2014 Itália	n = 42 Controles (s/FC): 22 FC: 22 DF508ho: 12 DF508he: 10	07 anos Min:02 anos Máx:09 anos	PCR-DGGEFISH Ensaio Clínico	- <i>E. rectale</i> e <i>B. spp</i> - estavam em quantidade < nos pacientes com FC comparados com controles. - <i>B. catenulatum</i> , <i>B. adolescentis</i> e <i>F. prausnitzii</i> - estavam significativamente em quantidade > nos pacientes controles comparados com FC. - <i>E. coli</i> - estava em uma quantidade > nos pacientes com FC comparados com controles, mas sem diferença estatística.

Duytschaever et al., 2013 Bélgica	n = 19 Controles (s/FC): 10 FC: 09 DF508ho: 05 DF508he: 04	8,6 anos Min:0,8 anos Máx:15,7 anos	PCR-DGGE Longitudinal	-Os pacientes com FC apresentaram quantidades < de <i>Bifidobactérias</i> comparado com controle s/FC.
---	--	---	--------------------------	--

s/= Sem. Min.= mínimo. Max.= máximo. DF508ho= DF508 homozigoto. DF508he = DF508 heterozigoto. PCR-DGGE = *Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis*. FISH = *Fluorescent in Situ Hybridization*. *E. coli*: *Escherichia coli*; *E. rectale*: *Eubacterium rectale*; *B. spp*: *Bifidobacterium spp*; *B. catenulatum*: *Bifidumbacterium catenulatum*; *B. adolescentes*: *Bifidobacterium adolescentis*; *F. prausnitzii*: *Faecalibacterium prausnitzii*.

Quadro 1 – Estudos sobre a composição da microbiota intestinal (fezes) em pacientes com fibrose cística.

Autores/ Ano/País	Amostra	Idade	Metodologia Tipo de estudo	Principais achados
Schipa et al., 2013 Itália	n = 36 FC: 36 DF508ho: 05 DF508he: 19	18,6 anos Min:0,2 anos Máx:50 anos	PCR-DGGE Transversal	- <i>E. coli</i> e <i>E. bifforme</i> estavam quantidades elevadas para a mutação DF508 homozigoto. -O gênero das <i>Bifidobacterium</i> e as espécies <i>E. limosum</i> <i>F. prausnitzii</i> estavam em quantidade elevadas nos pacientes que não possuíam a mutação DF508.
Duytschaev er et al., 2011 Bélgica	n = 45 Controles (s/FC): 24 FC: 21	09 meses a 15 anos	PCR-DGGE Parte 1 - Transversal	- <i>B.spp.</i> , <i>P. spp.</i> , <i>B. spp.</i> , <i>V. spp.</i> , estavam reduzidos na FC comparados com os controles. - <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Clostridia</i> , estavam elevados nos pacientes com FC comparado com os controles
	n = 04 Controles (s/FC): 02 FC: 02	02 a 13 anos	PCR-DGGE Parte 2 - Longitudinal	-A média da contagem bacteriana (maior diversidade) foi < na FC (sem diferença estatística) comparado com os controles.

s/= Sem. Min.= mínimo. Max= máximo. DF508ho= DF508 homozigoto. DF508he= DF508 heterozigoto.

PCR-DGGE= *Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis*.

E. coli: *Escherichia coli*; *E. bifforme*: *Escherichia bifforme*; *E. limosum*: *Eubacterium limosum*; *F. prausnitzii*: *Faecalibacterium prausnitzii*; *B. spp*: *Bacteroides spp*; *P. spp*: *Prevotella spp*; *B. spp*: *Bifidobacterium spp*; *V. spp*: *Veillonella spp*.

2.5 FIBROSE CÍSTICA: RELAÇÃO ENTRE MICROBIOTA INTESTINAL E A CALPROTECTINA FECAL

O processo inflamatório nos pacientes com FC, não se limita somente ao trato respiratório, está presente também no trato gastrointestinal (PARISI et al., 2017). A fisiopatologia deste processo é complexa e ainda não está bem compreendida. Algumas das causas incluem a secreção aumentada do muco intestinal e as funções prejudicadas resultantes da proteína CFTR. Está envolvido nesse processo ainda alterações da microbiota intestinal, supercrescimento bacteriano do intestino delgado, uso crônico de antibiótico, infecções recorrentes do trato respiratório, baixo pH do conteúdo intestinal e a presença de distúrbios que altera a motilidade intestinal (WIEŹCEK et al., 2017).

Em todo o intestino, a FC afeta a digestão, a absorção de nutrientes e o crescimento do paciente. O pH alterado e as secreções espessas e viscosas obstruem o lúmen do intestino, o que pode resultar em um microambiente alterado. Este fato pode contribuir para o aparecimento de uma inflamação e, conseqüente degradação do pâncreas, do fígado, da vesícula biliar e do intestino. O microambiente intestinal predispõe os pacientes com FC a disbiose intestinal e respiratória desde o nascimento. E esta situação pode afetar a função imunológica ao longo do tempo, levando a progressão da doença respiratória e intestinal, ou seja, a FC é uma doença sistêmica com interação entre os sistemas respiratório, imunológico e intestinal (MADAN, 2016).

O intestino como um todo é um importante órgão imunológico, que abriga aproximadamente 60% das IgA totais ($>10^6$ linfócitos/g de tecido), é o maior conjunto de células imuno competentes do corpo dentro da mucosa intestinal (GOULET, 2015).

O mecanismo de inflamação intestinal ainda não está bem definido, mas alguns fatores são propostos como o defeito na proteína CFTR, muco viscoso, supercrescimento bacteriano e exposição crônica a antibióticos. A inflamação intestinal é um fator modificável e sua identificação precoce ajuda evitar a má absorção de nutriente e conseqüente falha de crescimento. Vários biomarcadores como IL-8, albumina, lactoferrina, IL-1 β , são utilizados para identificar a inflamação intestinal, porém a CLP foi

o biomarcador validado para identificar doença inflamatória intestinal (LEE et al., 2012).

A CLP é uma proteína citosólica dos neutrófilos (ALIBRAHIM; ALJASSER; SALH, 2015), ligada ao cálcio e zinco que constitui 60% das proteínas no citoplasma dos neutrófilos (BRESSLER et al., 2015). Tem ação reguladora nos processos inflamatórios e é resistente as bactérias intestinais (WIĘCEK et al., 2017).

Com propriedades antimicrobianas, é liberada no intestino delgado em situações de inflamação como, por exemplo, doença inflamatória intestinal. As elevações da CLP fecal aparecem mais acentuadas nos pacientes com insuficiência pancreática, enquanto que os pacientes com a função pancreática preservada podem ter níveis normais de CLP (GARG; OOI, 2017; QUAIL et al., 2009; WIĘCEK et al., 2017).

A CLP pode ser medida no plasma e em outros fluidos corporais, mas é seis vezes mais concentrado nas fezes do que no sangue. Assim CLP fecal é um marcador inflamatório que pode estar em concentração elevada em uma variedade de doenças inflamatórias intestinais como doença de Crohn (PARISI et al., 2017).

Resistentes a degradação enzimática e estável a temperatura ambiente por até sete dias, tem sido cada vez mais utilizado no diagnóstico de doença inflamatória intestinal (ALIBRAHIM; ALJASSER; SALH, 2015; OLAFSDOTTIR et al., 2002). Em comparação com os marcadores séricos convencionais, a CLP fecal pode ser um marcador promissor para avaliar a atividade inflamatória intestinal quando comparado com a endoscopia que é hoje o padrão de referência (LIN et al., 2014).

Quail et al. (2009) avaliou 48 crianças escocesas com o diagnóstico de doença inflamatória intestinal e encontrou que a CLP fecal estava alterada na maioria das crianças, quando comparadas com outros marcadores de inflamação tais como proteína C-reativa, taxa de sedimentação de eritrócitos e albumina, mesmo quando usado em combinação. O estudo de Quail et al., (2009) concluiu, que a CLP fecal como marcador da inflamação da mucosa, é um método não invasivo que pode ser detectado em níveis de atividade da doença de base insuficiente para causar aumentos nos marcadores sistêmicos.

Apesar da alta sensibilidade, a CLP fecal não é um teste específico da doença inflamatória intestinal, pois os níveis podem

estar elevados em crianças com outras condições como infecção do trato gastrointestinal, com doença celíaca, o uso de anti-inflamatórios não esteróide (QUAIL et al., 2009), intolerâncias e alergias alimentares (WIEŹCEK et al., 2017), câncer colorretal, câncer gástrico, úlcera péptica, doença do refluxo gastresofágico, diverticulite e cirrose (BRESSLER et al., 2015).

O grau de elevação varia de acordo com a causa, o que pode interferir no valor diagnóstico do teste. Portanto, ainda se faz necessário ampliar as pesquisas para que se tenha um amplo conhecimento dessas condições, pois isto é essencial para a validade clínica para usar a CLP fecal como um biomarcador inflamatório (ALIBRAHIM; ALJASSER; SALH, 2015).

A quantidade de CLP nas fezes é proporcional à quantidade de migração de neutrófilos da parede intestinal inflamada para a mucosa (LIN et al., 2014). A inflamação intestinal pode influenciar ainda mais a microbiota intestinal em pacientes com FC. E a cronicidade da inflamação em pacientes com FC que sobrevivem até a idade adulta pode estar relacionada a complicações como, por exemplo, a malignidade gastrointestinal (GARG; OOI, 2017).

Assim, os biomarcadores fecais de inflamação, especialmente a CLP tem papel promissor na identificação de processo inflamatório na FC (LEE et al., 2012), considerando que a detecção precoce pode prevenir a inflamação intestinal.

2.6 MICROBIOTA INTESTINAL, INDICADORES NUTRICIONAIS, FIBROSE CÍSTICA E A MUTAÇÃO GENÉTICA DF508

Caracterizada por doença pulmonar progressiva, cerca de 90% dos pacientes com FC apresentam insuficiência pancreática e consequentemente má absorção dos nutrientes principalmente as vitaminas lipossolúveis. Essa má absorção associada com doença hepática, DM relacionada a FC e infecções crônicas, além de levar ao aumento das necessidades energéticas deixam os pacientes com FC em risco de desnutrição (LI; SOMERSET, 2014a; SOLOMON; BOZIC; MASCARENHAS, 2016).

Apesar dos avanços na terapia nutricional, a absorção de nutrientes e o adequado crescimento das crianças com FC podem estar prejudicados mesmo com dietas hipercalóricas e adequada

terapia de reposição enzimática pancreática. A falha no crescimento é comum na FC principalmente quando associada a insuficiência pancreática e aumento do gasto energético (DHALIWAL et al., 2015).

O ciclo de inflamação crônica, colonização bacteriana e infecção recorrente provocam um estado hipermetabólico sistêmico com a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6, que também aumentam o gasto energético (SOLOMON; BOZIC; MASCARENHAS, 2016).

As diversas mutações do gene CFTR no intestino resultam em uma produção de muco anormal que afetará a digestão, a absorção, a motilidade, a microbiota e a inflamação intestinal. Tais complicações vão gerar um impacto negativo no estado nutricional que pode estar associado à deterioração pulmonar e uma menor sobrevida (MUNCK, 2014).

Essas condições em conjunto com fatores como o genótipo, afetam o estado nutricional, que é um importante preditor de sobrevida, pois está associada à função respiratória, morbidade e mortalidade. O estado nutricional inadequado tem sido associado a resultados adversos na FC, como maior declínio da função pulmonar, comprometimento da função muscular pulmonar e diminuição da tolerância ao exercício. O índice de massa corporal (IMC) é comumente utilizado para avaliar o estado nutricional de crianças e adultos com FC (CALELLA et al., 2018; MACKENZIE et al., 2017)

A mutação DF508 considerada um genótipo grave da FC está associado a um pior prognóstico da doença, pacientes homocigotos para a mutação DF508 tendem a apresentar sintomas mais graves em relação a pacientes heterocigotos para a mutação DF508 (PANAGOPOULOU et al., 2014).

Panagopoulou et al., (2014), em um estudo transversal que teve como objetivo estimar a prevalência de desnutrição e obesidade entre os pacientes com FC, de um total de 68 pacientes, encontrou 15 pacientes que apresentavam desnutrição (sendo que 04 apresentavam mutação DF508 homocigoto e 08 apresentavam mutação DF508 heterocigoto), 44 apresentavam estado nutricional adequado (destes 10 apresentavam mutação DF508 homocigoto e 23 apresentavam mutação DF508 heterocigoto) e 09 apresentavam sobrepeso e/ou obesidade (onde nenhum paciente apresentou mutação DF508 homocigoto e apenas 02 pacientes apresentavam mutação DF508 heterocigoto). Nesse estudo foi possível verificar

ainda, que os pacientes com sobrepeso/obesidade não apresentaram DM relacionada a FC ou doença hepática relacionada a FC e também não foram colonizados por *P. aeruginosa* e tiveram função respiratória significativamente melhor.

Condições relacionadas à fibrose cística, como infecções e inflamações pulmonares recorrentes e crônicas, insuficiência pancreática, DM relacionada a FC e disbiose, podem contribuir para a desnutrição, falha no crescimento, aumento do gasto energético e/ou a má absorção de nutrientes e energia no trato gastrointestinal. A manipulação da microbiota intestinal pode, portanto, apresentar benefícios no manejo nutricional da FC (LI; SOMERSET, 2014a; MADAN, 2016).

O supercrescimento bacteriano pode competir pelos mesmos nutrientes interferindo na digestão e na absorção. Bactérias como *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) produzem hidrolases que podem desativar ácidos biliares e então prejudicar a digestão e a absorção de gorduras, assim como, o acúmulo de muco viscoso na mucosa intestinal (LI; SOMERSET, 2014b)

A desnutrição crônica e o baixo crescimento são causas bem definidas de mortalidade e morbidade entre os pacientes com FC. Pacientes com FC, que apresentam maior Índice de Massa Corporal-para-Idade (IMC/I), parecem ter melhor função pulmonar. A recomendação é que o IMC/I seja maior que o percentil 50° em crianças e IMC ≥ 22 kg/m² em mulheres e 23 kg/m² em homens (SOLOMON; BOZIC; MASCARENHAS, 2016).

King et al., (2010) avaliou 86 pacientes com FC, com idade média de 30 anos, e destes, 76 tinham insuficiência pancreática, 41 apresentavam mutação para DF508 homocigoto, 34 apresentavam mutação DF508 heterocigoto e 11 não tinham a mutação DF508 em nenhum dos alelos. Neste estudo, os autores encontraram que homens e mulheres com FC apresentaram um IMC médio significativamente menor do que a população de referência e a reserva de gordura corporal foram menores para homens e mulheres com FC. E mostrou ainda que a depleção de massa magra estava associada a uma função pulmonar grave independentemente do IMC.

Em um estudo transversal publicado por Sheikh et al. (2014), foram avaliados 211 pacientes com idade entre 5 e 21 anos, com FC e insuficiência pancreática. Neste estudo foi possível observar que a massa magra estava mais associada à função pulmonar do que o IMC/I. E que os indivíduos com FC

apresentaram menor massa magra do que indivíduos saudáveis com IMC/I em z-score similares.

A massa magra reduzida pode comprometer o músculo respiratório do diafragma e levar ao comprometimento da função pulmonar. A inflamação sistêmica e a má absorção na FC promovem a perda de proteína e consequente redução de massa magra o que traria prejuízos para função pulmonar (SHEIKH et al., 2014).

O estado nutricional inadequado está associado com a deterioração pulmonar, e é um preditor independente de mortalidade à media que a doença progride. Assim, a manutenção de um estado nutricional adequado tem contribuído para a manutenção da qualidade de vida e sobrevida destes indivíduos (DE LISLE; BOROWITZ, 2013).

3 JUSTIFICATIVA

Essas alterações no trato gastrointestinal como insuficiência pancreática, má digestão e absorção de alimentos e esteatorreia são característicos de pacientes com FC e estão relacionadas principalmente com a disfunção da proteína CFTR, além da inflamação crônica e ingestão de antibióticos, comum nessa população. Estes podem levar ao desequilíbrio na microbiota intestinal e gerar impacto negativo sobre a digestão, a absorção e a motilidade intestinal, o que favorece a inflamação e consequente prejuízo no estado nutricional na FC (DEL CAMPO et al., 2014; MUNCK, 2014).

A proteína CFTR apresenta aproximadamente 2.000 mutações, destas, a mutação DF508 representa cerca 70% de todos casos de FC no mundo todo. Essa mutação interrompe a função dos canais de cloro e leva a produção de secreções mucosas espessas em várias glândulas e órgãos o que provoca insuficiência pancreática, síndrome da má absorção e desnutrição. Ainda, o muco espesso presente no intestino delgado diminui a absorção de nutrientes e ácidos biliares. Essas anomalias, além de interferir na composição da microbiota intestinal, contribuem para o aparecimento da inflamação intestinal afetando a qualidade de vida do paciente com FC (DEBYSER et al., 2015; PANAGOPOULOU et al., 2014).

O muco espesso presente no intestino interfere na colonização normal da microbiota intestinal, essa alteração da colonização é chamada de disbiose e é caracterizada pela redução de grupos de bactérias benéficas como *F. prausnitzii*, em contrapartida pode ocorrer um aumento de grupo de bactérias potencialmente patogênicas como *C. difficile*. Esta colonização anormal contribui para atraso no crescimento e/ou desnutrição e o aumento da morbidade em longo prazo por inflamação e infecção em crianças e adultos com FC (ARVONEN et al., 2016; DUYTSCHAEVER et al., 2013; MADAN, 2016).

O processo inflamatório do trato gastrointestinal nos pacientes com FC, ainda não está bem estabelecido, porém sabe-se que a disbiose, alterações da proteína CFTR e muco espesso estão envolvidos nesse processo. Na tentativa de identificar precocemente essa inflamação, vários biomarcadores como a CLP fecal tem apresentando papel relevante na identificação do processo

inflamatório intestinal na FC (LEE et al., 2012; WIĘCEK et al., 2017)

De acordo com alguns autores, a microbiota intestinal de pacientes com FC difere da microbiota de pacientes sem FC (BRUZZESE et al., 2014; DEL CAMPO et al., 2014; DUYTSCHAEVER et al., 2011; HOEN et al., 2015). A redução de *E. rectale* em pacientes com FC está relacionado com alterações na digestão e absorção de nutrientes, principalmente os carboidratos como os polissacarídeos (COCKBURN et al., 2015; MAHOWALD et al., 2009). A bactéria *F. prausnitzii* é considerada um marcador da integridade intestinal, e está reduzida em situações em que a inflamação está presente no intestino (MIQUEL et al., 2013; SOKOL et al., 2008). A colonização intestinal pela *P. aeruginosa* aumentada, ocorre em pacientes com a imunidade comprometida como é o caso de pacientes com FC. E a sua translocação pode estar associada a infecções sistêmicas com consequências na morbidade e mortalidade desses pacientes (VALENZA et al., 2015).

Entretanto, a literatura é escassa em estudos que avaliam a presença na microbiota intestinal de microrganismos como *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* simultaneamente, em pacientes com FC que apresentam mutação DF508 homocigoto e/ou DF508 heterocigoto e a relação destes microrganismos com a resposta inflamatória avaliada pelo marcador, CLP fecal. Desta forma, a realização desta pesquisa que tem como hipótese que a microbiota intestinal e o marcador inflamatório intestinal de pacientes com FC, principalmente naqueles que apresentam a mutação DF508, difere de pacientes sem FC. Assim poderá possibilitar o entendimento precoce da composição da microbiota intestinal e da inflamação intestinal, os quais poderão contribuir com a redução da morbidade e mortalidade em pacientes com FC.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação da mutação DF508 os microrganismos *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* e a resposta inflamatória intestinal medida pela calprotectina fecal (CLP) em crianças e adolescentes com FC.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os indicadores nutricionais: Índice de massa corporal/Idade (IMC/I), Peso/Idade (P/I) e Estatura/Idade (E/I);
- Avaliar as concentrações dos microrganismos *E. rectale* e *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* pela Hibridização *in situ* por fluorescência (*Fluorescent in situ Hybridization- FISH*);
- Avaliar a Calprotectina (CLP) fecal;
- Associar a CLP fecal com os microrganismos *E. rectale* e *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa*
- Associar os microrganismos *E. rectale* e *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* com a mutação genética DF508;
- Associar a CLP fecal com a presença da mutação genética DF508.

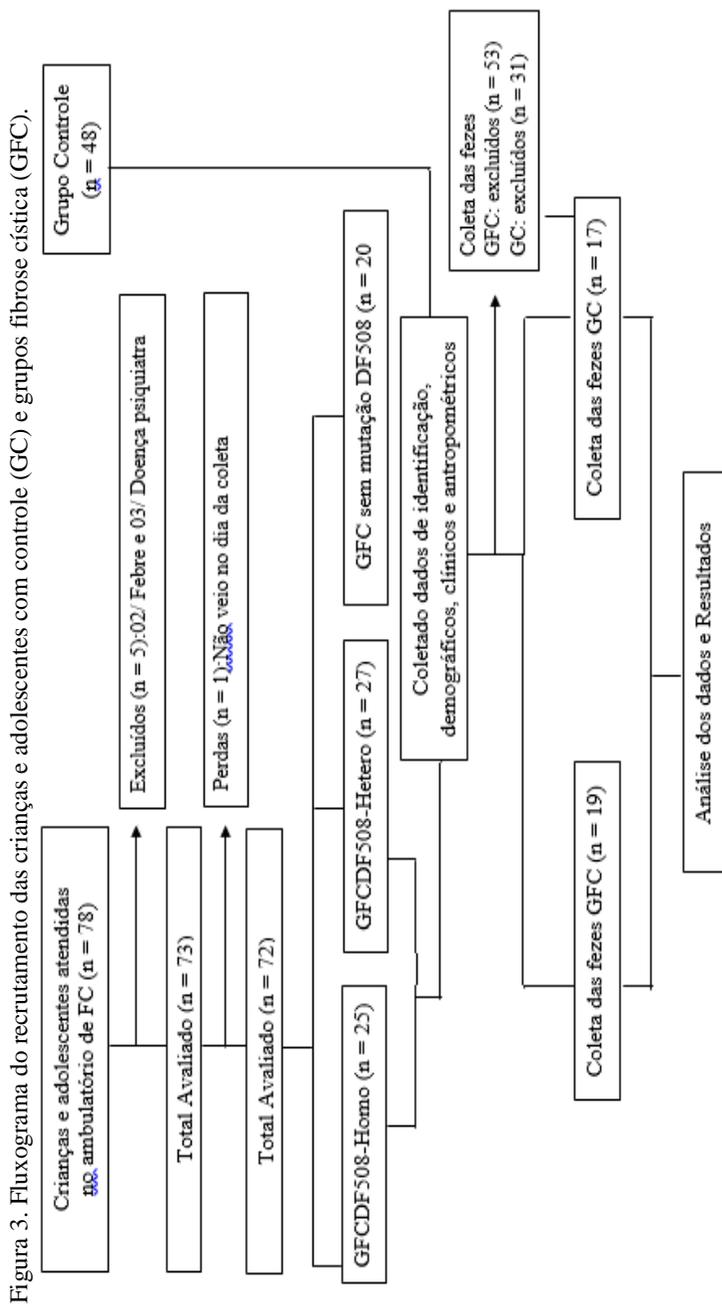
5 SUJEITOS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo clínico transversal com pacientes com FC, realizado entre março/2016 a dezembro de 2016, no Hospital Infantil Joana de Gusmão do estado de Santa Catarina (HIJG/SC) em Florianópolis e inscritos na Associação Catarinense de Assistência ao Mucoviscidótico (ACAM). Aprovado pelo Comitê de Ética de Seres Humanos do HIJG/SC (#029/2012) (ANEXO A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC (CAAE: #48959715.2.1001.0121) (ANEXO B), e foi inscrito no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos Brasileiros (#RBR-5BYRSC e UTN: U1111-1164-3982). Os responsáveis e os participantes foram esclarecidos sobre a pesquisa e as avaliações que seriam realizadas. Para aqueles que aceitaram a participar da pesquisa, após as orientações, assinaram o Termo de Consentimentos Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) com a Declaração de Consentimento e a Declaração de Assentimento de Participação do Sujeito, e o Termo de Assentimento de Participação do Sujeito (APÊNDICE B). Este estudo teve financiamento dado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, processo nº 471197/2013 (ANEXO C).

5.2 SUJEITOS

Os sujeitos foram selecionados de uma amostra de conveniência não probabilística de 120 crianças e adolescentes e 36 delas participaram do nosso estudo transversal anterior (de FREITAS et al., 2018). O Grupo Controle (GC) foi composto por 48 sujeitos com mediana de idade de 4,0 anos e intervalo interquartil 25° - 75° (IQR): 2,0 - 8,0 e o grupo Fibrose Cística (GFC), foi composto por 72 sujeitos com mediana de idade de 3,5 anos e IQR: 1,0 - 8,0 (Figura 3).



5.2.1 Grupo Controle

O GC foi selecionado entre crianças de adolescentes que eram atendidos no ambulatório de puericultura do HJIG ou pelos irmãos dos pacientes do GFC com idade entre 0 a ≤ 15 anos de ambos os sexos. Os critérios de inclusão foram: crianças/adolescentes sem o diagnóstico de FC, pareadas pelo sexo e pela idade com o grupo fibrose cística (GFC) e dentro da faixa de normalidade para IMC/I conforme curvas da WHO (2006, 2007). Os critérios de exclusão foram: sujeitos com idade ≥ 15 anos, presença de febre, trauma e doenças: celíaca, respiratória, inflamatória, intestinal, reumática, psiquiátrica, degenerativas, cardiovasculares, DM, renal, imunodeficiência primária ou secundária e intolerâncias (glicose, lactose). E em uso de medicamentos como antibióticos, hormônios, fármacos anti-inflamatórios não hormonais, inibidores da bomba de próton, corticóides oral, inalatório e intravenoso, cloridrato de ranitidina imunossupressores e anti-histamínicos, até 30 dias antes da coleta de dados (Figura 3).

5.2.2 Grupo FC

O GFC foi de crianças/adolescentes de 0 a ≤ 15 anos que frequentam o ambulatório de FC do HJIG e que pertencem a Associação Catarinense de Atenção ao Mucoviscidótico (ACAM). Os critérios de exclusão foram: que no momento da coleta estivessem internados, em exacerbação pulmonar ou portadores de outras síndromes genéticas que não a FC, ou ainda que apresentassem febre, trauma e outras doenças: celíaca, respiratória, inflamatória, intestinal, reumática, psiquiátrica, degenerativas, cardiovasculares, DM, renal, imunodeficiência primária ou secundária. De um total de 78 sujeitos contatados durante o período de seleção, houve uma exclusão de 5 sujeitos: dois com febre e três com doença psiquiátrica. Houve apenas 1 paciente que não compareceu a consulta e por isso não concluiu o protocolo da pesquisa, totalizando 72 sujeitos no grupo FC (Figura 3). OGFC foi redistribuído conforme a presença da mutação DF508 em ambos os alelos - mutação DF508 homozigoto (GFCDF508-Homo, $n = 25$) ou penas em um dos alelos - mutação DF508 heterozigoto (GFCDF508-Hetero, $n = 27$), e foram excluídos 20 pacientes com

outras mutações (Figura 3). Na análise da microbiota intestinal e CLP fecal foi avaliado um total de 36 sujeitos, sendo no GFC 19 pacientes e 17 controles (Figura 3).

5.3 PROTOCOLO DE PESQUISA

Dos prontuários foram coletados: idade, sexo, data de nascimento e do diagnóstico de FC, colonização, tratamento com antibiótico, insuficiência pancreática, mutação genética da FC, função pulmonar (espirometria), Schwachman-Kulczycki escore (S-K escore) e bacteriologia pulmonar; e o tipo de parto e aleitamento materno somente dos sujeitos que participaram da avaliação da microbiota intestinal. O peso e altura foram coletados pelo pesquisador/nutricionista treinado.

5.4 AVALIAÇÃO DOS INDICADORES NUTRICIONAIS

As medidas antropométricas foram coletadas de acordo com a WHO (1995) por nutricionista. O peso foi coletado com o sujeito em jejum, com a bexiga vazia, sem sapatos e com roupas leves e mensurado em kg (WHO, 1995). Nos sujeitos ≤ 2 anos de idade, o peso foi aferido com a balança digital pediátrica, marca Filizola[®] com capacidade máxima 15 kg, aproximação de 0,01 kg (São Paulo, SP, Brasil). E naqueles com idade >2 foi utilizado a balança digital Filizola[®], com capacidade máxima de 150 kg e aproximação de 0,1 kg (São Paulo, SP, Brasil). A estatura (comprimento) dos sujeitos ≤ 2 anos de idade foi obtida com ele em posição de decúbito dorsal, cabeça fixada por um auxiliar, os joelhos estendidos e os pés formando um ângulo de 90°. Foi utilizado o estadiômetro infantil graduado de 0 a 100 cm (sensibilidade: 1 mm), com placa móvel (Indaiá[®], Indaiatuba, São Paulo, Brasil) (WHO, 1995). Nos sujeitos >2 anos de idade, a estatura foi aferida por meio de um antropômetro com escala de 40, com precisão de 0,1 cm (Tonelli[®], Criciúma, SC, Brasil). O sujeito foi posicionado sobre a base do antropômetro, descalço ereto, com o peso do corpo distribuído igualmente sobre ambos os pés, colocando as superfícies posteriores dos calcanhares, as nádegas e a região occipital em contato com a escala de medida e com a cabeça posicionada de modo que a linha de visão fique perpendicular ao corpo, ou seja, paralela ao solo (Plano de Frankfurt). O sujeito foi orientado a

inspirar profundamente e, em apneia respiratória, foi mensurada a estatura em metro e com uma aproximação de 0,1 cm. A referência para a mensuração foi o ponto mais alto da cabeça com pressão suficiente para comprimir o cabelo (WHO, 1995). A classificação do estado nutricional foi pelos: IMC para a idade (IMC/I), peso para a idade (P/I) e estatura para a idade (E/I) de acordo com as curvas de crescimento e pontos de corte da WHO (WHO, 2006, 2007) (ANEXO E, ANEXO F, ANEXO G, ANEXO H e ANEXO I).

5.5 SHWACHMAN-KULCZYCKI ESCORE (S-K ESCORE)

O S-K escore foi utilizado para classificar a gravidade da doença. O escore pontua as atividades gerais, exame clínico, estado nutricional e achados radiológicos. Cada item apresenta o mesmo peso (25 pontos) e o total de 100 pontos representa o escore perfeito: adequado: ≤ 86 S-K escore, bom: 71-85S-K escore, médio: 56-70S-K escore, moderado: 41-55S-K escore, e grave: ≤ 40 S-K escore (SHWACHMAN; KULCZYCKI, 1958) (ANEXO D).

5.6 VOLUME EXPIRATÓRIO FORÇADO NO PRIMEIRO SEGUNDO

A função pulmonar avaliada pelo Volume expiratório forçada no primeiro segundo (do inglês - *Forced expiratory volume in the First Second* - FEV₁) foi pelo exame de espirometria. Este foi realizado pela equipe de enfermagem do HIJG nos indivíduos com FC. O equipamento utilizado foi o espirômetro (Puritan-Bennett Corporation®), modelo *Renaissance Spirometry System* (Wilmington, Carolina do Norte, Estados Unidos da América). Tanto a metodologia como a classificação do exame de espirometria foi realizado de acordo com Pellegrino et al., (2005), sendo adequado: $\geq 70\%$; média: 60-69%; moderado: 50-59%; moderadamente grave: 35-49%; grave e muito grave: $< 35\%$.

5.7 DETERMINAÇÃO BACTERIOLÓGICA

A secreção da cavidade orofaríngea foi coletada com um “swab” estéril, pela manhã com os pacientes em jejum de 10 horas. O material foi processado logo após a coleta, segundo

metodologia de Gilligan, Kiska e Appleman (2006) e em seguida, avaliado microscopicamente (NIKON E200, Chiyoda, Tóquio, Japão) pelo método de Gram (GILLIGAN et al., 2006). Os homogeneizados formados a partir de 0,5 mL da porção purulenta do escarro foi adicionado a 1 mL de solução salina estéril, os quais foram inoculados em placas individuais contendo ágar de sangue de carneiro e ágar de chocolate suplementado com 0,1% de extrato de levedo fabricados pela Oxoid (São Paulo, SP, Brasil). Os 20 µg/mL de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA) e ágar Mack Conkey (Oxoid, São Paulo, SP, Brasil) foram adicionados em outra placa contanto meio seletivo para "B. cepacia" e uma última placa contendo ágar Manitol, ambas as placas foram produzidas pela Oxoid (São Paulo, SP, Brasil). A placa de ágar chocolate foi incubada em sistema de micro-aerofilia. As placas restantes foram incubadas em aerobiose, em estufa, a 37°C. As placas foram examinadas, por meio da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), após 48 horas, mantidas à temperatura ambiente e reexaminadas (nova contagem das UFC) após 96 horas do tempo inicial. A indicação de presença de infecção para FC foi realizada a partir da contagem das UFC (≥ 105 UFC/mL de um patógeno) (GILLIGAN et al., 2006). Este exame foi realizado pelo Laboratório prestador de serviços ao HIJG Ciência Laboratório Médico Ltda®, Florianópolis, SC, Brasil.

5.8 ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL

5.8.1 Coleta e armazenamento das amostras de fezes

Os pacientes foram orientados a coletar as fezes no hospital no dia da consulta conforme rotina já estabelecida. Para análise da CLP fecal as fezes foram coletadas em recipientes plásticos fornecidos pelo hospital e entregues no mesmo dia. A determinação da CLP foi feita no Ciência Laboratório Medico (HIJG, Florianópolis, SC, Brasil). Os microrganismos foram quantificados pela técnica de FISH que foi feita nas fezes coletadas com um canudo de plástico de 4 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro, o canudo foi introduzido nas fezes de 4-10 mm e colocado dentro do tubo Falcon de 50 mL, fixados com 30 mL de solução de Carnoy composta por 6/6/1 etanol/ácido acético glacial/clorofórmio

respectivamente (Dinâmica Química Contemporânea Ltda®, Diadema, SP, Brasil), durante 24 horas à temperatura ambiente e em seguida mantidos refrigerados a 4°C até serem manipulados. No laboratório, os cilindros fecais foram removidos do canudo e desidratadas com xileno (Dinâmica Química Contemporânea Ltda®, Diadema, SP, Brasil). Após a desidratação, as fezes foram colocadas em bandejas de aço, para acrescentar a parafina líquida. Com a parafina semi-sólida, foi inserido um cassete histológico e adicionado as identificações dos pacientes nas amostras (SWIDSINSKI et al., 2008). Assim que os blocos de parafina solidificaram, foram armazenados em temperatura ambiente e enviados para o Departamento de Ciências Médicas *Traslazionali* do setor da pediatria da Universidade de Nápoles Federico II que realizou o FISH (Nápoles/Itália).

5.8.2 Análise dos Microrganismos pela *Fluorescent in Situ Hybridization*

No laboratório, foi realizado o corte histológico em um micrótomo, formando fatias de 4 µm de espessura. Essas fatias histológicas foram inseridas em lâminas Superfrost Ultra Plus (Thermo Scientific, Monza, Monza e Brianza, Itália), passaram por um banho com água morna (30°C) e em seguida foram para a estufa a 30°C por cerca de 1 hora. Para a desparafinação foram necessários 8 banhos das lâminas, sendo 4 banhos de 3 minutos em xileno e após 4 banhos de 3 minutos em etanol ambos produtos produzidos pela VWR Chemicals, Lutterworth, LE17 (Reino Unido) o material foi levado para a estufa por 45 minutos. A solução de hibridização foi composta por 360 µL de 5M NaCl e 40 µL de 1M Tris-HCL pH 7,4 ambos produzidos pela Panreac Appli Chem, Stockport SK6 (Reino Unido). Os 20 µL de formaldeído, 1.580 µL de água destilada e 10 µL de 10% Sodium dodecyl sulfate foram fabricados pela Sigma Life Science® (Milan, Lombardia, Itália), e levada a estufa a 50°C por até sua utilização. A essa solução foi combinada a sonda genética, adicionada as lâminas com as amostras e levadas a estufa úmida por 45 minutos a 50°C. As amostras foram analisadas com a combinação das sondas de 100 ng EUB I, EUB II, e EUB III (sonda universal), conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC5', coloração verde - controle positivo que reage com todas as bactérias) e uma sonda

específica de cada espécie (Erec482, Fpra655 e Pseae A, Pseae A II) foi conjugada com uma única molécula de carbocanina fluorescente (Cy3, coloração vermelho). As sondas de oligonucleotídeos utilizadas nesse estudo foram fabricadas por MWG Eurofins (MWG Operon®, Ebersberg, Alemanha). Em seguida a lâmina foi lavada com água destilada e colocada no tubo Falcon de 50 mL para lavar no banho maria a 50°C por 5 minutos, e colocadas na estufa por 10 minutos. Após, foi adicionado 50 µL de DAPI composto por 1 mL de 1 M de Tris-HCL pH 7,4; 9 mL de 5 M de NaCl; 50 µL de 4,6-diamidino-2-fenilindol e 1 mg/mL em 50 mL de água destilada e foi mantido por 5 minutos no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas com água destilada e colocadas na estufa por 10 minutos, mantidas à temperatura ambiente até à leitura em microscópio (Nikon®, Tóquio, Honshu Japão) (SWIDSINSKI et al., 2008). A leitura das lâminas foi realizada em um microscópio de epifluorescência Nikon 80i Eclipse com uma câmera colorida Nikon DS-U2 e um software de imagem NIS-Elements (Nikon®, Tóquio, Honshu, Japão). As bactérias foram quantificadas por contagem manual. Bactérias com distribuição desigual ou com baixa concentração foram enumeradas dentro de áreas maiores de 100x100 µm, em campos microscópicos inteiros, ou na superfície total do cilindro fecal. Todas as contagens foram realizadas com uma ampliação de 1.000 vezes. A conversão dos números dentro de áreas microscópicos definidos para concentrações de bactérias por mililitro foi baseada no cálculo de que uma amostra de 10 µL com uma concentração celular de 10⁹ células/mL tem em média 40 células por campo (SWIDSINSKI et al., 2008).

5.8.3 Calprotectina fecal

A CLP fecal foi dosada pelo teste imuno-enzimático RIDASCREEN® Calprotectin (R-biopharm AG -Darmstadt, Hessen, Alemanha). Todos os reagentes utilizados nesse teste foram fabricados por R-Biopharm AG (Darmstadt, Hessen, Alemanha). Para o tampão de lavagem (NaCl tamponada com fosfato) foi misturado uma parte da solução para 9 partes de água destilada. Para o tampão de extração foi misturado 1 parte do tampão de extração (0,05% NaN₃) com 2 partes de água destilada. Foi utilizado 100 mg de amostra fecal em um tubo de teste e em

seguida adicionado 5 mL de tampão de extração diluído (diluição 1:50). As fezes foram homogêneas e em seguida foi aspirado 100 µL das mesmas com uma pipeta e pipetados em 5 mL de tampão de extração diluído, foram incubadas por 5 minutos e em seguida homogêneas novamente. Após, foram centrifugadas durante 10 minutos para sedimentação das partículas fecais maiores. O sobrenadante do extrato foi diluído novamente para aplicação do teste. A diluição foi em 20 µL do sobrenadante em 980 µL de tampão de diluição (solução de NaCl tamponada com proteína: 0,1% de NaN_3) de amostras. Utilizou-se 100 µL da diluição final da amostra para o teste. Para a primeira incubação foi adicionado aos recipientes 100 µL de cada um dos padrões 1 a 5 (concentrações de CLP dos padrões 1 a 5: 19,5 mg/kg; 56 mg/kg; 95 mg/kg; 275 mg/kg; 800 mg/kg e contém 0,1% NaN_3), 100 µL de tampão de diluição (controle negativo) e de controle positivo (0,1% de NaN_3) e a amostra fecal diluída a analisar. Utilizou o controle *Low-Positiv* (0,1% de NaN_3), adicionou 100 µL e foi para incubação em uma placa por 1 hora a temperatura ambiente (20°C - 25°C). Após esvaziar os recipientes, foi lavado 5 vezes com 300 µL de tampão de lavagem. Para a segunda incubação foi adicionado 100 µL de conjugado (anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase em solução protéica estabilizada), e incubado a placa por 1 hora a temperatura ambiente (20°C - 25°C). Repetiu o processo de lavagem e a terceira e última incubação, foi adicionado 100 µL de substrato de peróxido de hidrogênio/tetrametilbenzidina, incubado por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente (20°C - 25°C), nesse momento a solução incolor transformou em azul. Após, adicionou o reagente de parada 1 N de ácido sulfúrico (nesse momento a solução mudou novamente de cor para amarelo) para terminar a reação e fazer a leitura. A concentração de CLP que é expressa em mg/kg de fezes foi determinada mediante a curva padrão. As amostras com uma concentração de CLP de 0-50 mg/kg serão considerados normais, valores entre 50mg/kg -100 mg/kg serão considerados intermediários e valores superiores a 100mg/kg indicam inflamação intestinal e o paciente deve ser encaminhado para outras investigações (FAGERBERG et al., 2003).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados para avaliar a distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e quando necessário submetidos à

normalização logarítmica. Dados com distribuição normal foram apresentados em média e \pm desvio padrão e os assimétricos em mediana e intervalo interquartil: 25° - 75°. O teste “t” Student e Mann Whitney foram utilizados quando apropriado para verificar a diferença das médias de concentração da CLP fecal e contagens de *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* entre o GC versus GFC, GC versus GFCDF50-Homo e GC versus GFCDF508-Hetero. Para avaliar o tamanho do efeito destes dados, foi aplicada a estatística de Cohen (corrigido por Hedges’g), para os dados com distribuição normal. Os tamanhos do efeito foram assumidos como negligível ($g < 0,20$), pequeno (g entre 0,20 e 0,49), médio (g entre 0,50 e 0,79) ou grande ($g > 0,80$) (COHEN, 1992). O tamanho do efeito de Cohen foi calculado usando a calculadora de tamanho de efeito (<http://www.cem.org/effect-size-calculator>). Para os dados com distribuição assimétrica, os tamanhos do efeito foram calculados usando a estatística de Cliff. Os tamanhos do efeito foram interpretados como negligível ($\delta < 0,147$), pequeno (δ entre 0,147 e 0,33) médio (δ entre 0,33 e 0,474) e forte ($\delta > 0,474$) (ROMANO et al., 2006). O tamanho de efeito de Cliff foi calculado usando o software Delta’s Calculator de Cliff (MACBETH; RAZUMIEJCZYK; LEDESMA, 2011). Análise de regressão linear univariada e multivariada foi realizada entre os GC, GFC, GFCDF508-Homo e GFCDF508-Hetero. As variáveis de exposição foram: GFC, GFCDF508-Homo e GFCDF508-Hetero, as variáveis de desfecho foram: IMC/I, P/I e E/I todos em z-score, *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P.aeruginosa* e a CLP fecal e as variáveis de ajuste foram idade e sexo. Na análise de regressão todas as variáveis assimétricas foram transformadas em log natural para a normalização dos dados ou o mais próximo da normalidade. Para avaliar o tamanho do efeito destes dados foi aplicada a estatística de Cohen (f^2). O f^2 de Cohen foi calculado para fornecer uma medida padronizada do tamanho do efeito (<https://www.danielsoper.com/statcalc/calculator.aspx?id=5>). O tamanho do efeito foi classificado como pequeno (f^2 entre 0,02 e 0,14), médio (f^2 entre 0,15 e 0,34) ou grande ($\geq 0,35$) (COHEN, 1992). Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$). A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences® (SPSS Inc, 2006, Chicago, IL, USA).

6 RESULTADOS

Dentre as 104 crianças e adolescentes em seguimento clínico no Ambulatório Interdisciplinar de FC, 73 atendiam aos critérios de inclusão, porém, um paciente não compareceu à consulta no tempo de coleta previsto, totalizando em 72 crianças e adolescentes do GFC, com mediana de idade de 3,5 anos (Intervalo Interquartil (IIQ): 1,0; 8,0) e 45,8% eram do sexo masculino. O GC foi composto por 48 crianças e adolescentes entre irmãos dos pacientes com FC sem doença e/ou que eram atendidos no ambulatório de puericultura do HIJG, com mediana de idade 4,0 anos (IIQ: 2,0; 8,0) e 45,8% do sexo masculino. O tamanho total da amostra foi de 120 crianças (Figura 3) e adolescentes entre GC (n = 48) e GFC (n = 72) (Tabela 1).

O GFCDF508-Homo foi composto por 25 crianças e adolescentes com mediana de idade de 3,0 anos (IIQ: 1,0; 8,5) e o GFCDF508-Hetero foi composto por 27 crianças e adolescentes com mediana de idade de 4,0 anos (IIQ: 2,0; 8,0) e em ambos os grupos 44,4% deles eram do sexo masculino. Não houve diferenças estatísticas para as variáveis de sexo e idade entre os grupos (Tabela 1).

Em relação aos marcadores do estado nutricional, houve diferença significativa para o z-IMC/I entre os GC e os grupos de pacientes com FC ($p < 0,05$), onde 81,2% do GC apresentaram z-IMC/I eutrófico, ninguém se classificou em baixo peso e 18,8% apresentaram z-IMC/I á cima do recomendado (recomendado: ≥ -2 e $\leq +1$), já no GFC 4,2% do pacientes apresentaram z-IMC/I a baixo do recomendado e destes, um sujeito foi classificado com magreza acentuada, todos pertenciam ao GFCDF508-Hetero e apresentavam bacteriologia pulmonar positiva, 9,7% apresentaram z-IMC/I á cima do recomendado para a eutrofia, destes, 3 indivíduos pertenciam ao GFCDF508-Hetero e os demais não possuíam a mutação DF508 em nenhum dos alelos e 86,1% do GFC foi classificado em eutrófico. Para o z-P/I houve diferença significativa entre o GC vs GFC e GC vs GFCDF508-Homo ($p < 0,05$), onde 90% do GC apresentaram o z-P/I adequado, 7,5% estava á cima e apenas um indivíduo apresentou z-P/I classificado como baixo peso para idade, já no GFC 5% foram classificados em baixo peso para idade, sendo que destes, 2 indivíduos pertenciam ao GFC DF508-Homo e 95% apresentaram o peso para a idade adequado, ninguém

se classificou á cima do peso para idade no GFC (Tabela 1). A estatística de Cohen revelou um tamanho do efeito de médio (g entre 0,50 e 0,79) este achado fortalece a significância encontrada entre estes dados na tabela 1.

Ambos os grupos de pacientes com FC apresentaram pontuação de bom a excelente do S-K escore (pontos) (GFC: $87,57 \pm 16,74$; GFCDF508-Homo: $84,79 \pm 20,61$ e GFCDF508-Hetero: $86,46 \pm 17,84$). O VEF₁ foi de $67,22 \pm 21,47$ para o GFC, $62,91 \pm 23,81$ para o GFC DF508-Homo e $73,44 \pm 19,69$ para o GFCDF508-Hetero (Tabela 1).

Em relação ao uso de antibiótico, >50% dos grupos de pacientes com FC estavam em uso. A proporção de insuficientes pancreáticos no GFC foi de 86% com destaque para o GFCDF508-Homo, onde 100% desse grupo eram insuficientes pancreáticos.

A amamentação exclusiva até os 6 meses de idade, sem a adição de fórmulas ou outros complementos alimentares, foi prevalente no GFC (n = 19) com 31,6% e o GC (n = 16) foi prevalente para o parto vaginal (53%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização demográfica, estado nutricional e clínico, entre o grupo controle (GC) com o grupo fibrose cística (GFC), GFCDF508-Homozigoto (GFCDF508-Homo) e GFCDF508-Heterozigoto (GFCDF508-Hetero).

Variáveis	GC		GFC		GFC DF508-Homo		GFC DF508-Hetero			
	(n = 120)	(n = 48)	(n = 72)	p ³	(n = 25)	p ⁴	(n = 27)	p ⁵		
Idade (anos) ^{1,§}	4,0 (2,0 - 8,0)	3,5 (1,0 - 8,0)	0,743		3,0 (1,0 - 8,5)	0,521	4,0 (2,0 - 8,0)	0,479		
Sexo Masculino n (%) [‡]	22 (45,8)	33 (45,8)	1,000		11 (44)	1,000	12 (44,4)	0,913		
Estado Nutricional - Clínico					<i>g</i> ³	<i>g</i> ⁴		<i>g</i> ⁵		
IMC/I (z-escore) ^{2,€}	0,291 ± 1,27	-0,287 ± 1,08	0,009	0,50	-0,582 ± 0,79	0,003	0,76	-0,376 ± 1,22	0,030	0,53
P/I (z-escore) ^{2,€,Ω}	-0,089 ± 1,19	-0,575 ± 1,04	0,033	0,44	-0,875 ± 1,18	0,016	0,66	-0,375 ± 0,74	0,314	0,27
E/I (z-escore) ^{2,€}	-0,372 ± 1,38	-0,627 ± 1,12	0,272	0,21	-0,683 ± 1,38	0,367	0,22	-0,366 ± 0,85	0,983	0,00
S-K score (pontos) ^{2,‡}	-	87,57 ± 16,74	-	-	84,79 ± 20,61	-	-	86,46 ± 17,84	-	-
VEF₁ (%) ^{2,‡}	-	67,22 ± 21,47	-	-	62,91 ± 23,81	-	-	73,44 ± 19,69	-	-
antibioticoterapia n (%)	-	36 (50,0)	-	-	14 (56,0)	-	-	15 (55,5)	-	-
Insuficiência Pancreática n (%)	-	62 (86,1)	-	-	25 (100,0)	-	-	21 (77,7)	-	-
AE - 6 meses n (%) ^{‡,#}	05 (29,4)	06 (31,6)	1,000	-	02 (28,6)	0,927	-	04 (33,3)	0,208	-
Tipo de parto n (%) ^{‡,#}										
Vaginal	09 (56,3)	05 (26,3)	0,057	-	02 (28,6)	0,318	-	03 (25,0)	0,676	-
Cesárea	07 (43,7)	14 (73,7)	-	-	05 (71,4)	-	-	04 (33,3)	-	-

IMC/I= Índice de Massa Corporal para Idade. P/I= Peso para Idade. E/I= Estatura para Idade. S-K score= Schwachman-Kulczycki score. FEV₁= Forced Expiratory Volume in the First Second. AE= Amentação Exclusiva. Mediana e Intervalo Interquartil¹. Média ± Desvio padrão da média².[§]Teste de Mann-Whitney. [‡]Qui Quadrado. [€]Teste de *t-student*. Significância: p < 0,05. p³e g³ = GC vs GFC. p⁴e g⁴ = GC vs GFCDF508 Homo. p⁵e g⁵ = GC vs GFCDF508-Hetero. ^ΩP/I: GC (n = 40), GFC (n = 61), GFC DF508 Homo (n = 22), GFC DF508-Hetero (n = 22), outras mutações (n = 17). [‡]S-K score: GFC (n = 68), GFC DF508-Homo (n = 24), GFC DF508-Hetero (n = 24), outras mutações (n = 20). [‡]FEV₁: GFC (n = 23), GFC Df508-Homo (n = 11), GFC DF508-Hetero (n = 09), outras mutações (n = 03). [#]AE e Tipo de parto: GC (n = 16), GFC (n = 19), GFC DF508-Homo (n = 07), GFC DF08-Hetro (n=07). Teste Hedges'g corrigido (COHEN, 1992), onde os tamanhos do efeito foram assumidos como negligível (g <0,20), pequeno (g entre 0,20 e 0,49), médio (g entre 0,50 e 0,79) ou grande (g >0,80)

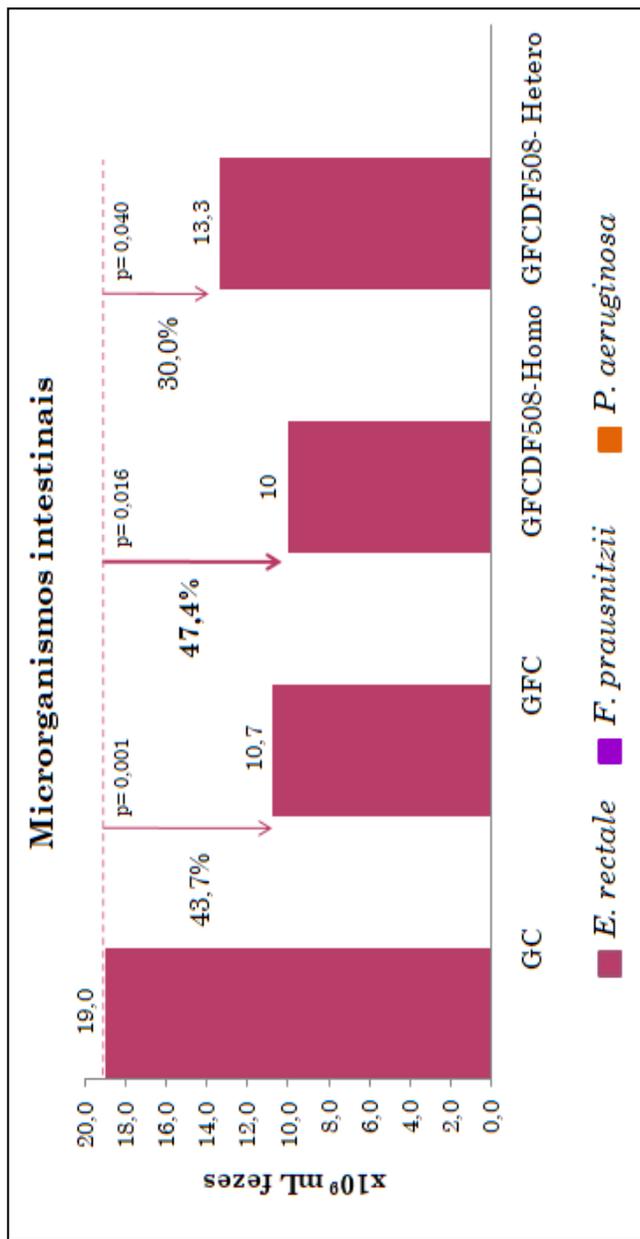
Em relação a bacteriologia pulmonar (BP), do total do GFC, 38 crianças e adolescentes apresentaram BP+ distribuídos nos GFCDF508-Homo (n = 16) e no GFCDF508-Hetero (n = 16). Enquanto para a BP- a maioria dos sujeitos eram do GFCDF508-Hetero (40%, n = 11). A colonização pulmonar prevalente isoladamente em todos GFC foi a *S. áureos* (GFC: 36,8%, GFCDF508-Homo: 43,7% e GFCDF508-Hetero: 25%), e a colonização pulmonar associada a duas bactérias, foi prevalente para *P. aeruginosa*+ *S. aureus* (GFC: 29%, GFCDF508-Homo: 37,5% e GFCDF508-Hetero: 31,2%) (Tabela 2).

A microbiota intestinal avaliada pela técnica de FISH revelou diferença estatisticamente significativa para os microorganismos *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* ($p < 0,05$). A mediana de concentração da *E. rectale* apresentou-se 43,7% menor no GFC quando comparado com o GC, no GFCDF508-Homo, a mediana de concentração da *E. rectale* estava 47,4% menor em relação ao GC e no GFCDF508-Hetero quando comparado ao GC, este apresentou-se 30% menor (Figura 4). Já, a mediana de concentração da *F. prausnitzii* se apresentou 93% maior no GC em relação ao GFC e 68,4% maior no GC em relação ao GFCDF508-Hetero. Destaca-se o GFCDF508-Homo que apresentou a mediana de concentração da *F. prausnitzii* zero em relação ao GC (Figura 5). A mediana de concentração da *P. aeruginosa* estava 565% maior tanto no GFC, como no GFCDF508-Homo e 885% maior no GFCDF508-Hetero ($p < 0,05$), quando comparados ao GC (Tabela 2) (Figura 6).

A inflamação intestinal avaliada pela CLP fecal foi significativamente maior para todos os grupos da FC - mediana: 46,5 - IIQ: 21,8; 113,8; GFCDF508-Homo - mediana: 65,5 - IIQ: 24,2; 117,8 e no GFCDF508-Hetero - mediana: 58,45 - IIQ: 49,0; 113,8 quando comparado ao GC - mediana: 20,1 - IIQ: 15,6; 31,6 ($p < 0,05$). Ou seja, o GFC apresentou a mediana de concentração da CLP fecal 231,3% maior, o GFCDF508-Homo 325,8% maior e o GFCDF508-Hetero 290,7% maior todos em relação a mediana de concentração do GC (Tabela 2) (Figura 7).

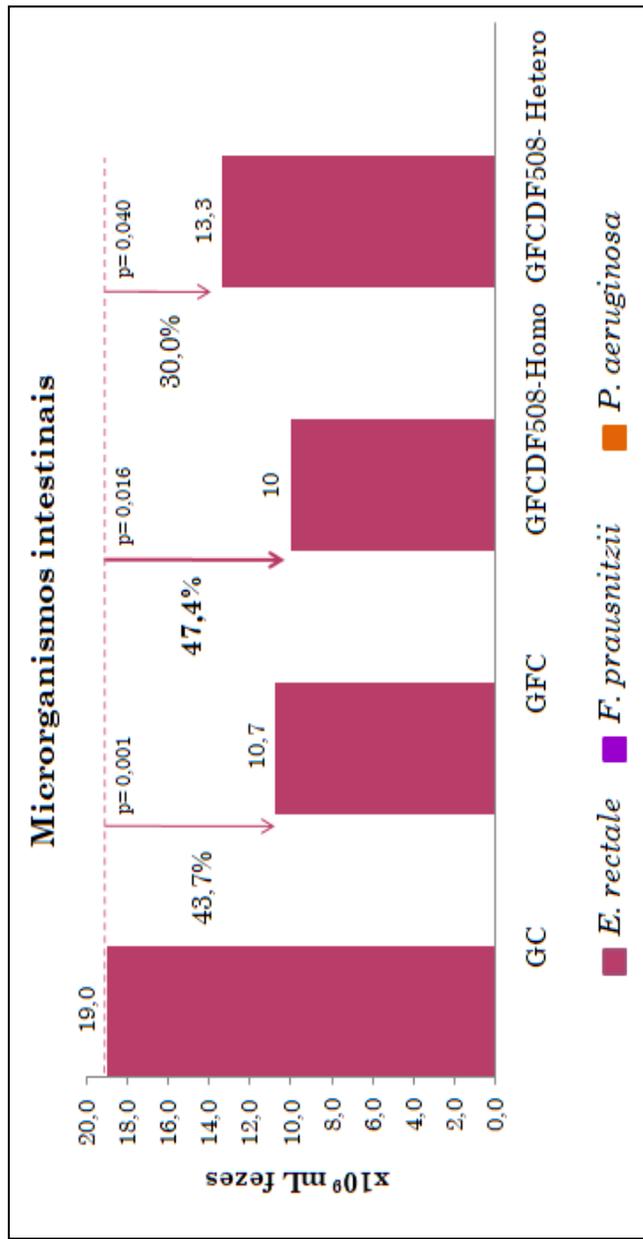
Ao realizar a estatística de Cohen observou-se um tamanho do efeito médio (δ entre 0,33 e 0,474) a forte ($\delta > 0,474$) fortalecendo a significância estatística encontrada entre os dados.

Figura 4. Concentração da *E. rectale* entre os GC, GFC, GFCDF508-Homo e o GFCDF508-Hetero.



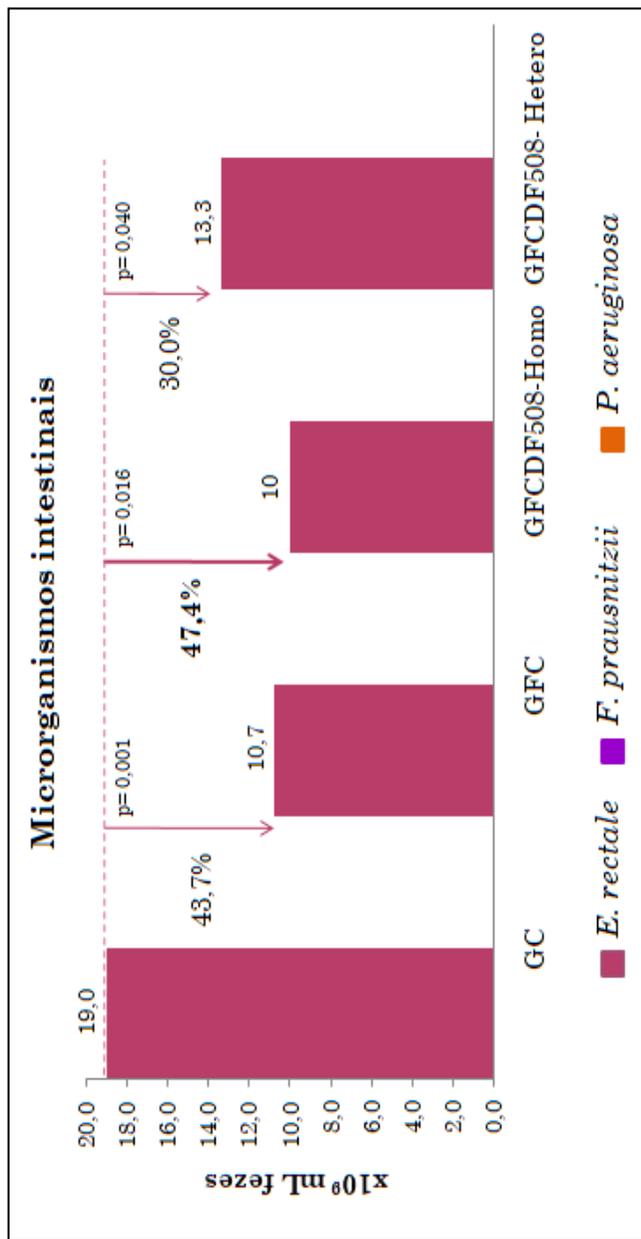
Fonte: Autor

Figura 5. Concentração da *F. prausnitzii* entre os GC, GFC, GFCDF508-Homo e o GFCDF508-Hetero.



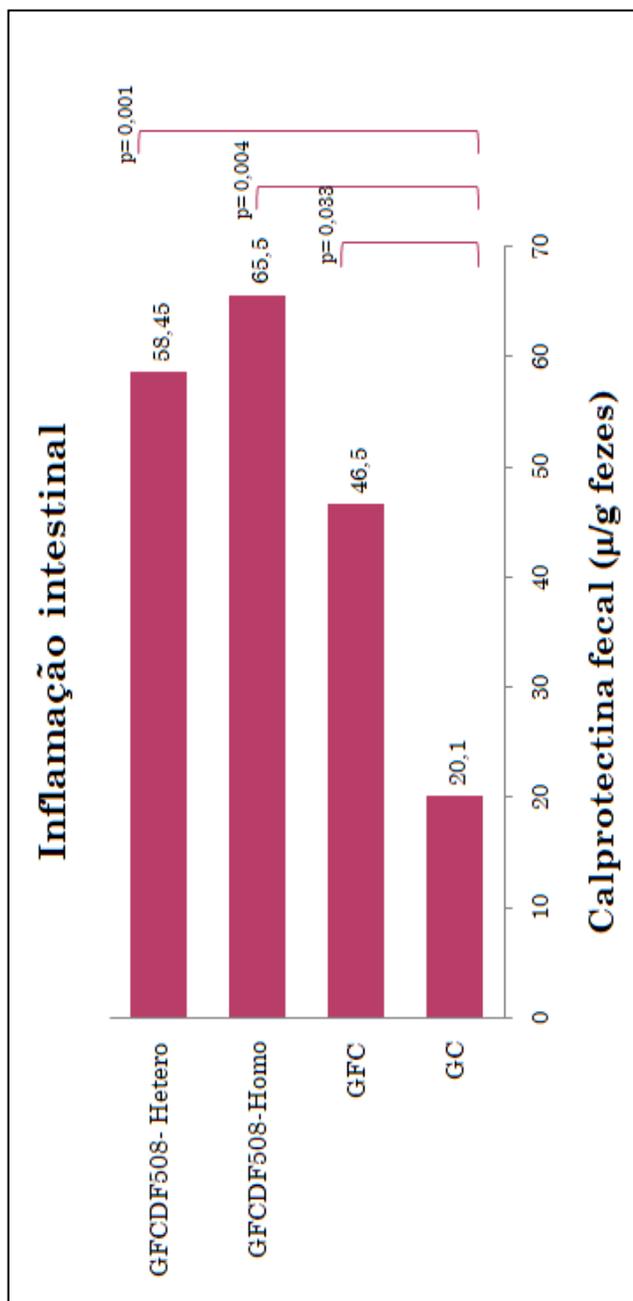
Fonte: Autor

Figura 6. Concentração da *P. aeruginosa* entre os GC, GFC, GFCDF508-Homo e o GFCDF508-Hetero.



Fonte: Autor

Figura 7. Concentração da CLP fecal entre os GC, GFC, GFCDF508-Homo e o GFCDF508-Hetero.



Fonte: Autor.

Tabela 2 -Caracterização da bacteriologia pulmonar (BP), microrganismos e inflamação intestinal do grupo controle (GC), grupo fibrose cística (GFC), GFCDF508-Homozigoto (GFCDF508-Homo) e GFCDF508-Heterozigoto (GFCDF508-Hetero).

Variáveis	GC	GFC			GFC DF508-Homo			GFC DF508-Hetero		
(n = 120)	(n = 48)	(n = 72)			(n = 25)	p ²		(n = 27)	p ³	
Bacteriologia Pulmonar [‡] n (%)										
BP ⁻	-	34 (47,2)	-		09 (36,0)	0,360		11 (40,7)	0,653	
BP ⁺	-	38 (52,8)	-		16 (64,0)	-		16 (59,3)	-	
<i>P. aeruginosa</i>	-	09 (23,6)	-		02 (12,5)	0,474		04 (25,0)	1,000	
<i>B. cepacia</i>	-	00 (00,0)	-		00 (00,0)	-		00 (00,0)	-	
<i>S. aureus</i>	-	14 (36,8)	-		07 (43,7)	0,762		04 (25,0)	0,532	
<i>P. aeruginosa</i> + <i>S. aureus</i>	-	11 (29,0)	-		06 (37,5)	0,755		05 (31,2)	1,000	
<i>P. aeruginosa</i> + <i>B. cepacia</i>	-	02 (05,3)	-		01 (06,2)	1,000		01 (06,2)	1,000	
<i>B. cepacia</i> + <i>S. aureus</i>	-	02 (05,3)	-		00 (00,0)	1,000		02 (12,5)	0,575	
Microrganismos (x10 ⁹ mL fezes) ^{1,§}										
(n = 36)	(n = 17)	(n = 19)	p ⁴	δ ⁴	(n = 07)	p ⁵	δ ⁵	(n = 07)	p ⁶	δ ⁶
<i>E. rectale</i>	19,0 (14,0 - 23,0)	10,7 (1,17 - 16,0)	0,001	0,60	10,0 (0,0 - 17,3)	0,016	0,63	13,3 (6,3 - 16,0)	0,040	0,54
<i>F. prausnitzii</i>	14,0 (3,92 - 27,6)	1,00 (0,00 - 12,3)	0,035	0,43	0,0 (0,0 - 0,57)	0,003	0,76	4,43(1,4 - 18,0)	0,375	0,24
<i>P. aeruginosa</i>	0,20 (0,06 - 0,53)	1,13(0,83 - 4,37)	<0,001	0,82	1,13 (0,63 - 7,08)	0,011	0,67	1,77 (0,90 - 3,47)	<0,001	0,93
Inflamação intestinal (μ/g fezes) ^{1,§}										
(n = 32)	(n = 14)	(n = 18)			(n = 07)			(n = 6)		
Calprotectina	20,1 (15,6 - 31,6)	46,5 (21,8 -113,8)	0,033	0,44	65,5 (24,2 - 177,8)	0,004	0,75	58,45 (49,0 - 113,8)	0,001	0,88

P. aeruginosa= *Pseudomonas aeruginosa*; *B. cepacia*= *Burkholderia cepacia*; *S. aureus*= *Staphylococcus aureus*; *F. prausnitzii*= *Faecalibacterium prausnitzii*.

E. rectale= *Eubacterium rectale*. [‡]Qui Quadrado. ¹Mediana e Intervalo Interquartil Quartil. [§]Teste de Mann-Whitney. Significância: p < 0,05.

p²= GFC vs GFCDF508-Homo. p³= GFC vs GFCDF508-Hetero. p⁴e δ⁴= GC vs GFC. p⁵e δ⁵= GC vs GFCDF508-Homo. p⁶e δ⁶= GC vs GFCDF508-Hetero.

Teste de Cliff - os tamanhos do efeito foram interpretados como negligível (δ <0,147), pequeno (δ entre 0,147 e 0,33) médio (δ entre 0,33 e 0,474) e forte (δ >0,474) (ROMANO et al., 2006).

Ao avaliar o estado nutricional pelos indicadores IMC/I, P/I e E/I todos medidos em z-score, foi observado que o fato de ser portador da FC pode interferir negativamente no estado nutricional com diferença estatisticamente significativa tanto na análise bruta quanto na análise justada (para sexo e idade), para os indicadores de IMC/I e P/I entre os GC vs GFC (tabela 3) , GC vs GFCDF508-Homo (Tabela 4), com $p < 0,05$. Para a análise entre o GC vs GFCDF508-Hetero (Tabela 5) houve diferença significativa apenas para o indicador de IMC/I tanto na análise bruta quanto na ajustada com $p < 0,05$.

Em relação aos microrganismos intestinais, observou-se que o fato de ter FC interfere na composição da microbiota intestinal com diferença estatisticamente significativa tanto na análise bruta quanto na análise ajustada (sexo e idade), para *E. rectale*, *F. prausnitzii*, e *P. aeruginosa* com $p < 0,05$ em relação ao GC. Ou seja, o fato de ter FC pode contribuir para a redução da concentração da *E. rectale* e *F. prausnitzii* ao passo que pode contribuir com o aumento da *P. aeruginosa*, quando comparado com pacientes sem FC (Tabela 3). Na análise bruta entre o GC e o GFCDF508-Homo (Tabela 4), observou-se que os pacientes com FCDF508-Homo, pode contribuir para redução da concentração de *E. rectale* e *F. prausnitzii* e aumento da concentração *P. aeruginosa* no intestino, essa relação permaneceu significativa após a análise ajustada (para sexo e idade), exceto para o microrganismo *E. rectale*. Ao analisar o GC vs GFCDF508-Hetero (Tabela 5) na análise bruta houve diferença estatística somente para a bactéria *P. aeruginosa* com $p < 0,001$ (Tabela 5), revelando que quem possui a mutação DF508-Hetero pode contribuir para o aumento da *P. aeruginosa* e após análise ajustada (sexo e idade), percebeu-se que a mutação DF508-Hetero pode exercer influência na concentração com diferença estatisticamente significativa para *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa*.

A inflamação intestinal avaliada pela CLP fecal, foi significativamente diferente nos grupos GC vs GFC com $p < 0,05$, ou seja o fato de ter FC pode contribuir para o aumento na concentração da CLP fecal (Tabela 3), ao avaliar o GC vs GFCDF508-Homo (Tabela 4), também verificou-se que o fato do GFC apresentar a mutação DF508-Homo pode contribuir para o aumento CLP fecal e ao analisar o GC em relação ao GFCDF508-Hetero (Tabela 5), aqueles que do GFC que apresentam a mutação DF508-Hetero também apresentaram um aumento na concentração

da CLP fecal essas análises foram significativa com $p < 0,05$ tanto na análise bruta quanto na ajustada (sexo e idade).

A estatística de Cohen (f^2) aplicada na regressão linear mostrou um tamanho do efeito de médio (f^2 entre 0,15 e 0,34) a grande ($\geq 0,35$) principalmente ao avaliar a relação da microbiota intestinal e inflamação intestinal entre os GC vs GFC (Tabela 3), GC vs GFCDF508-Homo (Tabela 4) e GC vs GFCDF508-Hetero (Tabela 5), com destaque para a *P. aeruginosa* que apresentou tamanho do efeito grande ($\geq 0,35$) ao avaliar a relação do GC entre todos os grupos da FC.

Tabela 3 - Análise de regressão linear univariada e multivariada entre estado nutricional, microrganismos e inflamação intestinal entre os grupos controle (GC), grupo fibrose cística (GFC).

Variáveis	Bruto		f ²	Ajustado		f ²
	β 0	p (IC95%)		β 1	p (IC95%)	
	Coefficiente			Coefficiente	(ajustado para idade e sexo)	
Estado Nutricional	GC (n = 48)			GFC (n = 72)		
IMC/I (z-score)	-0,099	0,009 (-0,172; -0,026)	0,060	-0,101	0,008 (-0,175; -0,026)	0,062
P/I (z-score)	-0,092	0,033 (-0,177; -0,007)	0,047	-0,094	0,036 (-0,182; -0,006)	0,047
E/I (z-score)	-0,040	0,272 (-0,112; 0,032)	0,010	-0,041	0,285 (-0,115; 0,034)	0,010
Microrganismos	GC (n = 14)			GFC (n = 18)		
<i>E. rectale</i> (x10 ⁹ mL fezes) [‡]	-0,291	0,041 (-0,569; -0,013)	0,152	-0,324	0,029 (-0,611; -0,036)	0,226
<i>F. prausnitzii</i> (x10 ⁹ mL fezes) [‡]	-0,163	0,009 (-0,282; -0,044)	0,305	-0,212	0,001 (-0,329; -0,095)	0,669
<i>P. aeruginosa</i> (x10 ⁹ mL fezes) [‡]	0,306	<0,001 (0,196; 0,416)	1,118	0,314	<0,001 (0,199; 0,428)	1,164
Inflamação intestinal	GC (n = 14)			GFC (n = 18)		
Calprotectina (μg fezes) [‡]	0,190	0,043 (0,006; 0,373)	0,148	0,256	0,025 (0,035; 0,477)	0,222

IMC/I: Índice de Massa Corporal para Idade. P/I: Peso para Idade. E/I: Estatura para Idade. *F. prausnitzii*: *Faecalibacterium prausnitzii*; *E. rectale*: *Eubacterium rectale*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*. [‡]Valores normalizados pela transformação em logaritmo na base natural. Coeficiente β₀: valores brutos; coeficiente β₁: valores ajustados para variáveis de confusão (idade e sexo). Os valores de p foram derivados da análise de regressão linear múltipla (intervalo de confiança de 95%). Valor de significância p < 0,05. O tamanho do efeito foi classificado como pequeno (f² entre 0,02 e 0,14), médio (f² entre 0,15 e 0,34) ou grande (≥ 0,35) (COHEN, 1992).

Tabela 4 - Análise de regressão linear univariada e multivariada entre estado nutricional, microrganismos e inflamação intestinal entre os grupos controle (GC), grupo fibrose cística (GFC): GFCDF508-Homozigoto (GFCDF508-Homo).

Variáveis	Bruto			Ajustado		
	$\beta 0$ Coeficiente	p(IC95%)	f ²	$\beta 1$ Coeficiente	p (IC95%) (ajustado para idade e sexo)	f ²
Estado Nutricional	GC (n = 48)			GFCDF508-Homo (n = 25)		
IMC/I (z-score)	-0,138	0,003 (-0,226; -0,050)	0,137	-0,138	0,003 (-0,228; -0,048)	0,141
P/I (z-score)	-0,118	0,016 (-0,214; -0,023)	0,102	-0,126	0,015 (-0,226; -0,026)	0,108
E/I (z-score)	-0,037	0,367 (-0,118; 0,044)	0,011	-0,033	0,443 (-0,119; 0,052)	0,014
Microrganismos	GC (n = 17)			GFCDF508-Homo (n = 07)		
<i>E. rectale</i> (x10 ⁹ mL fezes) [‡]	-0,252	0,048 (-0,501; -0,002)	0,221	-0,238	0,103 (-0,529; 0,053)	0,223
<i>F. prausnitzii</i> (x10 ⁹ mLfezes) [‡]	-0,175	0,001 (-0,270; -0,081)	1,127	-0,189	0,004 (-0,306; -0,072)	1,183
<i>P. aeruginosa</i> (x10 ⁹ mL fezes) [‡]	0,282	<0,001 (0,146; 0,417)	1,127	0,271	0,001 (0,135; 0,406)	1,747
Inflamação Intestinal	GC (n = 14)			GFCDF508-Homo (n = 07)		
Calprotectina (μ /g fezes) [‡]	0,328	0,002 (0,133; 0,523)	0,655	0,381	0,014 (0,089; 0,674)	0,683

IMC/I: Índice de Massa Corporal para Idade. P/I: Peso para Idade. E/I: Estatura para Idade. *F. prausnitzii*: *Faecalibacterium prausnitzii*; *E. rectale*: *Eubacterium rectale*;

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*.

[‡]Valores normalizados pela transformação em logaritmo na base natural. Coeficiente $\beta 0$: valores brutos; coeficiente $\beta 1$: valores ajustados para variáveis de confusão (idade e sexo). Os valores de p foram derivados da análise de regressão linear múltipla (intervalo de confiança de 95%). Valor de significância p <0,05. O tamanho do efeito foi classificado como pequeno (f² entre 0,02 e 0,14), médio (f² entre 0,15 e 0,34) ou grande ($\geq 0,35$) (COHEN, 1992).

Tabela 5 - Análise de regressão linear univariada e multivariada entre estado nutricional, inflamação intestinal e microbiota intestinal entre os grupos controle (GC), grupo fibrose cística (GFC): GFCDF508-Heterozigoto (GFCDF508-Hetero).

Variáveis	Bruto		f ²	Ajustado		f ²
	β 0 Coeficiente	p (IC95%)		β 1 Coeficiente	p (IC95%) (ajustado para idade e sexo)	
	GC (n = 48)			GFCDF508-Hetero (n = 27)		
IMC/I (z-score)	-0,094	0,030 (-0,178; -0,009)	0,067	-0,096	0,032 (-0,184; -0,009)	0,068
P/I (z-score)	-0,059	0,314 (-0,175; 0,057)	0,017	-0,054	0,388 (-0,177; 0,070)	0,020
E/I (z-score)	0,001	0,983 (-0,092; 0,094)	<0,001	-0,001	0,976 (-0,098; 0,095)	0,001
Microrganismos	GC (n = 17)			GFCDF508-Hetero (n = 07)		
<i>E. rectale</i> (x10 ⁹ mL fezes) [‡]	-0,261	0,197 (-0,669; 0,147)	0,084	-0,272	0,190 (-0,692; 0,147)	0,149
<i>F. prausnitzii</i> (x10 ⁹ mL fezes) [‡]	-0,172	0,053 (-0,346; 0,003)	0,223	-0,195	0,039 (-0,379; -0,011)	0,336
<i>P. aeruginosa</i> (x10 ⁹ mL fezes) [‡]	0,333	< 0,001 (0,184; 0,481)	1,227	0,370	< 0,001 (0,213; 0,527)	1,564
Inflamação Intestinal	GC (n = 14)			GFCDF508-Hetero (n = 07)		
Calprotectina (μg fezes) [‡]	0,437	0,001 (0,217; 0,657)	0,968	0,466	0,001 (0,228; 0,705)	1,087

IMC/I: Índice de Massa Corporal para Idade. P/I: Peso para Idade. E/I: Estatura para Idade. *F. prausnitzii*: *Faecalibacterium prausnitzii*; *E. rectale*: *Eubacterium rectale*;

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*.

[‡]Valores normalizados pela transformação em logaritmo na base natural. Coeficiente β₀: valores brutos; coeficiente β₁: valores ajustados para variáveis de confusão (idade e sexo). Os valores de p foram derivados da análise de regressão linear múltipla (intervalo de confiança de 95%). Valor de significância p < 0,05. O tamanho do efeito foi classificado como pequeno (f² entre 0,02 e 0,14), médio (f² entre 0,15 e 0,34) ou grande (≥0,35) (COHEN, 1992).

7 DISCUSSÃO

De acordo com os dados da caracterização da amostra, em relação ao estado nutricional avaliado pelos indicadores de z-IMC/I, z-P/I e z-E/I, crianças e adolescentes do GFC apresentaram o z-score no que diz respeito ao z-IMC/I e z-P/I menor em relação ao GC, com destaque para o GFCDF508-Homo que em relação ao GC, apresentou a menor média de z-IMC/I e z-P/I ambos avaliados em z-score. Ainda, os indicadores de z-IMC/I e z-P/I apresentaram um efeito médio entre o GC e o GFCDF508-Homo, revelando que este efeito era “provável que fosse percebido” de acordo com a estatística de Cohen (COHEN, 1992). Esses resultados estão de acordo com os achados encontrados em outros estudos como Panagopoulou et al., 2014 e Sheikh et al., 2014. Ainda, a média de z-P/I para o GFC foi superior (-0,57) em relação à média encontrada no estudo de Registro Brasileiro de FC (-0,68) (SILVA FILHO et al., 2014).

O comprometimento do estado nutricional não está ligado apenas à redução da função pulmonar, mas também é um fator de risco independente para morte precoce nos indivíduos com FC. Vários são fatores que contribuem para o comprometimento do estado nutricional na FC, como aumento da demanda energética, má absorção, infecções recorrentes, mas, a inflamação intestinal recentemente tem sido considerada como mais um fator contribuinte (LEE et al., 2012).

Em um estudo transversal que avaliou 36 crianças com FC, onde 27,7% apresentavam mutação DF508 homozigota e 47,3% apresentavam a mutação DF508 heterozigota, apesar de o estudo usar outros parâmetros como percentil para avaliar o estado nutricional, os pacientes desse estudo portadores da mutação DF508 homozigoto também apresentaram menor percentual de IMC ($21,9 \pm 23,3$; $p = 0,017$) quando comparados aos demais grupos (SANTOS; STEEMBURGO, 2015).

Ainda, Sands; Umlawska; Zielińska, (2015) em um estudo transversal que avaliou o estado nutricional de crianças e adolescentes com FC e relacionou com a idade no diagnóstico, tipo de mutação CFTR, infecção pulmonar por *P. aeruginosa* e função pulmonar, mostrou na análise multivariada que a frequência de infecção pulmonar por *P. aeruginosa* esteve relacionada com

valores reduzidos para os seguintes parâmetros: altura corporal, peso corporal, IMC e dobras cutâneas. A infecção por *P. aeruginosa* e o tipo de mutação CFTR também afetaram os resultados dos testes de função pulmonar, os valores mais baixos para o VEF₁ foram em crianças com infecção intermitente ou crônica e em crianças com a mutação DF508 homozigota.

Em relação ao S-K, todos os pacientes desse estudo foram classificados entre bom a excelente, diferentemente do que foi encontrado no estudo Registro Brasileiro de FC, onde apenas 73,9% apresentaram a classificação entre bom e excelente (SILVA FILHO et al., 2014). Em nosso estudo o menor valor de VEF₁ (62,91%) foi encontrado no GFCDF508-Homo, que também apresentou o menor valor para z-IMC/I e z-P/I e ainda todos desse grupo eram insuficientes pancreáticos.

A insuficiência pancreática está presente em 85% dos pacientes com FC e aproximadamente 98% dos pacientes homozigotos para a mutação DF508 são insuficientes pancreáticos e 72% dos pacientes heterozigotos para a mutação DF508 apresentam insuficiência pancreática (KESSLER; ABÉLY, 2016). Os achados do nosso estudo (GFC 86,1%, GFCDF508-Homo 100% e GFCDF508-Hetero 77,7% apresentaram insuficiência pancreática), além de serem semelhantes ao estudo de Kessler e Abély (2016) estão de acordo com o estudo transversal multicêntrico realizado por Calvo-lerma et al., (2017). O estudo multicêntrico avaliou em seis centros europeus um total de 207 pacientes pediátricos com FC, e destes 90% eram insuficientes pancreáticos.

Nas infecções respiratórias, os pacientes com FC são tratados com terapia medicamentosa, principalmente os antibióticos com objetivo de reduzir ou erradicar diversos grupos de bactérias patogênicas. O tratamento crônico com antibiótico afeta o trato gastrointestinal, cujo resultado pode ser o desequilíbrio na microbiota intestinal, conhecida como disbiose intestinal, o que acarreta prejuízos a saúde do hospedeiro (ALMEIDA et al., 2008; DUYSCHAEVER et al., 2011).

As evidências sugerem que a microbiota intestinal de crianças e adultos com FC diferem. Os grupos de bactérias potencialmente patogênicos aparecem elevados, enquanto que os grupos benéficos de *Bifidobacterium*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* parecem estar reduzidos (LI; KRAUSE; SOMERSET, 2016).

No presente estudo observou-se que a composição da

microbiota intestinal em relação a contagem dos microrganismos *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* é significativamente diferente nos indivíduos com FC quando comparados com controles. Os achados mostraram que bactérias benéficas como *E. rectale* e *F. prausnitzii*, estavam reduzidas no GFC, GFCDF508-Homo e GFCDF508-hetero, ao passo que *P. aeruginosa* estava em quantidade elevada quando comparados com o GC.

Esses dados são similares com o estudo realizado por Bruzzese et al. (2014) em um ensaio clínico que comparou a microbiota intestinal de 42 indivíduos sendo 22 com FC e 20 controles. Os achados mostraram uma redução significativa na quantidade de bactérias como a *E. rectale*, em pacientes com FC, ao contrário da bactéria *F. prausnitzii* que estava elevada nos controles saudáveis sem FC.

No estudo realizado por Burke et al., (2017), que avaliou a microbiota de adultos com FC, mostrou que a microbiota intestinal de pacientes adultos com FC era significativamente ($p < 0,05$) menos diversificada em comparação com adultos controles (sem FC). Ainda, Fouhy et al., (2017), observou aumento significativo de bactérias patogênicas como *Clostridium clostridioforme* e *Ruminococcus gnavus* ($p = 0,004$) e uma redução significativa de *F. prausnitzii* ($p = 0,003$) no grupo FC adulto quando comparado com controles. As semelhanças entre nossos achados em crianças e adolescentes e os estudos em adultos com FC sugerem que a composição da microbiota intestinal alterada que ocorre em crianças com FC é mantida até a idade adulta em pacientes com FC.

Em uma metanálise com 11 estudos foi encontrado uma contagem significativamente menor de *F. prausnitzii* nos pacientes com doença inflamatória intestinal vs. controles. Essa metanálise sugere uma possível ligação entre a redução da concentração de *F. prausnitzii*, o desequilíbrio da microbiota intestinal e a doença inflamatória intestinal (CAO; SHEN; RAN, 2014). As espécies *E. rectale* e *F. prausnitzii* são um membro comum da microbiota intestinal humana produtores de butirato, um ácido graxo de cadeia curta que fornece energia aos colonócitos (JAWETZ et al., 2009; LOUIS; FLINT, 2009; MIQUEL et al., 2013).

Ainda nesse estudo, os pacientes com FC com mutação DF508 homozigota apresentaram alterações significativas nos padrões do microbioma intestinal. Schippa et al., (2013) em um estudo com 36 pacientes com FC, onde 5 pacientes apresentavam

mutação DF508 homozigoto, 19 apresentavam mutação DF508 heterozigoto e 12 pacientes não apresentavam a mutação DF508 em nenhum dos alelos, identificaram que a *E. coli* e a *E. biforme* apresentaram-se prevalente na mutação DF508 homozigoto, ao passo que tanto em pacientes DF508 homozigoto como em pacientes DF508 heterozigoto, foi encontrada redução de espécies bacterianas benéficas, como *F. prausnitzii*.

Os pacientes com FC são em grande parte susceptíveis a infecções respiratórias por *P. aeruginosa*. Quase 30% das crianças menores de um ano de idade com FC podem adquirir as cepas de *P. aeruginosa* do meio ambiente, levando a infecções agudas. Esta taxa atinge cerca de 50% das crianças aos três anos de idade (MORADALI; GHODS; REHM, 2017). Além disso, em pacientes com FC, a insuficiência pancreática pode ser um fator de risco para o prognóstico da doença, e para um estado nutricional inadequado. E ainda, pode estar associada a maior frequência de infecção pulmonar crônica por bactérias patogênicas como *P. aeruginosa* (KESSLER; ABÉLY, 2016).

A presença e os efeitos dessa bactéria na microbiota intestinal de pacientes com FC, ainda não foi claramente estudada, no entanto, em um estudo que avaliou as diferenças na microbiota intestinal entre pacientes com síndrome do intestino irritável e indivíduos saudáveis, concluiu que *P. aeruginosa* foi encontrada com mais frequência e em níveis mais elevados em pacientes com síndrome do intestino irritável do que em indivíduos saudáveis, sugerindo que a *P. aeruginosa* possa estar envolvida na fisiopatologia desta doença e da disbiose intestinal (KERCKHOFFS et al., 2011).

Hoehn et al., 2015 avaliou a colonização microbiana do trato respiratório e intestinal no início da vida em crianças com FC e suas associações com a amamentação e os desfechos clínicos, e encontrou relações entre a exposição ao leite materno, a composição e a diversidade do microbioma intestinal e a saúde respiratória. Estes achados (HOEN et al., 2015) mostraram que um aumento da diversidade da microbiota intestinal esteve associado a períodos prolongados de saúde. O que retardou tanto a primeira colonização respiratória por *P. aeruginosa*, como a primeira exacerbação pulmonar da FC. Os autores sugerem que a microbiota intestinal na FC no início da vida é um determinante para a progressão da doença respiratória e sistêmica, ou seja, conjuntos específicos de bactérias em amostras intestinais, mas não em

amostras respiratórias, foram associados à exacerbação pulmonar da FC no início da vida, indicando que o microbioma intestinal pode ter um papel na saúde pulmonar (HOEN et al., 2015).

O processo inflamatório, portanto, nos pacientes com FC, não se limita somente ao trato respiratório, está presente também no trato gastrointestinal (PARISI et al., 2017). O mecanismo de inflamação intestinal ainda não está bem definido, mas alguns fatores relatados na literatura estão relacionados com o defeito na proteína CFTR, muco viscoso, supercrescimento bacteriano e exposição crônica a antibióticos. A inflamação intestinal é um fator modificável e sua identificação precoce ajuda evitar a má absorção de nutrientes e consequente falha de crescimento (LEE et al., 2012).

No presente estudo, observou-se uma diferença estatisticamente significativa na concentração da CLP fecal, onde o GFC apresentou uma concentração de CLP fecal maior quando comparado com o GC. Ao subdividir o GFC de acordo com a mutação genética, observou-se uma diferença de concentração significativa, onde os GFCDF508-Homo e GFC DF508-Hetero apresentaram uma concentração de CLP fecal maior em relação ao GC. Esses achados foram parecidos com aqueles observados no estudo realizado com 30 crianças com FC, 30 controles saudáveis e 15 pacientes com doença inflamatória intestinal (BRUZZESE et al., 2004). O estudo usou CLP fecal e a produção de óxido nítrico retal para medir a inflamação intestinal. A CLP fecal média nos indivíduos com FC foi de 219 µg/g vs. 46 µg/g no grupo de controle ($p < 0,01$). Este estudo realizou ainda a administração de probiótico *Lactobacillus hamnosus GG* (*L. rhamnosus GG*) em 10 pacientes com FC, uma vez/dia por 4 semanas, os resultados mostraram uma redução significativa na concentração de CLP nas fezes dos pacientes com FC (210 µg/g vs. 140 µg/g nos controles; $p < 0,01$) (BRUZZESE et al., 2004).

Os níveis de CLP fecal diferem em lactentes com FC em comparação com lactentes saudáveis, indicando que um ambiente intestinal alterado está presente desde os primeiros anos de vida, é o que sugere Garg et al., (2017) que avaliou a CLP fecal em crianças de zero a 10 anos com e sem FC e verificou que existe diferença significativa nos níveis de CLP fecal para essa faixa etária ($p = 0,0002$).

A inflamação intestinal é uma característica praticamente constante em pacientes com FC e pode afetar negativamente o

estado nutricional do paciente, o que por sua vez, compromete negativamente a função pulmonar e a sobrevivência (LEE et al., 2012).

Os níveis de CLP fecal têm sido correlacionados negativamente com a estatura e o peso ambos medidos em escore-z nos pacientes com FC, o que significa que a gravidade crescente da inflamação intestinal está associada ao comprometimento do peso e da estatura (GARG; OOI, 2017).

No estudo publicado por Dhaliwal et al. (2015), que avaliou 28 pacientes com FC de zero a 18 anos de idade. A gravidade da inflamação intestinal medida pela CLP fecal foi correlacionada significativamente com menor peso e estatura ambos avaliados em escore-z ($r = -0,5$; $p = 0,003$ e $r = -0,6$; $p = 0,002$ respectivamente).

Devido a sua alta sensibilidade e baixa especificidade a CLP fecal tem sido associada não somente a inflamação intestinal, mas também a outras condições clínicas presente na FC. No estudo de Parisi et al., (2017) que teve como objetivo analisar os níveis de CLP fecal na FC e correlacioná-los com diferentes fenótipos da doença, foi encontrado que, pacientes com insuficiência pancreática, baixo peso, colonização crônica das vias aéreas por *P aeruginosa*, DM relacionada à FC, função pulmonar prejudicada (VF1 <50%), ou elevado número de exacerbações pulmonares tiveram todos, níveis de CLP fecal significativamente mais altos em relação ao GC. O estudo sugere na conclusão que devido a baixa especificidade, os níveis de CLP fecal também estão relacionados a diferentes aspectos da doença genética, podendo ser útil para monitorar longitudinalmente a clínica do paciente com FC (PARISI et al., 2017).

Ellemunter et al., (2017), em um estudo longitudinal, que teve como objetivo avaliar a concentração da CLP fecal por 12 anos em pacientes com FC, concluiu que, dos 177 pacientes avaliados 90% eram insuficientes pancreáticos e apresentaram a mediana de concentração da CLP fecal de 60,9 μ /g fezes. Os pacientes portadores da mutação DF508 homocigoto apresentaram valores medianos de CLP fecal mais elevados do que os pacientes portadores da mutação DF508 heterocigotos (mediana: 71 vs 62 μ /g fezes), da mesma forma que pode ser observado em nosso estudo (mediana: 65,5 vs 58,5 μ /g fezes respectivamente). Neste estudo Ellemunter et al., (2017), também avaliou o tamanho do efeito, porém os resultados não foram clinicamente significativos.

Em indivíduos com doença inflamatória intestinal crônica, concentrações elevadas de CLP fecal estão relacionadas à inflamação intestinal. Se assumirmos que isso também se aplica à FC, os resultados do presente estudo sugerem que a inflamação intestinal está presente nos pacientes com FC que se associadas a disbiose intestinal, podem comprometer o estado nutricional, acarretando em detrimento da função pulmonar, levando a um aumento da morbimortalidade.

9 PONTOS FORTES E LIMITAÇÕES

Consideram-se que são poucas as pesquisas que avaliam a relação dos microrganismos *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* e a CLP fecal em pacientes com FC principalmente naqueles com a mutação DF508, logo isto é um dos pontos fortes desta pesquisa. Ainda, este trabalho poderá contribuir para estudos futuros que possam elucidar a relação da composição da microbiota intestinal e a inflamação intestinal com mutação genética DF508.

Os microrganismos avaliados no presente estudo foram selecionados com base na literatura devido à sua influência na manutenção da saúde intestinal e à relação com a FC, sendo esta uma limitação considerando que a microbiota dessa população não foi avaliada globalmente, além de ser um estudo transversal, onde só é possível realizações associações, não sendo possível verificar a causalidade dos fatos.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve por objetivo avaliar o a relação entre os microrganismos *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* com a presença da mutação DF508 e a resposta inflamatória intestinal medida pela CLP fecal em crianças e adolescentes com FC.

Os resultados encontrados mostraram que a população com FC apresentou um estado nutricional prejudicado em relação ao GC, e que o GFCDF508-Homo apresentou um estado nutricional mais defasado em relação a todos os outros grupos estudados. A amamentação exclusiva foi prevalente no GFC e o parto vaginal foi prevalente no GC. Em relação ao uso de antibiótico, mais da metade dos grupos de pacientes com FC estavam em uso e cerca 86% dos pacientes com FC eram insuficientes pancreáticos com destaque para o GFCDF508-Homo, todos desse grupo eram insuficientes pancreáticos.

A composição microbiota intestinal em especial os microrganismos *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa*, avaliada pela técnica de *FISH* se mostrou diferente entre os grupos avaliados: GC vs GFC, GC vs GFCDF508-Homo e GC vs GFCDF508-Hetero, revelando que o fato de ter FC pode exercer influência sobre a composição da microbiota intestinal principalmente na presença da mutação DF50-Homo. Pois no GFCDF508-Homo houve uma menor concentração para os microrganismos *E. rectale*, *F. prausnitzii* e maior concentração para a *P. aeruginosa*. Observou-se ainda, que a inflamação intestinal está presente em pacientes com FC e que a mutação DF508-Homo pode exercer uma maior influência sobre o aumento na concentração de CLP fecal nos pacientes com FC em relação aos demais grupos. A *P. aeruginosa* é um microrganismo amplamente estudado na microbiota respiratória, porém a sua presença em concentração elevada na microbiota intestinal necessita de mais estudos principalmente para entender os mecanismos de colonização no intestino e suas consequências.

Os microrganismos avaliados nesse estudo foram selecionados com base na literatura devido à sua influência na manutenção da saúde intestinal e à relação com a FC, sendo esta uma limitação considerando que a microbiota dessa população não foi avaliada para todos os demais microrganismos.

10 CONCLUSÃO

- O estado nutricional avaliado pelos indicadores z-IMC/I, z-P/I e z-E/I, mostrou que os pacientes com FC apresentam menor escore-z de IMC/I e P/I, principalmente naqueles que apresentam a mutação DF508-Homo;
- Observou-se que o GFCDF508-Homo apresentou o menor z-IMC/I, z-P/I, S-K score e VEF₁. E todos deste grupo eram insuficientes pancreáticos;
- A concentração dos microrganismos *E. rectale* e *F. prausnitzii* estavam significativamente reduzidos no GFC principalmente no GFCDF508-Homo enquanto que o microrganismo *P. aeruginosa* estava significativamente aumentada no FC principalmente no GFCDF508-Homo;
- Em relação a bactéria *F. prausnitzii*, considerada importante para a integridade da saúde intestinal observou-se que a sua concentração estava próxima de zero no GFCDF508-Homo;
- A inflamação intestinal medida pela CLP fecal apresentou-se elevada no GFC principalmente naqueles que apresentaram a mutação DF508-Homo, reforçando que a inflamação intestinal é uma enfermidade prevalente nesses pacientes;
- Ainda, a CLP fecal apresentou maior concentração no GFCDF508-Homo, mesmo grupo que apresentou pior z-IMC/I e z-P/I.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIBRAHIM, B.; ALJASSER, M. I.; SALH, B. Fecal calprotectin use in inflammatory bowel disease and beyond: A mini-review. **The Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 157–163, 2015.
- ALMEIDA, L. et al. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 24, n. 1, p. 58–65, 2008.
- ARRIETA, M.-C. et al. The intestinal microbiome in early life: health and disease. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. September, p. 1–18, 2014.
- ARRIETA, M.-C. et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 307, p. 1–14, 2015.
- ARVONEN, M. et al. Gut microbiota-host interactions and juvenile idiopathic arthritis. **Pediatric Rheumatology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2016.
- ASSIS, D. N.; FREEDMAN, S. D. Gastro intestinal Disorders in Cystic Fibrosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 37, n. 1, p. 109–118, 2016.
- BAKHTIAR, S. M. et al. Implications of the human microbiome in inflammatory bowel diseases. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 342, n. 1, p. 10–17, 2013.
- BELL, S. C.; DE BOECK, K.; AMARAL, M. D. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 145, p. 19–34, 2015.
- BLACKMAN, S. M.; TANGPRICHA, V. Endocrine Disorders in Cystic Fibrosis Diabetes Osteoporosis Short stature Hypogonadism Hypoglycemia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 63, p. 699–708, 2016.
- BOROWITZ, D.; GELFOND, D. Gastrointestinal complications of cystic fibrosis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 4, p. 333–342, 2013.
- BRANDT, K. et al. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 67, n. 2, p. 113–123, 2012.
- BRESSLER, B. et al. Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease. **Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 29, n. 7, p. 369–372, 2015.
- BREWINGTON, J.; CLANCY, J. P. Diagnostic testing in cystic

- fibrosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 37, n. 1, p. 31–46, 2016.
- BRUZZESE, E. et al. Intestinal inflammation is a frequent feature of cystic fibrosis and is reduced by probiotic administration. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, n. 7, p. 813–819, 2004.
- BRUZZESE, E. et al. Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with lactobacillus gg: A randomised clinical trial. **Public Library of Science ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–12, 2014.
- BURKE, D. G. et al. The altered gut microbiota in adults with cystic fibrosis. **BioMed Central Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2017.
- CALELLA, P. et al. Association between body composition and pulmonary function in children and young people with cystic fibrosis. **Nutrition**, v. 48, p. 73–76, 2018.
- CALVO-LERMA, J. et al. Nutritional status , nutrient intake and use of enzyme supplements in paediatric patients with cystic fibrosis ; a European multicentre study with reference to current guidelines. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 16, n. 4, p. 510–518, 2017.
- CANT, N.; POLLOCK, N.; FORD, R. C. CFTR structure and cystic fibrosis. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 52, p. 15–25, 2014.
- CAO, Y.; SHEN, J.; RAN, Z. H. Association between faecalibacterium prausnitzii reduction and inflammatory bowel disease : A meta-analysis and systematic review of the literature. **Gastroenterology Research and Practice**, p. 1–7, 2014.
- CASTELLANI, C. et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 7, n. 3, p. 179–196, 2008.
- COCKBURN, D. W. et al. Molecular details of a starch utilization pathway in the human gut symbiont Eubacterium rectale. **Molecular Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 734–764, 2015.
- COHEN, J. A power prime. **Psychological Bulletin**, v. 112, n. 1, p. 155–159, 1992.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural Funcional - Robbins**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000.
- CFMD - Cystic Fibrosis Mutation Database**. Disponível em: <<http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html>>. Acesso em: 1 ago. 2018.

- DAVIES, J.; ALTON, E.; BUSH, A. Cystic fibrosis. **Clinical Review**, v. 335, p. 1255–1259, 2007.
- DE LISLE, R. C.; BOROWITZ, D. The cystic fibrosis intestine. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 9, p. 1–17, 2013.
- DEBYSER, G. et al. Faecal proteomics: A tool to investigate dysbiosis and inflammation in patients with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society**, p. 1–9, 2015.
- DEL CAMPO, R. et al. Improvement of digestive health and reduction in proteobacterial populations in the gut microbiota of cystic fibrosis patients using a *Lactobacillus reuteri* probiotic preparation: A double blind prospective study. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 13, n. 6, p. 716–722, 2014.
- DHALIWAL, J. et al. Intestinal inflammation and impact on growth in children with cystic fibrosis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 521–526, 2015.
- DORÉ, J.; CORTHER, G. The human intestinal microbiota. **Gastroenterologie Clinique et Biologique**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. S7–S15, 2010.
- DOULL, I. Recent advances in cystic fibrosis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 85, n. 1, p. 62–66, 2001.
- DUYTSCHAEVER, G. et al. Cross-sectional and longitudinal comparisons of the predominant fecal microbiota compositions of a group of pediatric patients with cystic fibrosis and their healthy siblings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 8015–8024, 2011.
- DUYTSCHAEVER, G. et al. Dysbiosis of bifidobacteria and *Clostridium* cluster XIVa in the cystic fibrosis fecal microbiota. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 12, n. 3, p. 206–215, 2013.
- EGAN, M. E. Genetics of cystic fibrosis. clinical implications. **Clinics in Chest Medicine**, v. 37, n. 1, p. 9–16, 2016.
- ELBORN, J. S. Cystic fibrosis. **The Lancet**, v. 388, n. 10059, p. 2519–2531, 2016.
- ELLEMUNTER, H. et al. Fecal calprotectin in cystic fibrosis and its relation to disease parameters: A longitudinal analysis for 12 years. **Pancreatology**, v. 65, n. 4, p. 438–442, 2017.
- ENDO, A. et al. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota from the 2nd week to 13 years of age. **Anaerobe**, v. 28, p. 149–156, 2014.
- FAGERBERG, U. L. et al. Fecal calprotectin levels in healthy

children studied with an improved assay. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 37, n. October, p. 468–472, 2003.

FOUHY, F. et al. A pilot study demonstrating the altered gut microbiota functionality in stable adults with Cystic Fibrosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

FREITAS, M. B. DE et al. Altered intestinal microbiota composition, antibiotic therapy and intestinal inflammation in children and adolescents with cystic fibrosis. **Public Library of Science ONE**, v. 6, n. 13, p. 1–14, 2018.

GAŁĘCKA, M. et al. Faecalibacterium prausnitzii and crohn's disease - Is there any connection? **Polish Journal of Microbiology**, v. 62, n. July, p. 91–95, 2013.

GARCIA, M. A. S.; YANG, N.; QUINTON, P. M. Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator – dependent bicarbonate secretion. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 9, p. 2613–2622, 2009.

GARG, M. et al. Age-dependent variation of fecal calprotectin in cystic fibrosis and healthy children. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 16, n. 5, p. 631–636, 2017.

GARG, M.; OOI, C. Y. The enigmatic gut in cystic fibrosis: Linking inflammation, dysbiosis, and the increased risk of malignancy. **Current Gastroenterology Reports**, v. 19, n. 2, p. 1–8, 2017.

GASPAR, M. C. et al. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: A review. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 10, p. 1231–1252, 2013.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. Pseudomonas aeruginosa: New insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159–173, 2013.

GERRITSEN, J. et al. Intestinal microbiota in human health and disease: The impact of probiotics. **Genes and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 209–240, 2011.

GILLIGAN, P. H. et al. **Cumitech 43: Cystic Fibrosis Microbiology**. Coordinati ed. Washington: [s.n.].

GOULET, O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. S1, p. 32–40, 2015.

GUINANE, C. M.; COTTER, P. D. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden

- metabolic organ. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 4, p. 295–308, 2013.
- HAMOSH, A. et al. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. **The Journal of Pediatrics**, v. 132, n. 2, p. 255–259, 1998.
- HOEN, A. G. et al. Associations between gut microbial colonization in early life and respiratory outcomes in cystic fibrosis. **The Journal of Pediatrics**, v. 167, n. 1, p. 138–147.e3, 2015.
- HOFFMAN, L. R. et al. Escherichia coli dysbiosis correlates with gastrointestinal dysfunction in children with cystic fibrosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 3, p. 396–399, 2014.
- HØIBY, N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 3, p. 205–211, 2017.
- HØIBY, N. et al. Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 125, n. 4, p. 339–343, 2017.
- HOPKINS, M. J.; SHARP, R.; MACFARLANE, G. T. Variation in human intestinal microbiota with age. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. S12–S18, 2002.
- IDSA, I. D. S. O. A. **Facts about infection disease**. Disponível em: <http://www.idsociety.org/Facts_About_ID/>. Acesso em: 30 maio. 2017.
- JAWETZ, M. et al. **Microbiologia Médica**. 24. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2009.
- JOHN, L. J.; FROMM, M.; AL, J. E. T. Epithelial Barriers in Intestinal Inflammation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 5, p. 1255–1270, 2011.
- KELLY, T.; BUXBAUM, J. Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 1, p. 1903–1913, 2015.
- KERCKHOFFS, P. M. et al. Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of pseudomonas aeruginosa in irritable bowel syndrome. **Journal of Medical Microbiology**, n. 60, p. 236–245, 2011.
- KESSLER, L.; ABÉLY, M. Atteinte pancréatique exocrine et endocrine dans la mucoviscidose Pancreatic infringement exocrine and endocrine in cystic fibrosis. **Archives de Pédiatrie**, v. 23, p. 12S21-12S32, 2016.
- KHAN, M. T. et al. The gut anaerobe Faecalibacterium prausnitzii

uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic – anoxic interphases. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 6, n. 8, p. 1578–1585, 2012.

KING, S. J. et al. Fat-free mass depletion in cystic fibrosis: Associated with lung disease severity but poorly detected by body mass index. **Nutrition**, v. 26, n. 7–8, p. 753–759, 2010.

LEE, J. M. et al. Update of Faecal Markers of Inflammation in Children with Cystic Fibrosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

LI, L.; KRAUSE, L.; SOMERSET, S. Associations between micronutrient intakes and gut microbiota in a group of adults with cystic fibrosis. **Clinical Nutrition**, p. 1–8, 2016.

LI, L.; SOMERSET, S. The clinical significance of the gut microbiota in cystic fibrosis and the potential for dietary therapies. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 4, p. 571–580, 2014a.

LI, L.; SOMERSET, S. Digestive system dysfunction in cystic fibrosis: Challenges for nutrition therapy. **Digestive and Liver Disease**, v. 46, n. 10, p. 865–874, 2014b.

LIN, J. et al. Meta-analysis : Fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 20, n. 8, p. 1407–1015, 2014.

LISLE, R. C. DE. Disrupted tight junctions in the small intestine of cystic fibrosis mice. **Cell and Tissue Research**, v. 355, n. 1, p. 131–142, 2015.

LISLE, R. C. DE; MUELLER, R.; BOYD, M. Impaired mucosal barrier function in the small intestine of the cystic fibrosis mouse. **Journal Pediatric Gastroenterology Nutrition**, v. 53, n. 4, p. 371–379, 2012.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 294, n. 1, p. 1–8, 2009.

LYNCH, S. V et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice exhibit aberrant gastrointestinal microbiota. **Gut Microbes**, v. 4, n. 1, p. 41–47, 2013.

MACBETH, G.; RAZUMIEJCZYK, E.; LEDESMA, R. D. Cliff ' s Delta Calculator: A non-parametric effect size program for two groups of observations *. **Universitas Psychologica**, v. 10, n. 2, p. 545–556, 2011.

MACKENZIE, I. E. R. et al. Modeling cystic fi brosis disease progression in patients with the rare CFTR mutation P67L. **Journal**

of Cystic Fibrosis, v. 16, n. 3, p. 335–341, 2017.

MADAN, J. C. Neonatal Gastrointestinal and Respiratory Microbiome in Cystic Fibrosis: Potential Interactions and Implications for Systemic Health. **Clinical Therapeutics**, v. 8, n. 5, p. 583–592, 2016.

MAHOWALD, M. A. et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 14, p. 5859–5864, 2009.

MÄKIVUOKKO, H. et al. Association between the ABO blood group and the human intestinal microbiota composition. **BioMedCentral Microbiology**, v. 12, p. 94, 2012.

MANOR, O. et al. Metagenomic evidence for taxonomic dysbiosis and functional imbalance in the gastrointestinal tracts of children with cystic fibrosis. **Nature Publishing Group**, n. February, p. 1–9, 2016.

MARKOU, P.; APIDIANAKIS, Y. Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. January, p. 1–5, 2014.

MARSON, F. A. DE L. et al. Demographic, clinical, and laboratory parameters of cystic fibrosis during the last two decades: a comparative analysis. **BioMedCentral Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 1–12, 2015.

MASSIE, J.; ROBINSON, P. J.; COOPER, P. J. The story of cystic fibrosis 1965 – 2015 transformation of cystic fibrosis care. **Journal of Paediatrics and Child Health**, n. June, p. 3–6, 2016.

MIQUEL, S. et al. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 255–261, 2013.

MIQUEL, S. et al. Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of faecalibacterium prausnitzii. **American Society for Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2015.

MIRAGOLI, F. et al. Impact of cystic fibrosis disease on archaea and bacteria composition of gut microbiota. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v. 93, n. 2, p. 1–13, 2017.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1–29, 2017.

- MUNCK, A. Cystic fibrosis: Evidence for gut inflammation. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 52, p. 180–183, 2014.
- O’SULLIVAN, B. P.; FREEDMAN, S. D. Cystic fibrosis. **The Lancet**, v. 373, n. 9678, p. 1891–1904, 2009.
- OLAFSDOTTIR, E. et al. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. **Acta Paediatrica**, v. 91, n. 12, p. 45–50, 2002.
- PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **Public Library of Science Biology**, v. 5, n. 7, p. 1556–1573, 2007.
- PANAGOPOULOU, P. et al. Prevalence of malnutrition and obesity among cystic fibrosis patients. **Pediatrics International**, v. 56, p. 89–94, 2014.
- PARISI, G. F. et al. Severe disease in Cystic Fibrosis and fecal calprotectin levels. **Immunobiology**, v. 222, n. 3, p. 582–586, 2017.
- PELLEGRINO, R. et al. Interpretative strategies for lung function tests. **European Respiratory Journal**, v. 26, n. 5, p. 948–968, 2005.
- PEUHKURI, K.; VAPAATALO, H.; KORPELA, R. Even low-grade inflammation impacts on small intestinal function. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 9, p. 1057–1062, 2010.
- PISI, G.; CHETTA, A. Airway clearance therapy in cystic fibrosis patients. **Acta Biomedica**, v. 80, n. 2, p. 102–106, 2009.
- PRANKE, I. M.; SERMET-GAUDELUS, I. The international journal of biochemistry biosynthesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 52, p. 26–38, 2014.
- QUAIL, M. A. et al. Faecal calprotectin complements routine laboratory investigations in diagnosing childhood inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, n. 5, p. 756–759, maio 2009.
- QUÉVRAIN, E. et al. Identification of an anti-inflammatory protein from faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in crohn’s disease. **Health & Human Services Public Access**, v. 25, n. 3, p. 1–26, 2017.
- RAJILIC-STOJANOVIC, M.; VOS, W. M. DE. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, p. 996–1047, 2014.

- RASKIN, S. et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 7, n. 1, p. 15–22, 2008.
- ROBLES-ALONSO, V.; GUARNER, F. Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. **Nutricion Hospitalaria**, v. 28, n. 3, p. 553–557, 2013.
- RODRIGUEZ, J. M. et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, p. 1–17, 2015.
- ROMANO, J. et al. **Exploring methods for evaluating group differences on the NSSE and other surveys: Are the t-test and Cohen's d indices the most appropriate choices?** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.coedu.usf.edu/main/>>.
- ROSA, F. R. et al. Fibrose cística: Uma abordagem clínica e nutricional. **Revista de Nutricao**, v. 21, n. 6, p. 725–737, 2008.
- ROSENSTEIN, B.; CUTTING, G. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. **The Journal of pediatrics**, p. 589–595, 1998.
- SANDS, D.; UMŁAWSKA, W.; ZIELIŃSKA, A. A cross-sectional study of growth, nutritional status and body proportions in children and adolescents at a medical center specializing in the treatment of cystic fibrosis in Poland. **Archive Medicine Scienci**, v. 11, n. 1, p. 155–163, 2015.
- SANTOS, C. DE S.; STEEMBURGO, T. Nutritional status and dietary factors in cystic fibrosis patients with delta F508 mutation. **Revista de Nutrição**, v. 28, n. 4, p. 359–369, 2015.
- SATHE, M. N.; FREEMAN, A. J. Gastrointestinal, pancreatic, and hepatobiliary manifestations of cystic fibrosis. **Pediatric Clinics of North America**, v. 63, n. 4, p. 679–698, 2016.
- SCHIPPA, S. et al. Cystic fibrosis Transmembrane conductance regulator (CFTR) allelic variants relate to shifts in faecal microbiota of cystic fibrosis patients. **Public Library of Science ONE**, v. 8, n. 4, 2013.
- SHEIKH, S. et al. Body Composition and Pulmonary Function in Cystic Fibrosis. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, n. April, p. 1–7, 2014.
- SHWACHMAN, H.; KULCZYCKI, L. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis: Studies made over a five-to fourteen-year period. **American Medical Association - Journal of Diseases of Children**, v. 96, n. 1, p. 6–15, 1 jul. 1958.

- SIH, T. et al. Cystic Fibrosis: Brazilian ENT Experience. **International Journal of Otolaryngology**, v. 2012, p. 1–7, 2012.
- SILVA FILHO, L. V. R. F.; CASTAÑOS, C.; RUIZ, H. H. Cystic fibrosis in Latin America-Improving the awareness. **Journal of Cystic Fibrosis**, p. 5–7, 2016.
- SILVA FILHO, L. V. R. F. DA et al. **Registro Brasileiro de Fibrose Cística**. Disponível em: <<http://portalgbefc.org.br/relatorios-anuais-rebrafc/>>. Acesso em: 1 jul. 2018.
- SOKOL, H. et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, PNAS.**, v. 105, n. 43, 2008.
- SOLOMON, M.; BOZIC, M.; MASCARENHAS, M. R. Nutritional Issues in Cystic Fibrosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 37, n. 1, p. 97–107, 2016.
- SPOONHOWER, K. A.; DAVIS, P. B. Epidemiology of Cystic Fibrosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 37, n. 1, p. 1–8, 2016.
- SWIDSINSKI, A. et al. Biostructure of Fecal Microbiota in Healthy Subjects and Patients With Chronic Idiopathic Diarrhea. **Gastroenterology**, v. 135, n. 2, p. 568–579, 2008.
- TADDEI, C. R. et al. High abundance of Escherichia during the establishment of fecal microbiota in Brazilian children. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 3, p. 624–634, 2014.
- TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; RAUTONEN, N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 107–116, 2010.
- TOJO, R. et al. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 41, p. 15163–15176, 2014.
- TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.
- VALENZA, G. et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* as intestinal colonizer in the community. **Infectious Diseases**, v. 47, n. 9, p. 654–657, 2015.
- WELSH, M. J.; SMITH, A. E. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. **Cell**, v. 73, p. 1251–1254, 1993.
- WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry.

Report of a WHO Expert Committee. In: **World Health Organization Technical Report Series**. WHO Expert ed. [s.l: s.n.], v. 854p. 1–452.

WHO, G. M. G. R. S. **WHO child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development**. World Health Organization Geneva, 2006.

Disponível em: <<http://hpps.kbsplit.hr/hpps-2008/pdf/dok03.pdf>>

WHO, W. H. O. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organisation**, v. 85, n. 10, p. 812–819, 2007.

WIĘCEK, S. et al. The concentration of calprotectin in the stools of children with diagnosed cystic fibrosis. **Gastroenterology Review**, v. 12, n. 1, p. 38–43, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do estudo: Efeito da suplementação com um simbiótico sobre marcadores da resposta inflamatória de crianças e adolescentes com fibrose cística

Senhores Pais:

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

Eu, _____ confirmo que Maiara Brusco de Freitas e/ou Camila Tomio discutiram comigo este estudo.

1. Caracterizar a microbiota intestinal e associar com marcador inflamatório intestinal (calprotectina), de crianças com e sem o diagnóstico de Fibrose Cística (FC).
2. A participação do paciente é muito importante, porque permitirá caracterizar a microbiota intestinal e associar com os marcadores inflamatórios intestinais, e avaliar se existe ou não relação com o estado nutricional. O pesquisador irá examinar e utilizar dados do prontuário, avaliar o estado nutricional e analisar exames de fezes.
3. Por não necessitar de técnica invasiva para a coleta de dados, os riscos da pesquisa serão mínimos ou até nulos, podendo haver apenas algum desconforto para realização da antropometria:
 - a) Os dados antropométricos como peso, altura, perímetro cefálico e perímetro torácico será realizado pelo

pesquisador. Tais medidas podem gerar algum desconforto durante a coleta, se necessitar de uma pausa ou interrupção, o participante tem toda a liberdade para fazê-la.

- b) A coleta da amostra de fezes será realizada no dia da consulta, conforme rotina já estabelecida pelo hospital com material apropriado fornecido pelo pesquisador. Com essa amostra de fezes será realizada a avaliação de marcadores inflamatórios intestinais e caracterização da microbiota intestinal, não sendo necessários desta forma, procedimentos invasivos.

4. A decisão para participar ou não da pesquisa é livre. Isto não implicará em quaisquer prejuízos pessoais ou no atendimento de seu filho (a). Além disto, em qualquer momento, ou por qualquer motivo, o participante é livre para desistir de participar da pesquisa.

5. É garantido sigilo absoluto e privacidade referente às informações do participante e/ou responsável. Somente as pessoas diretamente relacionadas à pesquisa terão acesso aos dados e todas as informações serão mantidas em sigilo e somente serão utilizados para este estudo.

6. Fica claro que, o participante não arcará com qualquer investimento financeiro que estiver relacionado com a realização da pesquisa.

7. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, entrar em contato com Maiara Brusco de Freitas pelo telefone: (48) 96407160 ou e-mail: maiarabrusco@gmail.com, ou com Camila Tomio pelo telefone: (47) 9105-7979 ou e-mail: camilatomio@hotmail.com, e/ou com a professora responsável Emília Addison Machado Moreira pelo telefone: (48) 99279990 ou e-mail: emilia.moreira@ufsc.br

Declaração de consentimento

Eu, _____,
portador do RG: _____, abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa acima descrita.

Fui devidamente esclarecido pelas pesquisadoras Maiara Brusco de Freitas e Camila Tomio sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento, sem que isto acarrete em qualquer prejuízo.

Florianópolis, ___/___/_____.

Assinatura do participante

Assinatura da pesquisadora

Declaração de assentimento de participação do sujeito

Eu, _____, RG _____,
CPF _____ abaixo assinado, responsável pelo paciente
_____ concordo em que o
mesmo participe do presente estudo como sujeito. Fui devidamente
informado e esclarecido sobre a pesquisa, os procedimentos nela
envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes
da participação. Foi-me garantido que posso retirar meu
assentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer
penalidade.

Florianópolis, ___/___/_____.

Assinatura do responsável

Assinatura da pesquisadora

Telefone para contato: _____

DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu, Maiara Brusco de Freitas, portadora do CPF: 06049909954, residente na cidade de Florianópolis e Camila Tomio, portadora do CPF: 05651755993, residente na cidade de São José-SC, comprometemos em ressarcir/indenizar qualquer dano causado ao participante decorrente da pesquisa mencionada neste documento.

Assinatura da pesquisadora: _____

APÊNDICE B: Termo de Assentimento de Participação do Sujeito

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

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar do estudo: Efeito da suplementação com um simbiótico sobre marcadores da resposta inflamatória de crianças e adolescentes com fibrose cística

Eu, _____ confirmo que Maiara Brusco de Freitas e/ou Camila Tomio discutiram comigo este estudo.

1. O objetivo é caracterizar a microbiota intestinal e associar com marcador inflamatório intestinal (calprotectina), de crianças e adolescentes com e sem o diagnóstico de Fibrose Cística (FC).
2. Minha é muito importante, porque permitirá caracterizar a microbiota intestinal e associar com os marcadores inflamatórios intestinais, e avaliar se existe ou não relação com o estado nutricional. O pesquisador irá examinar e utilizar dados do prontuário, avaliar o estado nutricional e analisar exames de fezes.
3. Tenho conhecimento que não haverá coleta de sangue, e os riscos da pesquisa serão mínimos ou até nulos, podendo haver apenas algum desconforto para realização da antropometria:
 - c) Os dados antropométricos como peso, altura, perímetro cefálico e perímetro torácico será realizado pelo pesquisador. Tais medidas podem gerar algum desconforto durante a coleta, se necessitar de uma pausa ou interrupção, o participante tem toda a liberdade para fazê-la.
 - d) A coleta da amostra de fezes será realizada no dia da consulta, conforme rotina já estabelecida pelo hospital com

material apropriado fornecido pelo pesquisador. Com essa amostra de fezes será realizada a avaliação de marcadores inflamatórios intestinais e caracterização da microbiota intestinal, não sendo necessários desta forma, procedimentos invasivos.

4. Sou livre para participar ou não da pesquisa. Isto não implicará em quaisquer prejuízos pessoais ou no atendimento. Além disto, em qualquer momento, ou por qualquer motivo, posso desistir de participar da pesquisa.

5. Estou ciente de que meu nome não será divulgado e que somente as pessoas diretamente relacionadas à pesquisa terão acesso aos dados e todas as informações serão mantidas em sigilo e somente serão utilizados para este estudo.

6. Entendi que não precisarei arcar com qualquer investimento financeiro que estiver relacionado com a realização da pesquisa.

7. E que se eu tiver qualquer dúvida a respeito da pesquisa, posso entrar em contato com Maiara Brusco de Freitas pelo telefone: (48) 96407160 ou e-mail: maiarabrusco@gmail.com, com Camila Tomio pelo telefone: (47) 9105-7979 ou e-mail: camilatomio@hotmail.com, e/ou com a professora responsável Emília Addison Machado Moreira pelo telefone: (48) 99279990 ou e-mail: emilia.moreira@ufsc.br.

APÊNDICE C: Nota de imprensa

Trata-se dos resultados da dissertação de mestrado intitulada “Relação entre a mutação $\Delta f508$ e os microrganismos *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Pseudomonas aeruginosa* com o marcador inflamatório intestinal calprotectina em crianças e adolescentes com fibrose cística” do Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), elaborada pela mestranda Camila Tomio, sob orientação da docente Dra. Emilia Addison Machado Moreira.

A FC é uma doença de origem genética, resultante de mutações no gene *Cystic Transmembrane Regulator* (CFTR). A mutação mais prevalente é chamada de F508del, DF508 ou $\Delta F508$. Os pacientes com FC apresentam baixa expressão ou funcionalidade da proteína CFTR na membrana apical das células epiteliais, o que afeta o transporte de fluidos e eletrólitos e consequentemente pode levar à produção de um muco desidratado e viscoso. A doença se manifesta em vários órgãos, como as vias aéreas superiores e inferiores, pâncreas, sistema reprodutivo e intestino.

O presente estudo avaliou a relação entre os microrganismos *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* com a presença da mutação DF508 e a resposta inflamatória intestinal medida pela calprotectina fecal (CLP) em crianças e adolescentes com fibrose cística (FC). A população do estudo foi selecionada de uma amostra de conveniência não probabilística de 120 crianças e adolescentes de 0 a 15 anos composta pelos pacientes com fibrose cística e controles (sem fibrose cística) atendidos no ambulatório da fibrose cística e/ou no ambulatório de puericultura do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG) na cidade de Florianópolis – Santa Catarina.

Foi avaliado o estado nutricional (IMC/I, P/I e E/I), microbiota intestinal, a inflamação intestinal (dosagem de calprotectina fecal) e a presença da mutação DF508. A quantificação dos microrganismos intestinais *E. rectale*, *F. prausnitzii* e *P. aeruginosa* foi realizada pela técnica de hibridização fluorescente *in situ*.

Os microrganismos *E. rectale* e *F. prausnitzii* estão diminuídos na população com FC, a importância desses microrganismos se dá pelo fato que os mesmos são importantes

para a manutenção da integridade e saúde intestinal. A bactéria *P. aeruginosa* está aumentada na população com FC principalmente naqueles que possuem a mutação DF508 homocigoto, e está relacionada com disbiose e a inflamação intestinal.

Os resultados desse estudo mostraram que pacientes com FC têm a microbiota intestinal diferente tanto na composição de microrganismos, como na concentração de CLP fecal em relação a pacientes que não apresentam a doença. Esses resultados estão de acordo com os achados na literatura. Dessa forma, destaca-se a importância de futuros estudos, que avaliem esses efeitos para atenuar os danos pulmonares e gastrointestinais e, conseqüentemente manter o estado nutricional.

Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Nutrição - Universidade Federal de Santa Catarina. Mestranda Camila Tomio - Orientadora: Dra. Emilia Addison Machado Moreira. Financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 471197/2013-0.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética Hospital infantil Joana de Gusmão



Hospital Infantil Joana de Gusmão
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER 018/2015

NOME DO PROJETO: Efeito da suplementação com um simbiótico sobre marcadores da resposta inflamatória de crianças e adolescentes com fibrose cística.	
PESQUISADORA E ORIENTADORA: Emília Addison Machado Moreira	
DEMAIS PESQUISADORES: Yara Maria Franco Moreno, Tânia Sílvia Fróde, Maiara Brusco de Freitas, Leticia Cristina Radin Pereira, Eliana Barbosa, Norberto Ludwig Neto, Camila Tomio.	
INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL: HIJG	
DATA DO PARECER: 06.09.2012	REGISTRO NO CEP: 022/2012
GRUPO E ÁREA TEMÁTICA: III – 4.05	

O presente Parecer Consubstanciado refere-se à análise de proposta de Emenda ao Projeto Original cadastrado no CEP-HIJG sob número 022/2012, com título acima referido, e aprovado em 06/09/2012 (Parecer 029/2012)

SUMÁRIO DO PROJETO

O objetivo do estudo é avaliar o efeito da suplementação com simbiótico sobre os marcadores da resposta inflamatória (IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-17A, TGF- β , TNF- α e INF- γ) de crianças e adolescentes com fibrose cística. Trata-se de um ensaio clínico prospectivo, randomizado, controlado por placebo. A amostra será constituída por 50 crianças e adolescentes, de ambos os sexos, com diagnóstico de FC, distribuídos em dois grupos: grupo suplementado com simbiótico (GS-Simbiótico) e o grupo suplementado com maltodextrina (GS-Placebo). A suplementação oferecida de simbiótico e maltodextrina será de 6 gramas cada pelo período de 90 dias. A resposta inflamatória será avaliada pelos marcadores IL-1 β , IL-8 e TGF- β utilizando o ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- α e INF- γ por citometria de fluxo. Será realizada uma avaliação clínica (função pulmonar, número de episódios infecciosos e hábito intestinal) e nutricional por meio da antropometria de acordo com a *World Health Organization* (WHO) (1995). Também serão retirados dados do prontuário dos pacientes. Terão acesso a estas informações somente os pesquisadores. Os

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

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

pacientes não serão identificados, participando da pesquisa somente aqueles que aceitarem e assinarem o TCLE.

JUSTIFICATIVA

A principal causa da lesão pulmonar na FC é a inflamação persistente, é essencial o entendimento da resposta inflamatória nesta doença. Alguns estudos têm mostrado alguns efeitos da utilização de probióticos em pacientes com FC, como a diminuição de alguns marcadores inflamatórios, redução da exacerbação pulmonar e melhora da função intestinal. Este estudo visa investigar o efeito da suplementação com simbiótico sobre os marcadores da resposta inflamatória (IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-17A, TGF- β , TNF- α e INF- γ) no sangue periférico de crianças e adolescentes com fibrose cística pré e pós-suplementação. Acredita-se que a suplementação possa desempenhar possível ação adjuvante no processo terapêutico global.

PROPÓSITOS DA EMENDA E ANÁLISE

1. Inclusão de pesquisador: solicitação da inclusão da Nutricionista e Aluna Especial do programa de Pós-graduação em Nutrição Camila Tomio.

ANÁLISE: Solicitação aceita.

2. Extensão do prazo de coleta de dados até dezembro de 2016.

ANÁLISE: Solicitação aceita.

3. Solicitação de novas avaliações: solicitação da inclusão ao protocolo de estudo original da inclusão da coleta de fezes para realização de análises de calprotectina fecal e hibridização fluorescente *in situ* (FISH). O objetivo das análises é avaliar inflamações intestinais e caracterizar a microbiota intestinal. [...] Os participantes que entrarem no estudo, mas não suplementares com o simbiótico ou a maltodextrina não farão coleta de sangue, apenas serão coletadas amostras de fezes.

ANÁLISE: Solicitação aceita.

4. Solicitação da ampliação da faixa etária dos participantes - antes de 6 a 15 anos para: recém-nascidos até 15 anos. Nos menores de 6 anos serão coletadas apenas amostras de fezes e dados antropométricos.

ANÁLISE: Solicitação aceita.

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

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

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

5. Solicitação de inclusão de pacientes sem Fibrose Cística (FC): crianças e adolescentes saudáveis (recém-nascidos até 15 anos de idade) irmãos dos pacientes com FC atendidos no ambulatório da fibrose E PACIENTES DA PUERICULTURA. Desses pacientes serão coletadas amostras de fezes que serão utilizadas para análises de calproectina fecal FISH e dados antropométricos.

ANÁLISE: Solicitação aceita.

6. Nota-se no disposto no Projeto de Emenda, datado de agosto de 2012:

6.1 Na página 15, que os marcadores inflamatórios e a composição da microbiota intestinal serão analisados na UFSC e na *UNIVERSITY OF NAPLE FEDERICO II* (NÁPOLES, ITÁLIA) [...].

ANÁLISE: Solicitação aceita.

6.2 Na página 18, que "o sangue venoso será coletado dos pacientes selecionados após concordância com os critérios do estudo e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e que fizerem a suplementação".

ANÁLISE: Solicitação aceita.

6.3 Na página 19, que "as amostras fecais serão coletadas em frascos apropriados no laboratório do HIJG [...]".

ANÁLISE: Solicitação aceita.

PARECER FINAL

APROVADO

- Informamos que o presente parecer foi analisado e aprovado em reunião deste comitê, na data de 15/10/15.

Pl

Vanessa Borges Platt
Coordenadora do CEP - HIJG

JUCÉLIA MARIA GUEDERT

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - HIJG.

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

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

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

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Efeito da suplementação com um simbiótico sobre os marcadores da resposta inflamatória de crianças e adolescentes com fibrose cística

Pesquisador: Emilia Addison Machado Moreira

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 48959715.2.1001.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.890.133

Apresentação do Projeto:

Estudo que pretende avaliar a suplementação com simbiótico versus maltoxitina em 68 pacientes com fibrose cística. Emenda referente a realização de identificação da flora intestinal por uma pesquisadora em um laboratório italiano, utilizando sondas genéticas.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os autores :

Avaliar o efeito da suplementação com simbiótico sobre os marcadores da resposta inflamatória (IL-1, IL-8, IL-10, IL-17A, TGF- β e INF- γ) de crianças e adolescentes com fibrose cística.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequado, incluindo "As análises bioquímicas causam rápido desconforto ou dor, dependendo da sensibilidade do paciente, no momento da coleta, quando se introduz a agulha."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Podem contribuir para o conhecimento generalizável sobre o tema.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vítor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400

UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.890.133

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pela aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_832671_E1.pdf	10/01/2017 17:10:29		Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	10/01/2017 12:41:06	Emilia Addison Machado Moreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.doc	30/11/2016 14:16:57	Emilia Addison Machado Moreira	Aceito
Outros	Emenda.pdf	30/11/2016 14:14:21	Emilia Addison Machado Moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_bio.pdf	30/11/2016 14:12:32	Emilia Addison Machado Moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tale_bio.pdf	30/11/2016 14:12:07	Emilia Addison Machado Moreira	Aceito
Parecer Anterior	parecer_hijig.pdf	30/11/2016 14:10:36	Emilia Addison Machado Moreira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_instituicoes.pdf	30/11/2016 14:09:51	Emilia Addison Machado Moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_biorrepositorio.pdf	30/11/2016 14:09:05	Emilia Addison Machado Moreira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.890.133

FLORIANOPOLIS, 13 de Janeiro de 2017

Assinado por:
Yimar Correa Neto
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO C - Termo de concessão e aceitação de apoio financeiro a projeto- CNPq.



6021429539246195

TERMO DE ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO A PROPOSTA DE NATUREZA CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E/OU DE INOVAÇÃO

Processo: 471197/2013-0

Título do Projeto: Resposta inflamatória das crianças e adolescentes com fibrose cística suplementadas com simbiótico.

Instituição de Vínculo: Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC-SC

CNPJ: 83899526000182

Instituição de Execução: Universidade Federal de Santa Catarina

CNPJ: 83899526000182

Chamada: Universal 14/2013 - Faixa B - até R\$ 60.000,00

Eu, Emília Addison Machado Moreira , 983.128.808-44, declaro conhecer, concordar e atender integralmente às exigências Nº CPF (ou PASSAPORTE, se estrangeiro) da Chamada acima especificada e às Condições Gerais para Apoio Financeiro que regem a concessão dos recursos especificados abaixo:

AUXÍLIO FINANCEIRO

Custeio: R\$ 41.414,00

Capital: R\$ 2.920,00

Valor Global: R\$ 44.334,00

Tenho ciência:

a) de que o prazo para utilização dos recursos financeiros começa a vigorar a partir da data da assinatura deste Termo de Aceitação, pelo período constante na Chamada correspondente; e

b) das disposições legais e procedimentos para a adequada utilização de recursos financeiros e a correta prestação de contas (Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas).

1. DA CONCESSÃO:

1.1. Ao aceitar o apoio financeiro, o BENEFICIÁRIO declara formalmente:

a) dedicar-se às atividades pertinentes à proposta aprovada;

b) observar o disposto nas Leis nº 8.666/93 e nº 10.973/04, nos Decretos nº 93.872/86 e nº 5.563/05 e na Lei nº 8.112/90, no que couber, bem como os demais instrumentos legais pertinentes;

c) conhecer o Protocolo de Cooperação Técnica firmado entre a instituição de execução do projeto/plano de trabalho e o CNPq, publicado no Diário Oficial da União;

d) conhecer e cumprir as exigências da Chamada à qual a proposta está relacionada, como também as normas do CNPq, ora em validade, relativas à modalidade de apoio financeiro aprovado, ciente que a eventual mudança dessas normas não afeta, altera ou incide sobre o presente documento, exceto quando proposta pelo CNPq e formalmente aceita pelo BENEFICIÁRIO;

e) possuir anuência formal da instituição de execução do projeto/plano de trabalho, seja sob a forma de vínculo empregatício ou funcional ou, na ausência deste, sob a forma de declaração de autoridade institucional competente, segundo modelo disponível na página do CNPq na Internet;

f) dispor das autorizações legais cabíveis de instituições como Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA, Fundação do Nacional do Índio - FUNAI, Comitê de Ética na Pesquisa - CEP, Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, das Comissões de Ética em pesquisa com animais, Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN e outras, no caso em que a natureza do projeto, as

exigir;

g) manter os documentos referidos nas alíneas "e" e "f" em seu poder até cinco anos após a aprovação final das contas do CNPq pelo Tribunal de Contas da União, não sendo necessária sua remessa ao CNPq;

h) ter ciência de que esta declaração é feita sob pena de incidência nos artigos [207-209 do Código Penal Brasileiro](#) sobre a falsificação de documento público e falsidade ideológica, respectivamente; e

i) estar ciente que o prazo para utilização dos recursos financeiros começa a vigorar a partir da data da assinatura do Termo de Aceitação, pelo período constante na Chamada correspondente, devendo ser aplicados exclusivamente para a proposta aprovada.

1.2. O BENEFICIÁRIO compromete-se, ainda, a:

a) responsabilizar-se pela adequada implementação e aplicação dos recursos financeiros aprovados, atendendo aos aspectos normativos definidos para a(s) modalidade(s) concedida(s), podendo estar previsto apenas recursos de capital e custeio, como também recursos para bolsas;

b) utilizar os recursos financeiros em acordo com os critérios e procedimentos estabelecidos no Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas ;

c) assumir todas as obrigações legais decorrentes de contratações eventuais necessárias à consecução do objeto, não tendo tais contratações qualquer vínculo com o CNPq;

d) apresentar, nos prazos que lhe forem determinados, informações ou documentos referentes tanto ao desenvolvimento quanto à conclusão do projeto ou plano de trabalho aprovado;

e) se necessárias, propor alterações ao projeto/plano de trabalho, sujeitas à prévia análise e autorização do CNPq, e de entidade co-financiadora quando for o caso, desde que não se altere o objeto do projeto/plano de trabalho, e não implique remanejamento de despesas entre rubricas (capital para custeio e vice-versa);

f) permitir e facilitar ao CNPq o acesso aos locais de execução do projeto/plano de trabalho, o exame da documentação produzida e a vistoria dos bens adquiridos;

g) apresentar o relatório técnico final das atividades desenvolvidas em até 60 (sessenta) dias após o término da vigência do projeto/plano de trabalho, via Plataforma Carlos Chagas;

h) apresentar a prestação de contas financeira em até 60 (sessenta) dias após o término da vigência do projeto/plano de trabalho, em conformidade com o disposto no Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas, via Plataforma Carlos Chagas; e

i) se necessário, solicitar prorrogação de prazo de execução do projeto/plano de trabalho, via Plataforma Carlos Chagas, no prazo mínimo de 30 (trinta) dias antes do término da vigência.

1.3. É vedado

a) utilizar o recurso financeiro para fins distintos dos aprovados originalmente na proposta, sendo permitidas despesas exclusivamente com itens financeiros estabelecidos nas normas de bolsas e auxílios individuais do CNPq, convênios e/ou Chamadas;

b) transferir a terceiros as obrigações assumidas sem prévia autorização do CNPq;

c) executar despesas em data anterior à vigência do benefício; e

d) efetuar pagamento em data posterior à vigência do benefício, salvo se expressamente autorizado pela autoridade competente do CNPq e desde que o fato gerador da despesa tenha ocorrido durante a vigência do Termo de Aceitação. Despesas realizadas fora do prazo de aplicação dos recursos serão glosadas.

2. DAPROPRIEDADE DOAÇÃO DOS BENS

2.1. O BENEFICIÁRIO e a instituição de execução do projeto responderão pela manutenção do bem em perfeito estado de conservação e funcionamento.

2.2. Em caso de roubo, furto ou outro sinistro envolvendo o bem, o BENEFICIÁRIO ou a instituição de execução do projeto, após a adoção das medidas cabíveis, deverá comunicar imediatamente o fato ao CNPq, por escrito, juntamente com a justificativa e a prova de suas causas, anexando cópia autenticada da Ocorrência Policial, se for o caso.

2.3. É vedada a transferência dos bens para outro local ou estabelecimento, sem prévia e expressa autorização do CNPq. Todas as despesas decorrentes da transferência dos bens e os eventuais danos causados correrão por conta e risco do BENEFICIÁRIO e da instituição de execução do projeto.

2.4. A doação dos bens patrimoniais adquiridos com apoio financeiro do CNPq deverá ser efetuada conforme estabelecido em norma específica e com o disposto no Protocolo de Cooperação Técnica.

3. DAPROPRIEDADE INTELECTUAL / CRIAÇÃO PROTEGIDA

do projeto/plano de trabalho, o ressarcirão das despesas que em decorrência realizar, atualizadas monetariamente.

6.5. O processo somente será encerrado após as aprovações do relatório técnico final e da prestação de contas e desde que cumpridas todas as condições previstas neste instrumento e nas normas aplicáveis.

6.6. O descumprimento de qualquer condição constante deste instrumento e a inobservância de dispositivos legais aplicáveis implicará o encerramento imediato do apoio financeiro aprovado e obrigará o BENEFICIÁRIO a ressarcir integralmente o CNPq de todas as despesas realizadas, atualizadas nos termos da legislação, sem prejuízo da aplicação de penalidades cabíveis.

6.6.1. A recusa ou omissão do BENEFICIÁRIO, quanto ao ressarcimento de que trata este item, ensejará a consequente abertura de tomada de contas especial e a decorrente inscrição do BENEFICIÁRIO e do débito no Cadastro de Inadimplência Institucional - CADIN e do Tesouro Nacional.

6.7. O BENEFICIÁRIO reconhece que ao CNPq compete exercer a autoridade normativa de controle e fiscalização sobre a execução do projeto/plano de trabalho, bem como assumir ou transferir a responsabilidade pela mesma, no caso da paralisação ou de fato relevante que venha a ocorrer, de modo a evitar a descontinuidade das atividades.

7. ACEITE

Declaro ainda que li e aceitei integralmente os termos deste documento, comprometendo-me a cumpri-los fielmente, não podendo, em nenhuma hipótese, deles alegar desconhecimento.

Termo de aceitação registrado eletronicamente por meio da internet junto ao CNPq, pelo agente receptor 10.0.2.22(sv258.cnpq.br), mediante uso de senha pessoal do Beneficiário em 02/12/2013, originário do número IP 200.130.33.73(200.130.33.73) e número de controle 2046705720467057-1122555111-1446400442.

Para visualizar este documento novamente ou o PDF assinado digitalmente, acesse: <http://efomento.cnpq.br/efomento/termo?numeroAcesso=6021429539246195>.

ANEXO D - Escore de Shwachman-Kulczycki.

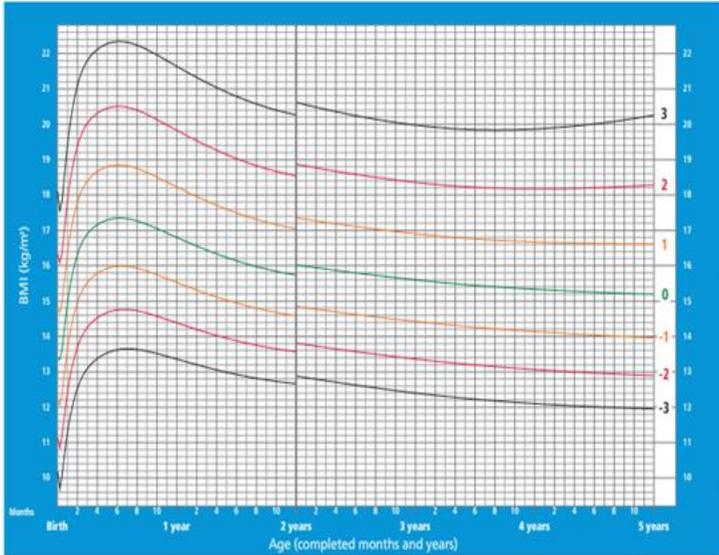
Quadro 3. Representação do escore de Shwachman-Kulczycki para a classificação de gravidade das manifestações clínicas da fibrose cística.

Graduação	Pontos	Atividade geral	Exame físico	Nutrição	Achados radiológicos
Excelente (86-100)	25	Atividade íntega. Brinca, joga bola, vai à escola regularmente	Normal. Não tosse. FC e FR normais. Pulmões livres. Boa postura.	Mantém peso e estatura acima do percentil 25. Fezes bem formadas. Boa musculatura e tônus.	Campos pulmonares limpos.
Bom (71-85)	20	Irritabilidade e cansaço no fim do dia. Boa frequência na escola.	FC e FR normais em repouso. Tosse rara. Pulmões livres. Pouco enfisema.	Peso e altura entre percentis 15 e 20. Fezes discretamente alteradas.	Pequena acentuação da trama vasobrônquica. Enfisema discreto.
Médio (56-70)	15	Necessita repousar durante o dia. Cansaço fácil após exercícios. Diminui a frequência à escola.	Tosse ocasional, às vezes de manhã. FR levemente aumentada. Médio enfisema. Discreto baqueteamento de dedos.	Peso e altura acima do 3º percentil. Fezes anormais, pouco formadas. Distensão abdominal. Hipotrofia muscular.	Enfisema de média intensidade. Aumento da trama vasobrônquica.
Moderado (41-55)	10	Dispneia após pequenas caminhadas. Repouso em grande parte.	Tosse frequente produtiva. Re-tração torácica. Enfisema moderado. Pode haver deformidade do tórax. Baqueteamento 2/3+.	Peso e altura abaixo do 3º percentil. Fezes anormais. Volumosa diminuição da massa muscular.	Moderado enfisema. Áreas de atelectasia. Áreas de infecção discreta. Bronquiectasia.
Grave (40 ou menos)	5	Ortopneia. Confinado ao leito.	Tosse intensa. Períodos de taquipneia e taquicardia e extensas alterações pulmonares. Pode mostrar sinais de falência cardíaca direita. Baqueteamento 3/4+.	Desnutrição intensa. Distensão abdominal. Prolapso retal.	Extensas alterações. Fenômenos obstrutivos. Infecção, atelectasia, bronquiectasia.

ANEXO E – Curvas de crescimento da *World Health Organization* (2006, 2007).

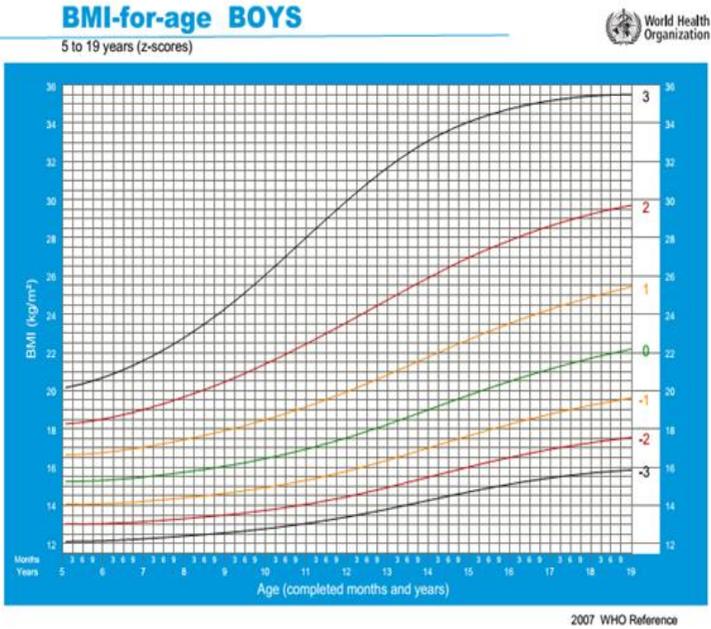
BMI-for-age BOYS

Birth to 5 years (z-scores)



WHO Child Growth Standards

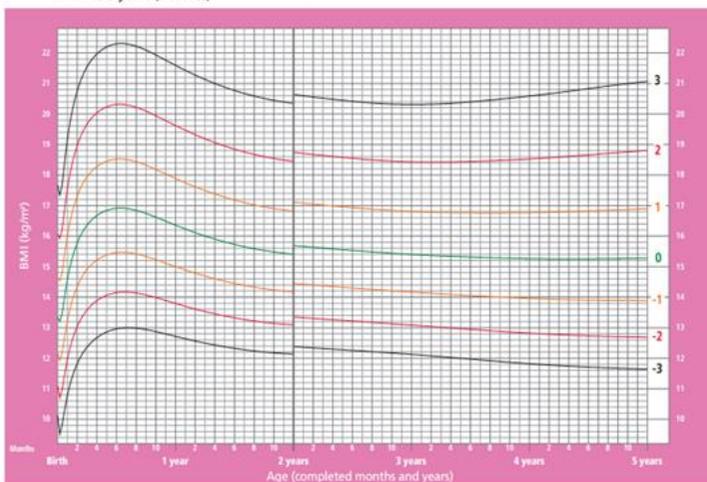
ANEXO F: IMC/I para meninos de 0-5 anos e 5-19 anos.



ANEXO G: IMC/I para meninas de 0-5 anos e 5-19 anos.

BMI-for-age GIRLS

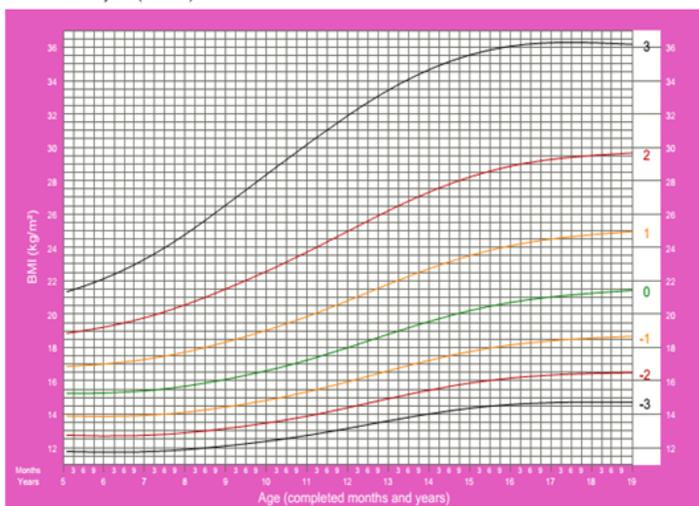
Birth to 5 years (z-scores)



WHO Child Growth Standards

BMI-for-age GIRLS

5 to 19 years (z-scores)

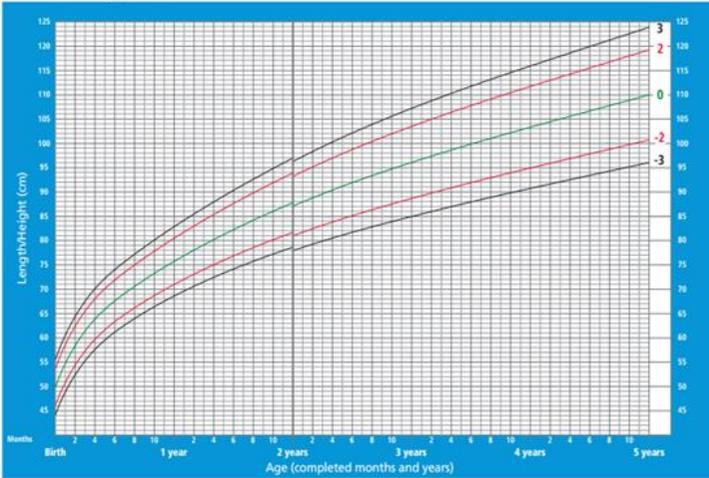


2007 WHO Reference

ANEXO H: E/I para meninos de 0-5 anos e 5-19 anos

Length/height-for-age BOYS

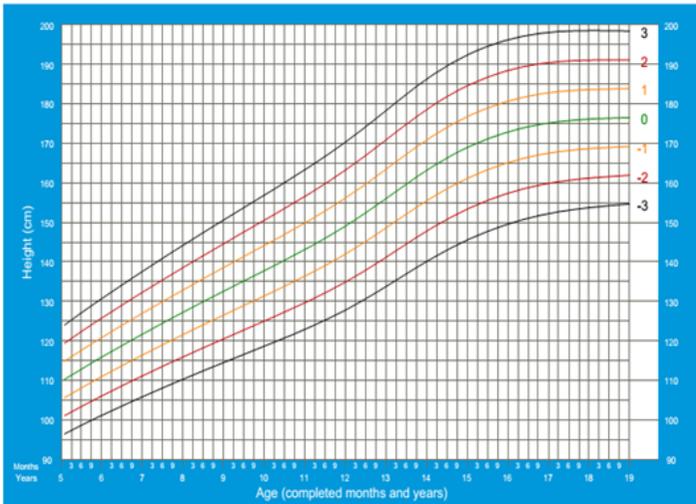
Birth to 5 years (z-scores)



WHO Child Growth Standards

Height-for-age BOYS

5 to 19 years (z-scores)

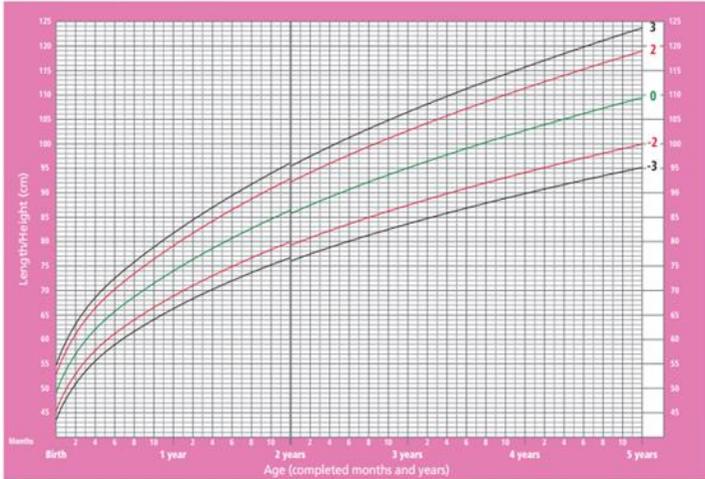


2007 WHO Reference

ANEXO I: E/I para meninas de 0-5 anos e 5-19 anos.

Length/height-for-age GIRLS

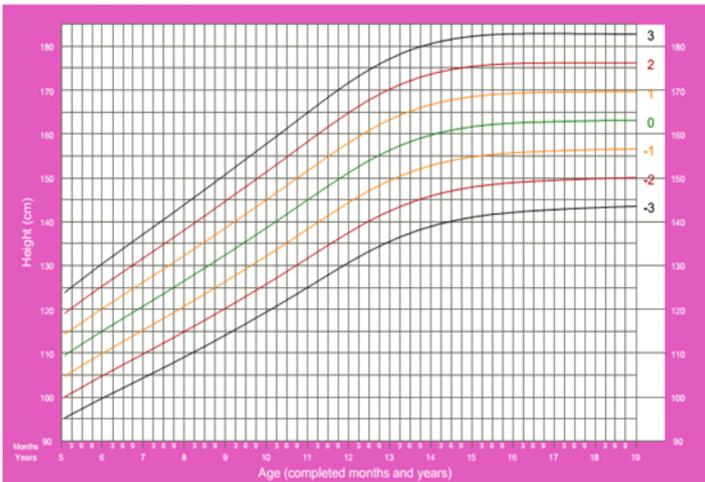
Birth to 5 years (z-scores)



WHO Child Growth Standards

Height-for-age GIRLS

5 to 19 years (z-scores)



2007 WHO Reference