



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDA SAMPAIO LAZZAROTTO RIBEIRO

CALPROTECTINA FECAL E ELASTASE-1 FECAL COMO MARCADORES
INFLAMATÓRIOS INTESTINAIS E DE FUNÇÃO PANCREÁTICA NA FIBROSE
CÍSTICA

CURITIBA

2023

EDUARDA SAMPAIO LAZZAROTTO RIBEIRO

CALPROTECTINA FECAL E ELASTASE-1 FECAL COMO MARCADORES
INFLAMATÓRIOS INTESTINAIS E DE FUNÇÃO PANCREÁTICA NA FIBROSE
CÍSTICA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador(a): Prof.(a). Dr.(a). Nelson Augusto Rosário Filho

CURITIBA

2023

R484 Ribeiro, Eduarda Sampaio Lazzarotto

Calprotectina fecal e elastase-1 fecal como marcadores inflamatórios intestinais e de função pancreática na fibrose cística [recurso eletrônico] / Eduarda Sampaio Lazzarotto Ribeiro. – Curitiba, 2023.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho

1. Fibrose cística. 2. Elastase Pancreática. 3. Inflamação.
I. Rosário Filho, Nelson Augusto. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **EDUARDA SAMPAIO LAZZAROTTO** intitulada: "**AVALIAÇÃO DA CALPROTECTINA FECAL E ELASTASE-1 FECAL COMO MARCADORES INFLAMATÓRIOS INTESTINAIS E DE FUNÇÃO PANCREÁTICA NA FIBROSE CÍSTICA.**", sob orientação do Prof. Dr. NELSON AUGUSTO ROSÁRIO FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de Janeiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

31/01/2023 19:32:48.0

NELSON AUGUSTO ROSÁRIO FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/01/2023 18:34:39.0

CARLOS ANTONIO RIEDI

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA - CHC - UFPR)

Assinatura Eletrônica

06/03/2023 09:51:47.0

ADRIANE CELLI

Avaliador Externo (PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE -UFPR)

ERRATA

1 - ONDE SE LÊ: "EDUARDA SAMPAIO LAZZAROTTO"

LEIA-SE: "EDUARDA SAMPAIO LAZZAROTTO RIBEIRO"

2 - ONDE SE LÊ: "AVALIAÇÃO DA CALPROTECTINA FECAL E ELASTASE-1 FECAL COMO MARCADORES INFLAMATÓRIOS INTESTINAIS E DE FUNÇÃO PANCREÁTICA NA FIBROSE CÍSTICA."

LEIA-SE: "CALPROTECTINA FECAL E ELASTASE-1 FECAL COMO MARCADORES INFLAMATÓRIOS INTESTINAIS E DE FUNÇÃO PANCREÁTICA NA FIBROSE CÍSTICA."



EMILTON LIMA JÚNIOR
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

À Deus, que me sustentou em todo o caminho até aqui. Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me permitido chegar até aqui e fortalecido por todo o percurso, em muitos momentos foi meu refúgio e fortaleza.

Ao meu marido, Gabriel, por seu extenso apoio e paciência em todos os momentos, desde os fáceis até os mais difíceis. Não há nada que me deixe mais feliz do que dividir essa vida com você.

Aos meus pais e minha família, por terem sempre acreditado em mim e me impulsionado a ir mais longe do que eu pensava conseguir. Mãe e pai, se não fosse por vocês não teria feito essa caminhada, agradeço por terem me incentivado a perseguir esse sonho.

Em especial, ao meu avô, Paulo, por ter sido o maior entusiasta e incentivador que esse mundo já viu. Obrigada por acreditar e confiar em mim, você é meu exemplo desde sempre. E meu padrasto, Sergio, suas palavras amorosas sempre trouxeram o conforto necessário para me fazer persistir.

Aos meus amigos e colegas, por todo o apoio nesse período de mestrado. Especialmente à Caroline Guth, Laura Holtman, Elessandra Bitencourt por me acompanharem nessa jornada de estudo, choros, alegrias, conquistas, frustrações. Obrigada por deixarem o caminho mais leve.

A todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo, a causa primária de tudo o que foi desenvolvido aqui.

Ao Dr. Nelson, meu orientador, por todo o suporte e confiança no meu trabalho, além de sua paciência. Ao Dr. Riedi, por ter sempre aconselhado e ensinado tantas coisas valiosas sobre a Fibrose Cística nos dias de ambulatório.

A CAPES pelo apoio financeiro que me permitiu dedicar meu tempo a esse trabalho.

À Prof. Jannaina Vasco, por ter me apresentado este projeto e confiado em mim para tocá-lo. Agradeço a disponibilidade e os ensinamentos. Serei sempre muito grata pela oportunidade de realizar este sonho.

“Pobre criança cuja testa ao beijo é salgada. Está enfeitiçada e logo morrerá”.

Alemanha, século XVIII

RESUMO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética de maior prevalência entre euro descendentes. As mutações afetam o gene *CFTR* que codifica a proteína de mesmo nome, reguladora de água e cloro na membrana celular, ocasionando os sintomas multissistêmicos da doença. Os principais sistemas acometidos são o trato respiratório e gastrointestinal, sendo as inflamações gastrintestinais recorrentes nos pacientes. Neste contexto, testes diagnósticos de inflamação são úteis. Dentre eles, incluem-se Calprotectina fecal e Elastase-1 fecal, marcadores do processo de inflamação intestinal e função pancreática, com alta sensibilidade e especificidade. O objetivo desse estudo foi avaliar os níveis de Calprotectina (CLP) e Elastase-1 fecal em pacientes com FC. Foram coletadas amostras de 35 participantes, diagnosticados com FC e acompanhados em ambulatórios de FC do Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Os pacientes com menos de 4 anos apresentaram níveis alterados de CLP, enquanto os saudáveis apresentaram níveis normais. Os pacientes acima de 4 anos apresentaram níveis mais alterados de CLP em presença de outras manifestações. Não houve significância nas associações entre valores alterados de CLP e manifestações clínicas da doença, bem como uso de antibióticos e enzimas. Os níveis de elastase fecal-1 estavam alterados em 27 de 35 pacientes, sendo apenas um considerado IP moderada. A CLP fecal e EL-1 fecal foram consideradas marcadores importantes na FC para acompanhamento da evolução da doença.

Palavras-chave: Fibrose Cística. Marcadores. Calprotectina fecal. Elastase Pancreática. Inflamação.

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disease with highest prevalence among Euro descendants. The mutations affect the CFTR gene that encodes the protein of the same name, which regulates water and chlorine in the cell membrane, causing the multisystemic symptoms of the disease. The main systems affected are the respiratory and gastrointestinal tract, with recurrent gastrointestinal inflammation in patients. In this context, diagnostic tests for inflammation are useful. These include fecal Calprotectin and fecal Elastase-1, markers of the intestinal inflammation process and pancreatic function, with high sensitivity and specificity. The aim of the present study was to evaluate fecal Calprotectin and Elastase-1 levels in CF patients. Samples were collected from 35 participants, diagnosed with CF and followed up in CF outpatient clinics at the Complexo do Hospital de Clínicas of the Federal University of Paraná. Patients younger than 4 years old had altered levels of CLP, while healthy ones had normal levels. Patients older than 4 years had more altered of CLP levels in the presence of other manifestations. There was no significant association between altered CLP values and clinical manifestations of the disease, as well as the use of antibiotics and enzymes. Fecal elastase-1 levels were altered in 27 out of 35 patients, with only one being considered moderate PI. Fecal CLP and fecal EL-1 were considered relevant markers in CF for monitoring disease progression.

Keywords: Cystic fibrosis. Markers. Fecal calprotectin. Pancreatic elastase. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUTURA DO GENE E DA PROTEÍNA CFTR	21
FIGURA 2 FISIOPATOGÊNIA DA FIBROSE CÍSTICA	22
FIGURA 3 CALPROTECTINA FECAL, DADOS DE PRIMEIRA LEITURA, NOS GRUPOS DE PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO	40
FIGURA 4 HISTOGRAMAS DE SCORE Z DE PESO, ALTURA E IMC	41
FIGURA 5 VALORES DE CALPROTECTINA NAS DIFERENTES LEITURAS EM PACIENTES FIBROSE CÍSTICA	42
FIGURA 6 GRÁFICOS DE DISPERSÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CALPROTECTINA E SCORE Z DE PESO, ESTATURA E IMC	43
FIGURA 7 GRÁFICO DE DISPERSÃO DO SCORE Z DO IMC E CALPROTECTINA FECAL	44
FIGURA 8 NÍVEIS DE CALPROTECTINA EM LEITURAS REPETIDAS PARA PACIENTES ≤ 4 ANOS	48
FIGURA 9 HISTOGRAMAS DE SCORE Z DE PESO, ALTURA E IMC	50
FIGURA 10 NÍVEIS DE CALPROTECTINA EM PACIENTES FIBROSE CÍSTICA MAIORES DE 4 ANOS EM DUAS AVALIAÇÕES	51
FIGURA 11 GRÁFICOS DE DISPERSÃO COM RELAÇÃO A CALPROTECTINA FECAL	51
FIGURA 12 RELAÇÃO ENTRE O SCORE-Z DE IMC E NÍVEIS DE CALPROTECTINA FECAL	52
FIGURA 13 RESULTADOS DE CALPROTECTINA FECAL POR PACIENTE EM 2 LEITURAS: GRUPO > 4 ANOS.	54

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 CLASSIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES NA FIBROSE CÍSTICA	23
QUADRO 2 VALORES DE REFERÊNCIA PARA OS MARCADORES BIOLÓGICOS	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 DADOS DEMOGRÁFICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES E GRUPO CONTROLE.....	38
TABELA 2 SÍNTESE DE RESULTADOS AMOSTRAIS DOS SCORES Z.....	40
TABELA 3 SÍNTESE DE RESULTADOS AMOSTRAIS DA CALPROTECTINA FECAL ($\mu\text{G/G}$).....	41
TABELA 4 RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CALPROTECTINA E ESCORE Z PESO, ESTATURA E IMC EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA.....	44
TABELA 5 NÍVEIS DE CALPROTECTINA EM PACIENTES COM FC E SAUDÁVEIS, GRUPO < 4 ANOS.....	45
TABELA 6 ALTERAÇÃO DA ELASTASE FECAL-1 NOS PACIENTES COM FC E SAUDÁVEIS DIVIDIDA EM NORMAL, MODERADO E GRAVE.....	46
TABELA 7 NÍVEIS DE ELASTASE FECAL-1 EM PACIENTES COM FC E SAUDÁVEIS.....	46
TABELA 8 RELAÇÃO CALPROTECTINA E ELASTASE EM PACIENTES COM FC.....	47
TABELA 9 RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CALPROTECTINA (ALTERADA E NORMAL), USO DE MEDICAÇÕES E PRESENÇA DE SINTOMAS EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA.....	48
Tabela 10 SÍNTESE DE RESULTADOS AMOSTRAIS DOS ESCORES NORMALIZADOS.....	49
TABELA 11 SÍNTESE DE RESULTADOS AMOSTRAIS CALPROTECTINA FECAL EM PACIENTES COM FC.....	50
TABELA 12 CORRELAÇÃO E COEFICIENTES DE REGRESSÃO ENTRE ESCORES Z E CLP FECAL.....	53
TABELA 13 RELAÇÃO DA CALPROTECTINA E ELASTASE PARA PACIENTES COM FC.....	53
TABELA 14 ANÁLISE DE REGRESSÃO PARA AS VARIÁVEIS ELASTASE E CALPROTECTINA, TRATAMENTO, SINTOMAS CLÍNICOS E INTERNAÇÃO.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ATP	– Adenosina trifosfato ou <i>adenosine triphosphate</i>
cAMP	– Adenosina 3', 5'- Monofosfato Cíclico
CFTR	– <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> ou regulador de condutância transmembrana da fibrose cística
CFRD	– <i>Cystic Fibrosis - Related Diabetes</i> ou diabetes relacionada à fibrose cística
Cl ⁻	– Cloreto
CLP	– Calprotectina
DIOS	– Distal Intestinal Obstruction Syndrome
DNA	– Ácido Desoxirribonucléico
EL-1	– Elastase fecal 1
ELISA	– Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FC	– Fibrose Cística
FEPE	– Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional
HCO ₃ ⁻	– Bicarbonato
IP	– Insuficiência Pancreática ou Insuficiente Pancreático
RLU	– Unidades de luz relativa
SP	– Suficiência Pancreática
TER	– Terapia de Reposição Enzimática
PERT	– Pancreatic Enzyme Replacement Therapy

LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

Δ – delta

\geq – maior ou igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 FIBROSE CÍSTICA E AS MANIFESTAÇÕES PANCREÁTICAS E INTESTINAIS 20	
2.2 MANIFESTAÇÕES PANCREÁTICAS	25
2.3 MANIFESTAÇÕES INTESTINAIS.....	27
2.4 MARCADORES BIOLÓGICOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 SUJEITOS.....	31
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	32
3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	32
3.4 OBTENÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	32
3.5 COLETA DAS AMOSTRAS.....	33
3.6 ANÁLISE LABORATORIAL.....	34
3.6.1 Mensuração dos níveis de calprotectina fecal.....	34
3.6.2 Mensuração dos níveis de elastase-1 fecal.....	35
3.7 RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES	35
3.8 CONFIDENCIALIDADE.....	35
3.9 ANÁLISE DOS DADOS.....	36
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	38
4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	38
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4.2.1 PACIENTES ATÉ 4 ANOS	40
4.2.2 PACIENTES MAIS DE 4 ANOS	49
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	62
6.1. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	62

REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE 1–TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	74
APÊNDICE 2 – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	78
APÊNDICE 3 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS DETALHADAS	81
APÊNDICE 4 – DADOS DE COLETAS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO	83

1 INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é uma doença genética de herança autossômica recessiva, multissistêmica, prevalente entre euros descendentes. Sua manifestação acontece em decorrência de alterações no gene *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que codifica uma proteína de mesmo nome, responsável pelo transporte de íons através das membranas celulares (RIBEIRO, RIBEIRO, RIBEIRO, 2002; FIRMIDA, LOPES, 2011). Quando há deficiência na função da proteína, o transporte é prejudicado e há o espessamento das secreções, causando obstrução dos ductos glandulares nas células epiteliais (FIRMIDA, LOPES, 2011; LI, SOMERSET, 2014).

Essa proteína é altamente expressa nas células epiteliais dos pulmões, intestinos, rins, órgãos reprodutores e ductos epiteliais do pâncreas, sendo esta última uma manifestação clínica relevante por causar uma síndrome mal absorptiva, comumente relacionada com a mutação presente (NOONE, 2001; GONZALES, 2010). A insuficiência pancreática (IP) está presente em cerca de 78% dos pacientes fibrocísticos ao nascimento, e em 80 a 85% até o primeiro ano de vida, desencadeando sintomas gastrointestinais secundários (ANDERSEN, 1938; FIRMIDA, MARQUES, COSTA, 2011).

A inflamação intestinal é uma condição presente na FC, comumente relacionada à função pancreática, que está sendo estudada quanto à sua etiologia, visto que os mecanismos não são totalmente esclarecidos (ENAUD *et al.*, 2019). As causas parecem ser variadas, no entanto, contribuem para as manifestações gastrintestinais presentes na doença, sendo que a inflamação contribui para o desequilíbrio da microbiota intestinal (OOI, DURIE, 2016). Assim sendo, realizar o diagnóstico de ambas as condições é importante, pois torna possível verificar a existência de inflamação. (WALKOWIAK *et al.*, 2016; GONZALES, 2010.)

Dentre os testes indicados, está a dosagem de elastase pancreática humana 1 (EL-1), uma protease digestiva humana sintetizada como zimogênio com peso molecular de 28 kDa. Sua síntese é realizada nas células acinares e esta é então secretada no duodeno pelo do ducto pancreático. Apresenta como vantagens a não degradação durante o trânsito intestinal, porque costuma se ligar aos sais biliares, aumentando-se assim sua concentração nas fezes (GONZALES, 2010; TARDELLI *et al.*, 2013). Em adição a isso, trata-se de um teste não invasivo, de coleta simples

e sem necessidade de preparação para transporte da amostra, apresenta alta sensibilidade (90 a 100%) e especificidade (93 a 100%) (RAHMAN, WAHAB, RAHMAN, MOSTAFA, 2006).

A calprotectina (CLP é um marcador de inflamação intestinal, uma proteína encontrada principalmente na superfície de neutrófilos, assim como monócitos e macrófagos. Indutores inflamatórios como citocinas ou produtos bacterianos ativam monócitos e células epiteliais intestinais, estimulam a secreção da calprotectina por essas células, resultando em níveis elevados da mesma nas fezes (GARG, LEACH, COFEEY *et al.*, 2017; LI, MA, GENG *et al.*, 2015).

É uma proteína de ligação de cálcio e de zinco da família calgranulina S100, um heterodímero das 2 proteínas S100A8 e S100A9. Também referida como calgranulina A/B, 14/MRP8, ou como antígeno CF. Quando ligada ao cálcio apresenta alta resistência ao calor, propriedade que a mantém intacta quando eliminada nas fezes (LI, MA, GENG *et al.*, 2015). Trata-se de um marcador importante para a detecção de inflamações nos pacientes fibrocísticos (PARISI *et al.*, 2017; RUMMAN, SULTAN, EL-CHAMMAS, 2014).

Por tal motivo, são marcadores úteis para a análise da existência de inflamação intestinal e insuficiência pancreática nos pacientes, condições relevantes para o estado nutricional gravemente afetado dos pacientes.

1.1 JUSTIFICATIVA

A presente pesquisa é uma análise de dois marcadores biológicos na doença fibrose cística, caracterizada pela inflamação das mucosas, principalmente a intestinal, e a obstrução dos ductos pancreáticos.

Com a análise dos níveis de calprotectina fecal e da elastase-1 fecal é possível acompanhar a condição inflamatória e pancreática, escolhendo e agilizando a estratégia terapêutica apropriada.

Embora sejam marcadores estudados, diferentes resultados foram obtidos em estudos distintos estimulando novas observações para os pesquisadores da área.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Analisar a associação dos níveis da calprotectina fecal e elastase-1 fecal como marcadores de inflamação intestinal e insuficiência pancreática em pacientes com Fibrose Cística.

1.2.2 Objetivos específicos

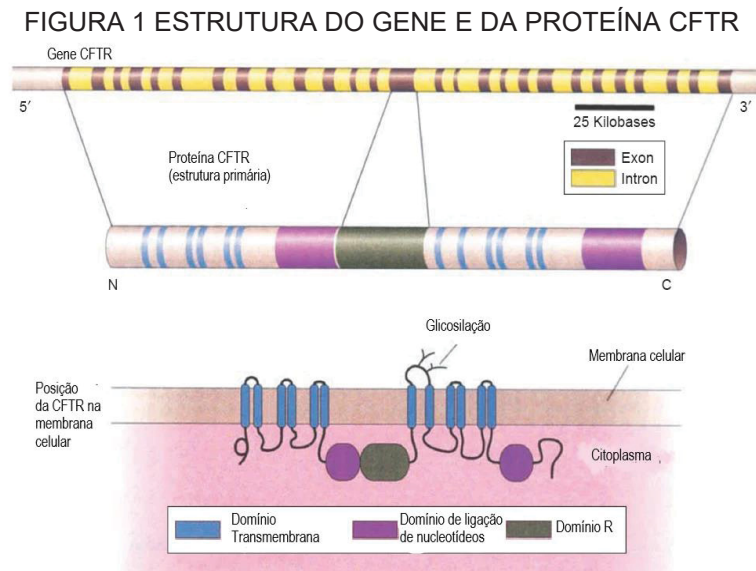
- Determinar os níveis destas moléculas em amostras de fezes correlacionando com as manifestações clínicas dos pacientes com Fibrose Cística;
- Verificar os níveis destes marcadores em pacientes portadores das mutações G542X e $\Delta F508$ no gene *CFTR*;
- Comparar os resultados obtidos de amostras sequenciais de fezes de pacientes no primeiro ano de diagnóstico pelo teste de triagem neonatal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FIBROSE CÍSTICA E AS MANIFESTAÇÕES PANCREÁTICAS E INTESTINAIS

A fibrose cística (FC), ou mucoviscidose, é uma doença multissistêmica causada por alterações genéticas autossômicas recessivas (RIORDAN, J. R.; ROMMENS, J. M.; KEREM, B.S., *et al* , 1989; KEREM, B; ROMMENS, J.M.; BUCHANAN, J.A., *et al*, 1989; FIRMIDA, LOPES, 2011). O gene responsável pela disfunção localiza-se no braço longo do cromossomo 7 (locus 7q31), abrangendo aproximadamente 190 quilobases de DNA (ácido desoxirribonucléico), estando dividido em 27 éxons, sendo chamado CFTR, sigla para condutância transmembrana na fibrose cística (do inglês, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (RIORDAN, J. R.; ROMMENS, J. M.; KEREM, B.S., *et al* , 1989; KEREM, B; ROMMENS, J.M.; BUCHANAN, J.A., *et al*, 1989; SARAIVA-PEREIRA, FITARELLI-KIEHL, SANSEVERINO, 2011; RIBEIRO, RIBEIRO, RIBEIRO, 2012).

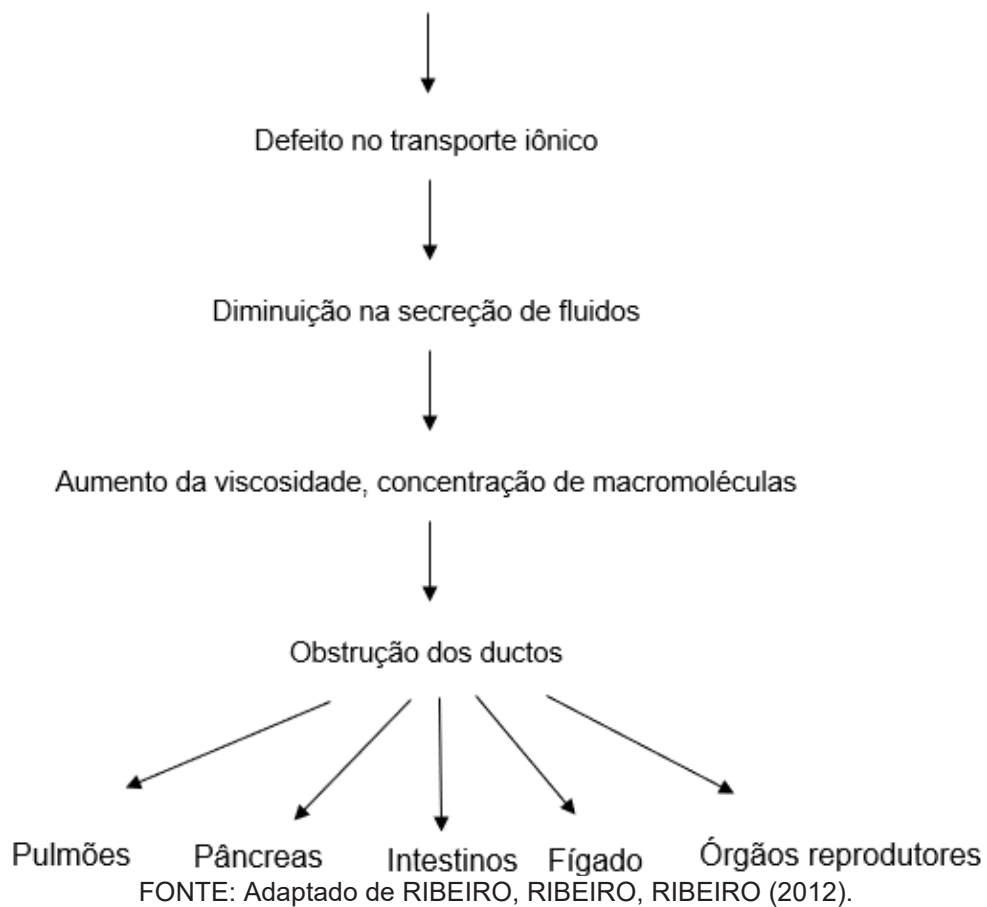
O gene foi identificado apenas em 1989 através de clonagem posicional, e é transcrito em um RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) maduro, que codifica uma proteína composta por 1.480 aminoácidos, conhecida como também como *CFTR*, ou seja, proteína reguladora da condutância transmembrana da FC (RIORDAN, J. R.; ROMMENS, J. M.; KEREM, B.S., *et al* , 1989; KEREM, B; ROMMENS, J.M.; BUCHANAN, J.A., *et al*, 1989; REIS, DAMACENA, 1998; SARAIVA-PEREIRA, FITARELLI-KIEHL, SANSEVERINO, 2011; HAACK, NOVAES, 2012). Ela é um canal direto na membrana epitelial responsável pelo transporte do íon cloro da membrana apical para o interior da célula, sendo regulada por Camp (AMP cíclico, adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico) (FIGURA 1) (RIORDAN, J. R.; ROMMENS, J. M.; KEREM, B.S., *et al* , 1989; KEREM, B; ROMMENS, J.M.; BUCHANAN, J.A., *et al*, 1989; REIS, DAMACENA, 1998; FIRMIDA, LOPES, 2011).



FONTE: Adaptado de Chaudary (2018).

A expressão da proteína ocorre na membrana apical das células epiteliais das vias aéreas, do intestino, dos tecidos reprodutivos e das glândulas exócrinas (FIGURA 2) (RIBEIRO, RIBEIRO, RIBEIRO, 2012; SATHE, FREEMAN, 2016). Além do transporte de cloro, a proteína funciona como um modulador de condutância sobre outros canais iônicos como Sódio e Potássio, transporte de proteínas e mecanismos de liberação de ATP (adenosina trifosfato, ou do inglês, *adenosinetriphosphate*) e regulação da secreção de bicarbonato (LUBAMBA, DHOOGHE, *et al.*, 2012; RIBEIRO, RIBEIRO, RIBEIRO, 2012).

FIGURA 2 FISIOPATOGÊNIA DA FIBROSE CÍSTICA
MUTAÇÃO NO GENE DA FIBROSE CÍSTICA



A prevalência da doença varia de acordo com a etnia, sendo mais comum em caucasianos e de acordo com as regiões (MOTA *et al.*, 2015). A Organização Mundial da Saúde estima que na Europa de 1:2000 a 1:3000 nascidos vivos sejam afetados pela doença, enquanto nos Estados Unidos a incidência seja de 1:3500 nascidos vivos (WHO, 2002).

A estimativa para os demais continentes e países a descrição das frequências não é precisa, acredita-se que na África a doença seja frequente, porém subdiagnosticada, com estimativa de 1:7506 indivíduos no sul da África. No Oriente Médio, a estimativa varia de 1:2560 a 1:15876 indivíduos. Apesar de

subdiagnosticada também na Ásia, as evidências sugerem que a doença seja rara nesta parte do mundo (WHO, 2002).

Na América Latina, devido à composição heterogênea da população, existe uma variação grande nas estimativas. No Brasil, tem-se estimado que a prevalência da FC seja de 1:7500 nascidos vivos aproximadamente. A variação entre as regiões do país também é grande, devido à grande miscigenação da população, além do elevado número de mutações presentes. Com relação ao sul do país, o estado do Rio Grande do Sul apresentou a maior estimativa, de 1:1587 nascidos vivos, Paraná com 1:9.520, e Santa Catarina com 1:8.700 (RASKIN, 2001; MOTA *et al.*, 2015).

O diagnóstico da doença inicia-se com a suspeita pela triagem neonatal, mas este sozinho não confirma nem exclui a doença. São realizadas duas quantificações, em tempos diferentes e até os 30 dias de vida, dos níveis de tripsinogênio imunorreativo. Em caso positivo para as duas dosagens, realiza-se o teste do suor, considerado o padrão ouro para o diagnóstico da doença (FIRMIDA; 2011; ELBORN, 2016; SERVIDONI *et al.*, 2017).

Este teste avalia os níveis de cloro e sódio presentes no suor do paciente, através da iontoforese por pilocarpina. Se os níveis obtidos forem ≥ 60 mmol/l, considera-se positivo e encaminha-se para o acompanhamento. Após esta etapa, há a possibilidade de realizar a investigação genética, na qual será possível reconhecer as variantes presentes (RIBEIRO, RIBEIRO, RIBEIRO, 2012; BHATACHARYA, WOTTON, WILEY, 2014; DOMINGOS *et al.*, 2015).

Existem cerca de 2000 variantes conhecidas no gene *CFTR*. A variante mais comum, frequente tanto em heterozigose quanto homozigose é a DF508, estando presente em aproximadamente 66% dos alelos em estatística mundial. A maioria das variantes restantes é rara, aparecendo em frequências de apenas 1% (SARAIVA-PEREIRA, FITARELLI-KIEHL, SANSEVERINO, 2011). As variantes são divididas em sete classes, de acordo com os mecanismos pelos quais influenciam na função da proteína CFTR, conforme demonstrado no quadro 1 (DE BOECK, AMARAL, 2016).

QUADRO 1 CLASSIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES NA FIBROSE CÍSTICA

(continuação)

Fenótipo grave da doença

Classe I	Gly542X, Trp1282X	CFTR não é sintetizada devido a um códon de parada prematuro ou defeitos de “<i>splicing</i>”. Níveis baixos da proteína madura ou inibição da formação.
-----------------	----------------------	---

FONTE: O autor (2021).

QUADRO 1 CLASSIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES NA FIBROSE CÍSTICA

(conclusão)

Fenótipo grave da doença

Classe II	Phe508del, Asn1303Lys, Ala561Glu	CFTR sintetizada de forma imatura. A proteína não alcança a membrana para funcionar como canal de Cl.
Classe III	Gly551Asp, Ser549Arg, Gly1349Asp	CFTR é sintetizado e alcança a membrana, porém, a não responde à ativação pelo cAMP.

Fenótipo leve da doença

Classe IV	Arg117His, Arg334Trp, Ala455Glu	CFTR é sintetizado e expresso na membrana, no entanto, produz fluxo reduzido de íons Cl.
Classe V	Ala455Glu, 3272- 26A→G, 3849+10 kg C→T	CFTR com síntese reduzida. Ocorre um “<i>splicing</i>” alternativo.
Classe VI	c. 120del23, rPhe508del	CFTR na superfície celular instável. Aumento da endocitose ou redução da reciclagem para a superfície celular. Mutação “<i>missense</i>”

Classe ainda em análise, fenótipo grave da doença.

Classe VII ou Classe IA*	dele2,3(21 kb), 1717- 1G→A	Não há transcrição do mRNA. Inibição da formação da proteína.
---	-------------------------------	--

FONTE: O autor (2021).

A classe VII foi descrita recentemente, e existem discussões acerca da nomenclatura, uma vez que alguns estudiosos sugerem que esta classe seja uma subdivisão da classe I (DE BOECK, AMARAL, 2016; MARSON, BERTUZZO, RIBEIRO, 2016).

Como é demonstrado no quadro, a gravidade da doença varia de acordo com a classe na qual a variante está inserida (VALLIÉRES, ELBORN, 2014; EGAN, 2016). Relaciona-se o genótipo da doença com o fenótipo, e pacientes com mutações das classes I, II, III e VII apresentam manifestações graves, podendo

apresentar avanço da doença pulmonar e insuficiência pancreática, enquanto aqueles com mutações presentes nas classes IV, V e VI apresentam fenótipo leve, com suficiência pancreática e doença pulmonar menos grave (VALLIÉRES, ELBORN, 2014).

A mutação mais comum, *DF508*, resulta de uma deleção de três pares de base de um resíduo do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR, e, por conseguinte, a proteína é degradada pelo sistema lisossomal. As proteínas não degradadas chegam até a superfície e exercem sua função, prejudicada pela diminuição da expressão protéica. Os pacientes com essa mutação apresentam fenótipo grave da doença (THURSFIELD, DAVIES, 2013).

A doença pulmonar é uma das principais características da FC e a gravidade dela também depende do tipo de mutação presente. A desidratação da secreção nas mucosas e aumento da sua viscosidade ocasiona a obstrução ductal. Assim, ocorrem diversas reações inflamatórias que culminam no desenvolvimento de bronquiectasia (KONSTAN, BERGER, 1997; ROGERS *et al.*, 2011). No sistema respiratório, a reação inflamatória é gerada principalmente pela dificuldade de eliminar microorganismos, tornando o tecido um local pró-inflamatório, favorecendo a colonização e consequente infecção respiratória por espécies tais como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa mucoide*, e *Burkholderia cepacea* (GONZALES, 2010; MARQUES, 2011; ELBORN, 2016).

As manifestações hepatobiliares também são de grande impacto para os pacientes com fibrose cística. Acredita-se que ocorram em decorrência da obstrução causada por bile espessa, além da inflamação sistêmica e má nutrição. A CFRD (do inglês *Cystic Fibrosis-Related Diabetes*) é um dos sintomas apresentados em alguns casos, e ocorre devido à destruição das células de ilhotas do pâncreas e reposição das células que produzem insulina (HAACK, NOVAES, 2012; ELBORN, 2016).

As glândulas sudoríparas também são afetadas, pois, devido ao transporte prejudicado de íons, há o aumento de cloreto no suor, conferindo o sabor salgado que fez com que a fibrose cística ficasse conhecida, inicialmente, como doença do beijo salgado (QUINTON, 2007; SILVEIRA, 2016).

2.2 MANIFESTAÇÕES PANCREÁTICAS

Embora a doença seja conhecida principalmente devido aos sintomas do sistema respiratório, ela foi inicialmente identificada como causa de má evolução ponderal em crianças. Somente em 1938, Dorothy Andersen, diferenciou a Fibrose Cística da Doença Celíaca, observando as características morfológicas alteradas do pâncreas (SINGH, SCHWARZENBERG, 2017; GIBSON-CORLEY *et al.*, 2016). As manifestações do sistema digestivo costumam ser secundárias à insuficiência pancreática (IP) que está presente em cerca de 78% dos pacientes fibrocísticos ao nascimento, e em 80 a 85% até o primeiro ano de vida. O status pancreático é diretamente ligado ao genótipo da doença (WALKOVIAKI *et al.*, 2016; SINGH, SCHWARZENBERG, 2017).

A insuficiência ocorre, pois, a proteína CFTR é altamente expressa nos ductos epiteliais do pâncreas e, portanto, com a falha no funcionamento desta, há o acúmulo de secreção mucosa nos ductos epiteliais, causa obstrução e impede a liberação de enzimas para o duodeno. Pela obstrução dos dutos pancreáticos há dilatação e formação de cistos pancreáticos, origem do nome fibrose cística do pâncreas (ANDERSEN, D.H., 1938; SOMAYAJI *et al.*, 2017).

Alguns mecanismos através dos quais a doença pancreática acontece foram descritos. Dentre eles, o primeiro diz respeito às células acinares do pâncreas que secretam grandes quantidades de proteínas no lúmen acinar, primariamente na forma de enzimas digestivas. Em condições normais, moléculas como Cl^- e HCO_3^- são secretadas no lúmen ductal e impulsionam os fluídos para o mesmo, solubilizando as proteínas secretadas em uma solução alcalina (GONZALES, 2010; WILSCHANSKI, NOVAK, 2013; WALKOVIAK *et al.*, 2016).

A alteração da FC diminui o transporte destas moléculas, causando acidificação do meio e precipitação dessas proteínas, gerando a obstrução nos ductos e posterior fibrose tecidual. Além disso, há obstrução do canalículo do pâncreas, impedindo a passagem das enzimas responsáveis pela digestão de proteínas, carboidratos e gordura para o duodeno (WILSCHANSKI, NOVAK, 2013).

Essa deficiência na função exócrina pancreática leva a má absorção de nutrientes, deficiência de vitaminas e no crescimento. Estudos apontam que esta alteração ocorre desde o período intrauterino, promovendo alteração do desenvolvimento acinar. Em estágios e idades mais avançadas encontra-se a formação de cistos, calcificações, infiltrações gordurosas (WILSCHANSKI, NOVAK, 2013).

Os principais sintomas apresentados por pacientes com IP incluem perda de peso, dor abdominal, edema, diarreia e esteatorreia (fezes com presença de gordura), não sendo uma regra, uma vez que os pacientes podem não apresentar os sintomas (DOMÍNGUES-MUÑOZ *et al.*, 2017). Pacientes considerados suficientes pancreáticos (SP) são aqueles nos quais as reservas pancreáticas estão acima do limiar, ou seja, há ainda funcionamento, embora não seja absolutamente normal (BAKER, BOROWITZ, BAKER, 2005; SINGH, SCHWARZENBERG, 2017).

O tratamento é realizado através da Terapia de Reposição Enzimática (TRE ou PERT – do inglês *pancreatic enzyme replacement therapy*), que visa auxiliar a absorção de nutrientes, impactando positivamente o desenvolvimento e crescimento do paciente. A dosagem é ajustada observando-se os sintomas apresentados e o desenvolvimento da criança, seu crescimento, sendo a terapia iniciada durante a infância e seguindo até a vida adulta. Os pacientes devem consumir as enzimas durante ou logo após as refeições para seu funcionamento correto (BAKER, BOROWITZ, BAKER, 2005; SINGH, SCHWARZENBERG, 2017; SOMAYAJI, 2017).

2.3 MANIFESTAÇÕES INTESTINAIS

Existem diferentes tipos de manifestações intestinais descritas, tais como o íleo meconial, uma condição na qual há obstrução do íleo terminal por mecônio espesso, contendo grande concentração de proteínas (ZIEGLER, 1994; GORTER *et al.*, 2010; DEL CIAMPO *et al.*, 2015).

Além disso, adultos com FC podem apresentar a síndrome da obstrução intestinal distal (DIOS, do inglês *distal intestinal obstruction syndrome*), um acúmulo de material fecal viscoso combinado com secreções mucosas víscidas no íleo distal e no ceco com capacidade de adesão à parede intestinal, causando obstrução parcial ou total (JAFFE, B.F., GRAHAM, W.P., GOLDMAN, L., 1966; SANDY *et al.*, 2020). Embora pareçam condições semelhantes, trata-se de duas manifestações distintas e que, nem sempre, estão correlacionadas (DE LISLE, BOROWITZ, 2013).

Embora os pacientes façam a terapia de reposição enzimática, as dores abdominais e outros sintomas gastrointestinais costumam permanecer ativos, e indicam que tais sintomas não provêm apenas das manifestações pancreáticas (MUNCK, 2014; ELLEMUNTER *et al.*, 2017; ENAUD *et al.*, 2019).

Por tal motivo, pesquisadores iniciaram estudos sobre a inflamação intestinal e demais manifestações deste órgão, visto que os mecanismos presentes nesta condição ainda não estão totalmente esclarecidos.

Estudos demonstraram (SMYTH *et al.*, 2000) a existência da condição inflamatória intestinal em pacientes fibrocísticos, ao buscarem compreender o processo de inflamação pulmonar. O ambiente alterado propiciado pelo funcionamento falho da proteína CFTR contribui para o processo inflamatório encontrado na FC.

A inflamação intestinal ocorre como uma consequência primária do defeito na proteína CFTR, uma vez que a viscosidade do muco aumenta em resposta à desidratação causada pelo meio ácido promovido também pela falta de enzimas que deveriam ser secretadas pelo pâncreas e a glicosilação alterada das mucinas. Essas mudanças predispõem alterações no balanço ou composição da flora intestinal, propiciando o crescimento de microrganismos patogênicos, fenômeno conhecido como disbiose (LEE *et al.*, 2012; DHALIWAL *et al.*, 2015).

Acredita-se na correlação entre a alteração da microbiota e a ativação do sistema imunológico inato, aumentando as células de defesa presentes na região intestinal e, conseqüentemente, a quantidade de muco. Este muco, no entanto, não é capaz de fazer a limpeza da região, por ser espesso e acabar obstruindo o local (NORKINA *et al.*, 2004; DE LISLE, BOROWITZ, 2013). Além disso, o uso crônico de antibióticos e bloqueadores de bombas de prótons por parte dos pacientes é um fator relevante, que pode interferir na composição da microbiota intestinal, contribuindo para a disbiose e conseqüente inflamação (GARG, OOI, 2017).

A inflamação contribui para a má absorção de nutrientes, mesmo quando os pacientes estão em tratamento da insuficiência pancreática (ADRIAANSE *et al.*, 2015).

2.4 MARCADORES BIOLÓGICOS

Uma vez que o diagnóstico da condição pancreática e inflamação intestinal são necessários para acompanhamento da doença, métodos que facilitem esta detecção são indispensáveis.

Os testes existentes para o diagnóstico da condição pancreática incluem os diretos e indiretos, sendo o principal deles o teste padrão ouro Secretina-

pancreozimina, no entanto, este se apresenta como um teste invasivo de custo elevado, necessitando a interrupção da ingestão de enzimas para tratamento, inviáveis para a rotina. Alternativamente, apresentam-se os testes indiretos, tais quais a lipase imunoreativa fecal, esteatócrito, quimiotripsina e elastase-1 fecal (WALKOWIAK *et al.*, 2016; WALI *et al.*, 2012).

A elastase pancreática humana 1 (EL-1) é uma protease digestiva humana sintetizada como zimogênio com peso molecular de 28 kDa. Sua síntese é realizada nas células acinares e esta é então secretada no duodeno através do ducto pancreático. Apresenta como vantagens a não degradação durante o trânsito intestinal, porque costuma se ligar aos sais biliares, aumentando-se assim sua concentração nas fezes (GONZALES, 2010; TARDELLI *et al.*, 2013).

Além disso, trata-se de um teste não invasivo, de coleta simples e sem necessidade de preparação para transporte da amostra, apresenta alta sensibilidade (90 a 100%) e especificidade (93 a 100%) (ABDEL, ABDUL, ABDEL, MOSTAFA, 2006).

Estudos demonstram que nas duas primeiras semanas de vida de um recém-nascido, os níveis de EL-1 são bastante baixos e, por isso, não tem utilidade como uma triagem neo-natal, mas apenas se os valores permanecerem baixos após a quarta semana, possivelmente indicando FC (CADE *et al.*, 2000; GONZALES, 2010).

A calprotectina fecal, por sua vez, é um marcador inflamatório amplamente utilizado na detecção de doenças inflamatórias intestinais tais como a doença de Crohn e a Síndrome do Intestino Irritável (NIKIAZ *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2012). É uma proteína de ligação de Cálcio e Zinco, um heterodímero composto das proteínas S100A8 e S100A9, sendo também referida como calgranulina A/B, 14/MRP8 (*myeloid-related protein*), ou como *Cystic Fibrosis antigen* (Antígeno FC), proteína L1 (PATHIRANA *et al.*, 2012; VAOS *et al.*, 2013).

O local no qual se encontra tal proteína é o citoplasma (ocupa cerca de 60% deste) de células de defesa como neutrófilos, granulócitos e macrófagos, quando estes são ativados (PATHIRANA *et al.*, 2012; VAOS *et al.*, 2013; SHERWOOD, WALSHAM, 2016). Está comumente envolvida no sistema imunológico inato, secretada pelas células epiteliais intestinais quando estas detectam sinais de citocinas ou produtos bacterianos tóxicos. Portanto, é considerada uma proteína de atividade antibacteriana, indutora de apoptose e quimiotaxia. É vista principalmente

como uma proteína de fase aguda da inflamação (PATHIRANA *et al.*, 2012; VAOS *et al.*, 2013).

Quando ocorre a migração dos neutrófilos até as células intestinais em decorrência de inflamação, a calprotectina é expressa e aparece nas fezes, pois é uma molécula resistente às proteases do intestino, tal como às secreções pancreáticas no intestino. A sua estabilidade costuma ser de sete dias, facilitando assim o armazenamento e transporte para posterior processamento em laboratório (PATHIRANA *et al.*, 2012; VAOS *et al.*, 2013; SHERWOOD, WALSHAM, 2016; MANCEAU *et al.*, 2016).

A detecção da calprotectina fecal é por ensaios do tipo ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), no qual se utilizam 2 anticorpos monoclonais visando capturar e detectar a calprotectina, através de reação de quimioluminescência, proporcional à concentração de calprotectina presente nas amostras (PATHIRANA *et al.*, 2012; MANCEAU *et al.*, 2016).

A calprotectina vem sendo utilizada como um marcador de inflamação intestinal em fibrose cística, porém, sua eficácia ainda não é comprovada, necessitando de estudos mais aprofundados para entender sua função na doença em questão (LEE *et al.*, 2012; VAOS *et al.*, 2013, LAZZAROTTO *et al.* 2022).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de acurácia diagnóstica. A detecção dos marcadores foi realizada por imunoenensaio enzimático e quimioluminescência, utilizando kits comerciais.

A metodologia empregada para o estudo incluiu:

1. Apresentação da pesquisa e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
2. Coleta de amostras de fezes;
3. Armazenamento para transporte;
4. Preparação da amostra para processamento;
5. Processamento das amostras e análises;
6. Interpretação dos resultados;
7. Avaliação da funcionalidade dos marcadores.

3.1 SUJEITOS

- **Grupo de Pacientes:** Fizeram parte deste estudo crianças de ambos os gêneros, com FC triadas pela FEPE (Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional) através do Programa Nacional de Triagem Neonatal – Teste do Pezinho, no Estado do Paraná, diagnosticadas pelo Teste do Suor e que apresentem as mutações para fibrose cística identificadas em teste genético. Os pacientes são atendidos no Ambulatório de Fibrose Cística do Serviço de Pneumologia, Alergologia e Imunologia Pediátrica, Departamento de Pediatria do CHC/UFPR, e foram acompanhados durante o período do estudo (24 meses, após aprovação pelo CEP).

A variante genética predominante entre os pacientes foi a $\Delta F508$ tanto em homozigose quanto em heterozigose, aparecendo em 26 dos 35 pacientes, semelhantemente às demais populações descritas em outros estudos (ADRIAANSE, et al., 2015; ELLEMUNTER et al., 2017).

A segunda variante em predominância foi a G542X, uma variante bastante expressiva na população do ambulatório de fibrose cística do HC.

- **Grupo Controle:** Para o grupo de comparação os pacientes foram pareados com crianças saudáveis nascidas na maternidade do CHC/UFPR, com resultado normal para FC do teste do pezinho do Programa Nacional de Triagem Neonatal.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Crianças que apresentaram níveis elevados de tripsina comprovados pela realização de dois testes do pezinho positivos e teste de suor positivo, realizados pela FEPE, apresentando as mutações de interesse para o estudo, atendidas no ambulatório do Complexo Hospital de Clínicas, e cujos pais ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos deste estudo pacientes que não apresentaram o TCLE assinado pelos pais e/ou responsáveis, e pacientes que não realizaram as coletas solicitadas.

Não houve exclusão de pacientes que apresentassem sintomas gastrointestinais ou pulmonares, uma vez que a intenção era avaliar a alteração dos marcadores na presença destas variáveis.

3.4 OBTENÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os pais ou responsáveis tomaram conhecimento dos objetivos e procedimentos a serem realizados e assinaram um termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi realizada a leitura do mesmo pelos pesquisadores junto aos pais, sanando eventuais dúvidas, e caso de acordo assinaram em duas vias. Uma via ficou de posse dos pesquisadores e a outra, do pai e ou responsável.

Para participantes a partir de 12 anos o Termo de Assentimento foi aplicado, garantindo uma linguagem de fácil compreensão no mesmo.

3.5 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de fezes foram coletadas durante o período das consultas de rotina dos pacientes no ambulatório, no período que compreendeu o presente estudo. A coleta das amostras ocorreu de setembro de 2019 a novembro de 2022. As idades ao momento da coleta variaram de 3 meses a 12 anos. Foram recrutados para a pesquisa 44 pacientes com Fibrose Cística.

Foram obtidos os TCLE e TALE respectivamente assinados por pais e ou responsáveis e por adolescentes maiores de 12 anos de idade. Destes, 9 não forneceram amostras de fezes para processamento e, por isso, não foram incluídos nas análises.

Para os 35 que assinaram o termo e seguiram com as coletas, foram analisadas também as manifestações clínicas descritas em prontuário no momento da consulta médica em ambulatório especializado. Além disso, foram incluídos 10 pacientes considerados saudáveis, ou seja, sem fibrose cística, para um grupo denominado controle.

Para o grupo de crianças menores de 4 anos foram realizadas 3 coletas em tempos diferentes: 3 meses, 6 meses e 1 ano. Os participantes do grupo acima de 4 anos fizeram 2 coletas em tempos diferentes, usualmente a cada 3 meses, quando compareciam às consultas.

Essa diferenciação nas coletas se deu devido ao fato de estudos anteriores terem demonstrado que os níveis de calprotectina fecal são diferentes para crianças abaixo de 4 anos. As amostras foram coletadas pelo próprio paciente ou pelos responsáveis, em frasco universal estéril e seco, com auxílio de uma espátula disponível no mesmo. A quantidade da amostra não ultrapassou ½ (meio) frasco, e diferentes frações em diferentes partes do bolo fecal foram coletadas, de acordo com as recomendações dos fabricantes dos testes, após os resultados foram levados em consideração os valores de referência apresentados no quadro 2.

QUADRO 2 VALORES DE REFERÊNCIA PARA OS MARCADORES BIOLÓGICOS

Valores de referência calprotectina

Superior a 50 ug/g	Elevado
Inferior ou igual a 50 ug/g	Normal

Valores de referência elastase

Inferior a 100 µg/g	Alterado (Insuficiência pancreática exógena grave)
100 µg/g a Inferior a 200 µg/g	Alterado (Insuficiência pancreática exógena moderada)
Superior ou igual a 200 µg/g	Normal

Fonte: O autor (2022).

Após a coleta, as amostras foram mantidas refrigeradas entre 2°C e 8°C, por no máximo 3 dias e transportadas refrigeradas ao laboratório de apoio onde foram processadas e analisadas. As coletas foram prejudicadas para os pacientes acima de 4 anos principalmente devido à pandemia de COVID-19, pois os pacientes incluídos não compareceram ao ambulatório para acompanhamento. A não adesão às coletas também foi um fator de interferência para as análises.

3.6 ANÁLISE LABORATORIAL

As análises foram realizadas por imunoenensaio enzimático (ELISA) para a mensuração da Elastase-1 fecal fabricante Bioserv Diagnostics e quimioluminescência, para a Calprotectina fabricante Diasorin Inc., por meio de kits, seguindo as recomendações dos fabricantes.

3.6.1 Mensuração dos níveis de calprotectina fecal

A calprotectina é mensurada através de um ensaio do tipo sanduíche no qual se utilizam 2 anticorpos monoclonais visando capturar e detectar a calprotectina. A calprotectina é inicialmente extraída das amostras de fezes com um tampão de extração, utilizando o procedimento de pesagem ou um dispositivo de extração específico do kit. O ensaio incuba a amostra extraída, um calibrador ou um controle junto ao tampão de ensaio e partículas paramagnéticas revestidas com anticorpo monoclonal que reconhece o heterocomplexo calprotectina especificamente.

Após a incubação, um ciclo de lavagem é realizado visando a remoção do material não ligado. Em seguida, um anticorpo monoclonal conjugado com isoluminol que reconhece a calprotectina é adicionado à reação e incubado. No segundo passo da lavagem, o conjugado não ligado é removido. Os reagentes iniciadores são então adicionados, iniciando uma reação quimioluminescente rápida. O sinal de luz é medido por um fotomultiplicador como unidades de luz relativa (RLU), sendo proporcional à concentração de calprotectina presente nas amostras.

3.6.2 Mensuração dos níveis de elastase-1 fecal

A amostra é preparada, realizando-se a extração dos componentes com um tampão, a homogeneização ocorre logo em seguida e a amostra é então colocada nos poços presentes na placa utilizada para o teste. Após lavagem, é adicionado o anticorpo, a placa é incubada e o substrato é adicionado iniciando a reação, por fim, observa-se o resultado analisando os comprimentos de onda.

Trata-se de uma técnica do tipo ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) sanduíche, que utiliza dois anticorpos monoclonais altamente específicos para a elastase pancreática humana 1. O antígeno fica aderido a um suporte sólido (placa de ELISA) que contém diversos poços, a amostra é adicionada a estes poços, buscando anticorpos contra o antígeno. Se houver anticorpos, a formação antígeno-anticorpo ocorre devido à adição de um segundo anticorpo dirigido contra imunoglobulinas da espécie onde se busca detectar os anticorpos, a qual é ligada uma enzima. Os poços onde a reação ocorreu apresentam uma coloração, sendo detectada em comprimentos de onda por espectrofotometria.

3.7 RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES

O estudo respeita a Resolução 466/12 de pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde.

3.8 CONFIDENCIALIDADE

É assegurado pelos pesquisadores que o caráter anônimo dos pacientes será mantido, sendo suas identidades protegidas de terceiros não autorizados. As fichas clínicas ou outros documentos submetidos ao patrocinador se houver, não serão identificados pelo nome, mas por um código. O pesquisador manterá um registro de inclusão dos pacientes mostrando códigos, nomes e endereços para uso próprio. Igualmente, os formulários de Termo de Consentimento e Termos de Assentimento assinados pelos pacientes serão mantidos pelo pesquisador em confidência estrita, juntos em um único arquivo. Fica assegurado que o paciente receberá uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Informado.

3.9 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados obtidos foram incluídos em planilha eletrônica (EXCEL®) para posterior análise dos dados em software estatístico. Para as variáveis categóricas será calculado o percentual para cada grupo.

Para acompanhamento das manifestações clínicas e dados demográficos dos pacientes, os prontuários foram verificados no momento da consulta em ambulatório. As informações verificadas na análise de prontuários incluíram alteração genética presente, peso (z-score), altura (z-score), IMC (z-score), manifestações gastrointestinais, manifestações pulmonares, uso de enzimas pancreáticas e tratamentos com antibióticos durante o período de participação no estudo.

Na análise estatística foram efetuados testes de significância, como teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, com o objetivo de testar hipóteses ou suposições iniciais de pesquisa, nas comparações de grupos e testes de independência relacionando variáveis-causa e variáveis-efeito com os níveis de corte dos biomarcadores calprotectina fecal e elastase fecal-1.

Também são apresentados indicadores de qualidade de testes diagnósticos: medidas de sensibilidade (probabilidade de obter valor elevado no paciente com fibrose cística) e de especificidade (probabilidade de apresentar valor normal em indivíduos saudável ou sem fibrose cística).

Foram utilizadas “medidas de posição” como o primeiro quartil (25% dos resultados ordenados posicionam-se abaixo), a mediana (50% dos resultados ordenados posicionam-se abaixo) e terceiro quartil (75% dos resultados posicionam-se abaixo), devido à maior representabilidade. Essas medidas de posição são relativamente imunes às grandes flutuações de valores e à ausência de simetria ao redor da média amostral.

A ocorrência de valores extremos fragiliza o poder de teste e inviabiliza a adoção de testes paramétricos como os testes “t” e de análise de variância, ANOVA.

Apesar disso, são apresentados resultados de testes paramétricos de diferenças entre médias em dados pareados e análise de variância, para o biomarcador calprotectina fecal em pacientes com fibrose cística.

Não foi possível realizar a comparação entre os valores de calprotectina para pacientes insuficientes pancreáticos e suficientes pancreáticos, uma vez que os valores de elastase fecal-1 não eram precisas para valores abaixo de 5,5 µg/g.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Dos 35 pacientes incluídos, 28 faziam uso de enzimas pancreáticas, 16 faziam uso de antibióticos no momento da coleta, 9 apresentavam sintomas gastrointestinais na consulta que precedeu o processamento da amostra e 13 apresentavam sintomas pulmonares, conforme demonstrado na tabela 1.

TABELA 1 DADOS DEMOGRÁFICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES E GRUPO CONTROLE.

Dados demográficos e clínicos dos pacientes			
	Grupo FC < 4 anos	Grupo FC > 4 anos	Grupo Controle
Sexo (n e %)			
Masculino	8 (42)	6 (43)	6 (67)
Feminino	12 (58)	9 (57)	3 (33)
Idade (média±DP)			
Masculino	3,3 ± 0,7	11,2 ±4,2	3,0±0,5
Feminino	3,0 ± 0,5	10,6±3,7	3,5±0,1
Altura (z-score)	-0,487 ± 1,531	-1,044± 1,322	
Peso (z-score)	-0,608±1,120	-1,053±1,628	
IMC (z-score)	-0,437±0,944	-0,664±1,629	
Manifestações clínicas dos pacientes			
Uso de enzimas	15	13	
Uso de antibiótico	8	8	
Esteatorreia	2	7	
Tosse	5	8	
Sintomas gastrointestinais	2	7	
Necessidade de internação	3	3	
Genótipo			
Phe508del	14	12	
Homozigose	6	9	
Heterozigose	8	3	
G542X	4	3	
Homozigose	2	3	
Heterozigose	2	0	
Outras	2	0	
Marcadores Biológicos			
Elastase Fecal (EL-1)			
Normal. Valor >200 µg/g	5	1	6
IP Leve ou moderada. Valor de 100 -200 µg/g	1	0	0
IP Grave <100 µg/g	12	14	0
Calprotectina fecal			
>50 µg/g	6	8	1
≤50µg/g	13	7	5

FONTE: O autor (2022).

Dos nossos pacientes, 27 de 35 apresentaram alterações nos níveis de EL-1. Destes, 26 foram considerados insuficientes pancreáticos graves (valores <100ug/g), 1 foi considerado insuficiente pancreático moderado (valor abaixo de 200 ug/g, até 100 ug/g) e apenas 6 apresentaram níveis normais de EL-1 (acima de 200 ug/g).

Dos 35 pacientes, 20 apresentaram aumento dos níveis de calprotectina nas fezes. Destes, 13 eram do grupo abaixo de 4 anos e 7 do grupo > 4 anos.

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas os pacientes foram separados em grupos constituídos da seguinte forma: ≤ 4 anos e maiores de 4 anos. As análises para os pacientes com mais de 4 anos se voltam especificamente para pacientes com fibrose cística, por não existir um grupo controle (saudáveis) para pacientes com mais de 4 anos.

A constituição desses grupos é necessária, pois, os níveis de calprotectina para pacientes com FC são distintos para pacientes de até 4 anos em relação aos maiores de 4 anos.

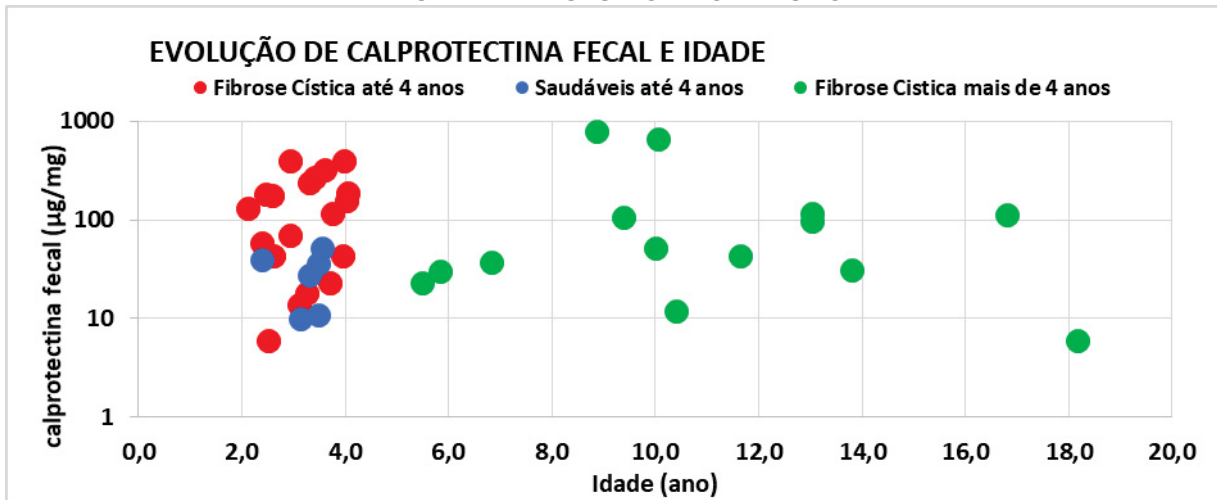
Apesar dessas diferenças, foram utilizados os mesmos valores de corte para calprotectina e elastase para os dois grupos de idade.

Dados observados de calprotectina têm como característica a ocorrência de valores extremos e discrepantes que não podem ser desprezados, pois não são erros de medição. Diante disso, medidas amostrais centrais e de dispersão, como média e desvio-padrão perdem a capacidade de ser representativos dos dados amostrais.

Por esse motivo utilizamos as “medidas de posição” como o primeiro quartil (25% dos resultados ordenados posicionam-se abaixo), a mediana (50% dos resultados ordenados posicionam-se abaixo) e terceiro quartil (75% dos resultados posicionam-se abaixo). Essas medidas de posição são relativamente imunes às grandes flutuações de valores e à ausência de simetria ao redor da média amostral.

Na sequência, para se ter uma visão geral dos valores de calprotectina fecal, a Figura 3 apresenta a dispersão dos valores de CF (eixo vertical em escala logarítmica), na primeira leitura, para os pacientes do grupo Saudáveis, Fibrose Cística com idade até 4 anos e Fibrose Cística com idade superior a 4 anos.

FIGURA 3 CALPROTECTINA FECAL, DADOS DE PRIMEIRA LEITURA, NOS GRUPOS DE PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO



FONTE: O autor (2022).

Denota-se que as medidas de calprotectina para os três grupos são bastante distintas entre si. Além disso, sejam para o grupo de Saudáveis ou para os dois grupos fibrose cística, as medidas apresentam um padrão aleatório próprio, sem acusar quaisquer tendências, de crescimento ou decréscimo, conforme evolui a idade dos pacientes.

Especificamente para o grupo fibrose cística com idade superior a 4 anos, exceto por dois valores extremos - acima de 600 $\mu\text{g/g}$ – os níveis de calprotectina ficam espalhados, de forma aleatória, abaixo de 100 $\mu\text{g/g}$, o que evidencia uma baixa dispersão dentro do grupo.

4.2.1 PACIENTES ATÉ 4 ANOS

A tabela 2 apresenta uma síntese dos scores Z para o grupo de pacientes \leq 4 anos.

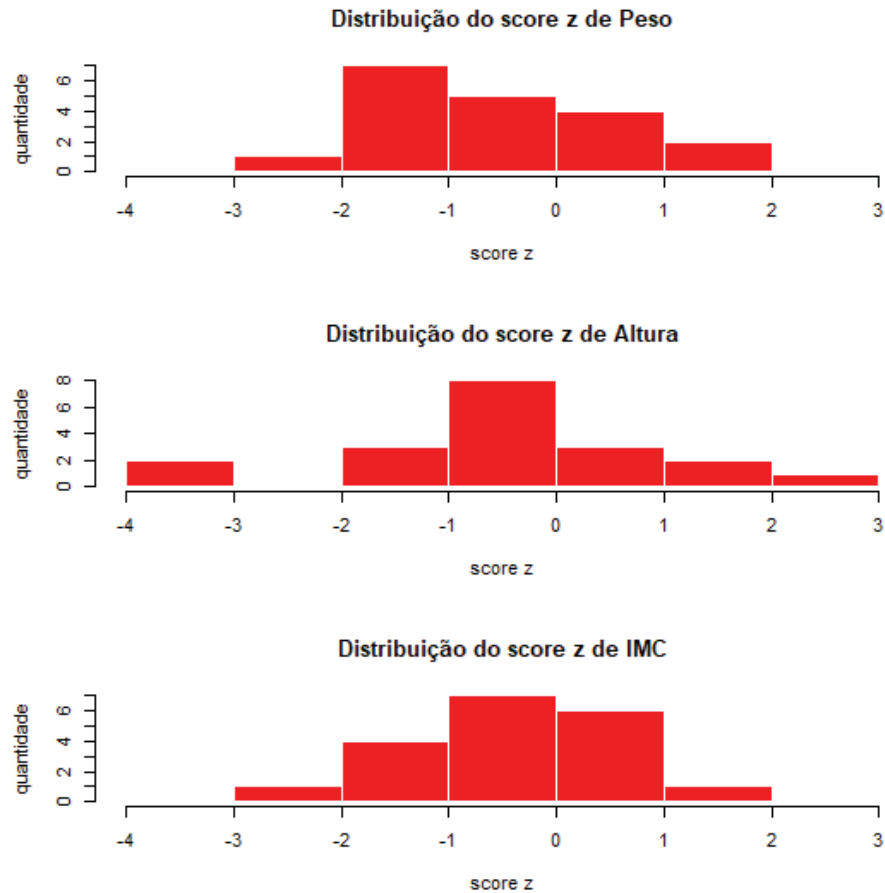
TABELA 2 SÍNTESE DE RESULTADOS AMOSTRAIS DOS SCORES Z

Leitura	Quartil 1	Mediana	Quartil 3	Média	Desvio-pd	Valor min	Valor max	Amostra
Peso	-1,405	-0,710	0,135	-0,608	1,120	-2,970	1,550	19
Altura	-1,350	-0,940	0,450	-0,487	1,531	-3,740	2580	19
IMC	-1,000	-0,532	0,295	-0,437	0,944	-2,170	1,520	19

FONTE: O autor (2022).

A Figura 4 apresenta os histogramas para as variáveis score Z de peso, altura e IMC.

FIGURA 4 HISTOGRAMAS DE SCORE Z DE PESO, ALTURA E IMC



FONTE: O autor (2022).

A Tabela 3 apresenta um sumário das medidas amostrais de calprotectina fecal para pacientes com fibrose cística em três instantes de tomada de dados ou leituras, onde se pede maior atenção para os quartis, as medidas de posição; praticamente livres dos valores extremos (valor mínimo e valor máximo) observados.

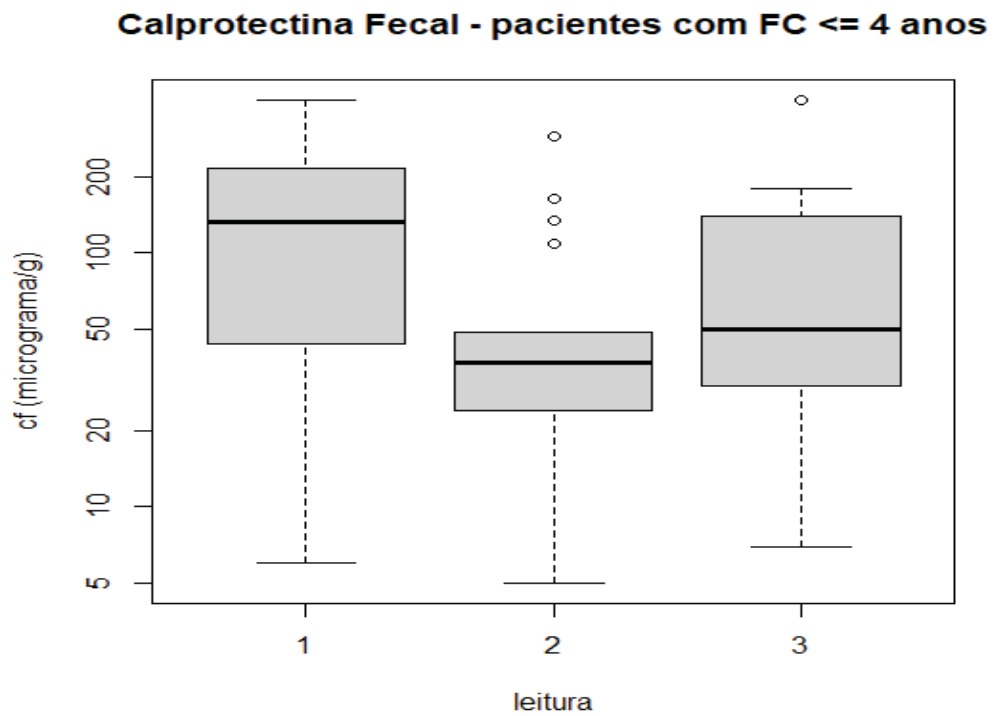
TABELA 3 SÍNTESE DE RESULTADOS AMOSTRAIS DA CALPROTECTINA FECAL ($\mu\text{G/G}$)

Leitura	Quartil 1	Mediana	Quartil 3	Média	Desvio-pd	Valor min	Valor max	Amostra
1	44,0	133,0	214,5	150,4	127,0	6	401	20
2	24,0	37,0	49,0	62,9	72,6	5	286	17
3	31,5	50,0	126,5	90,2	105,4	7	401	14

FONTE: O autor (2022).

Na Figura 5 são apresentados os resultados de calprotectina, no formato gráfico boxplot, em escala logarítmica, obtidos de três leituras.

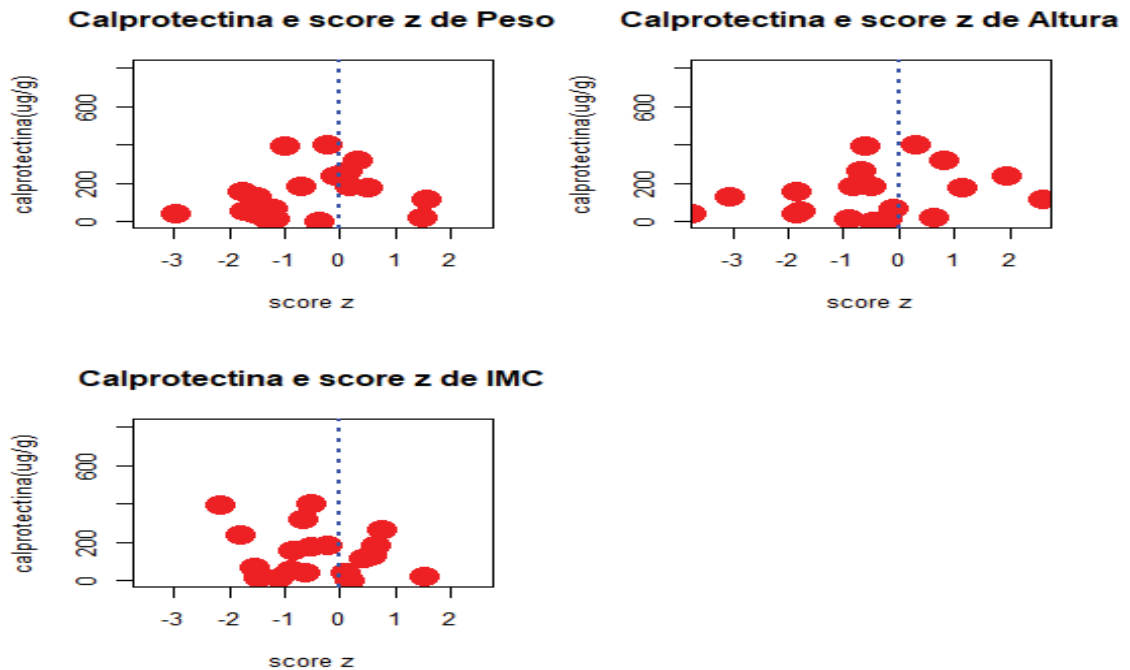
FIGURA 5 VALORES DE CALPROTECTINA NAS DIFERENTES LEITURAS EM PACIENTES FIBROSE CÍSTICA



FONTE: O autor (2022).

Na Figura 6 são apresentados três gráficos de dispersão do escore normalizado (score z) das variáveis peso, altura e IMC em relação ao nível de calprotectina fecal.

FIGURA 6 GRÁFICOS DE DISPERSÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CALPROTECTINA E SCORE Z DE PESO, ESTATURA E IMC



FONTE: O autor (2022).

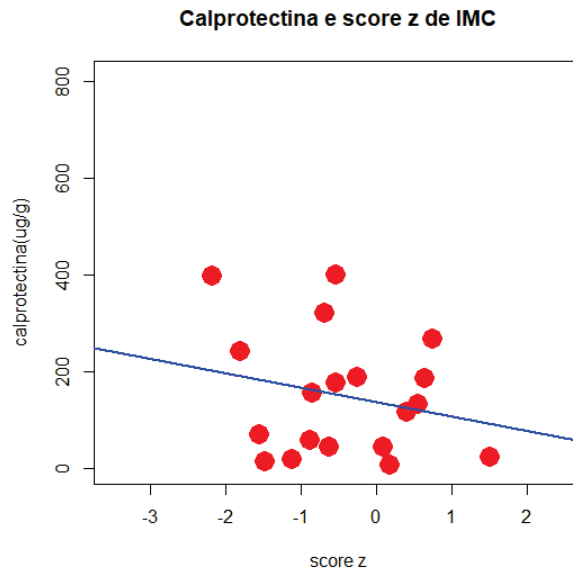
Para as três variáveis demográficas relacionadas com calprotectina fecal, os gráficos de dispersão apresentam um padrão aleatório sem tendência, o que implica em valores baixos de correlação, próximos de zero.

É notável maior concentração de score z abaixo de 0, para as três variáveis associadas à calprotectina.

4.2.1.1 Análise de Correlação entre Score Z de IMC e Calprotectina Fecal

A Figura 7 apresenta o gráfico de dispersão do score z de IMC e calprotectina fecal acrescido com uma linha de tendência.

FIGURA 7 GRÁFICO DE DISPERSÃO DO SCORE Z DO IMC E CALPROTECTINA FECAL.



FONTE: O autor (2022).

Com o aplicativo R, obteve-se uma correlação amostral (Correlação de Pearson) de $r = -0,0226\%$, considerada baixa, o que evidencia um processo predominantemente aleatório e pouca ou nenhuma interdependência entre score z de IMC e nível de calprotectina fecal.

Com respeito à regressão entre score z de IMC e calprotectina fecal conclui-se pela inexistência de regressão, considerando que o coeficiente angular da linha de tendência é praticamente nulo, como mostra o p valor = 0,3518, maior que o nível de significância de 5%.

A Tabela 4 apresenta um resumo das correlações e coeficientes de regressão de score z.

TABELA 4 RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CALPROTECTINA E ESCORE Z PESO, ESTATURA E IMC EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

(continuação)

Y	X	Pontos	Cor (X,Y)	Coef de Y = a + bX		Teste t para o coef angular b			
				A	B	std(b)	t calc	pvalue	Conclusão
Calprotectina	Score z de Peso	19	0,2465	166,9	27,20	25,94	1,0486	0,1545	Não há regressão
Calprotectina	Score z de Altura	19	0,2745	161,2	22,17	18,84	1,1768	0,1278	Não há regressão
Calprotectina	Score z de	19	0,2262	137,4	29,64	30,96	0,9574	0,1759	Não há regressão

IMC

FONTE: O autor (2022).

TABELA 4 SÍNTESE DE CORRELAÇÕES E COEFICIENTES DE REGRESSÃO

(conclusão)

Y	X	Pontos	Cor (X,Y)	Coef de $Y = a + bX$		Teste t para o coef angular b			
				A	B	std(b)	t calc	pvalue	Conclusão
Calprotectina	Score z de Idade	19	02387	150,4	29,51	29,12	1,0134	0,1625	Não há regressão

FONTE: O autor (2022).

4.2.1.2 Teste de Independência e Medidas de Acurácia para os Grupos Saudáveis e Fibrose Cística

As hipóteses de teste foram:

H_0 : a proporção de pacientes com nível alterado é a mesma para os grupos

Fibrose e Saudável

H_1 : a proporção de pacientes com nível alterado é diferente

O nível de significância é de $\alpha = 5\%$

4.2.1.3 Calprotectina

Os dados da Tabela 5 referem-se a níveis de calprotectina fecal em pacientes com fibrose cística e saudáveis.

TABELA 5 NÍVEIS DE CALPROTECTINA EM PACIENTES COM FC E SAUDÁVEIS, GRUPO < 4 ANOS.

Paciente	Calprotectina		Total Geral
	Elevado	Normal	
Fibrose	13	6	19
Saudável	1	5	6
Total Geral	14	11	25
Sensibilidade =	0,68	= 13/19	
Especificidade =	0,83	= 5/6	

FONTE: O autor (2022).

Devido à amostra pequena de dados, foi aplicado o Teste de Fisher para análise dos dados.

Considerando que p valor = 0,0391% é menor que o nível de significância 5%, a H_1 : a proporção de pacientes com nível alterado é diferente para os grupos Fibrose e Saudáveis, em outras palavras, rejeita-se a hipótese de independência.

Demonstrando, assim como em outros estudos, que os resultados de calprotectina alterados encontrados pertencem, em sua maioria, ao grupo de pacientes com FC, enquanto o grupo de pacientes saudáveis apresentou níveis normais do marcador.

4.2.1.4 Elastase

Na tabela 6, encontrada abaixo, se mostra a abertura da condição de nível alterado de elastase em grave e moderado:

TABELA 6 ALTERAÇÃO DA ELASTASE FECAL-1 NOS PACIENTES COM FC E SAUDÁVEIS DIVIDIDA EM NORMAL, MODERADO E GRAVE

Paciente	Elastase			Total Geral
	Grave	Moderado	Normal	
Fibrose	12	1	5	18
Saudável	0	0	6	6
Total Geral	12	1	11	24

FONTE: O autor (2022).

Nota-se que em toda a amostra de 35 elementos observou-se apenas um caso de amostra de fezes com resultado moderado no grupo Fibrose Cística com até 4 anos. Os dados da Tabela 7 referem-se a níveis de EL-1 em pacientes com fibrose cística e saudáveis.

TABELA 7 NÍVEIS DE ELASTASE FECAL-1 EM PACIENTES COM FC E SAUDÁVEIS

Paciente	Elastase		Total Geral
	<200 µg/g /g	≥200 µg/g	
Fibrose	13	5	18
Saudável	0	6	6
Total Geral	13	11	24

FONTE: O autor (2022).

Considerando que p valor = 0,3432 é menor que o nível de significância 5%, a hipótese de nulidade H_0 (a proporção de pacientes com nível de elastase alterado é a mesma para os grupos Saudável e Fibrose) deve ser rejeitada, corroborando com níveis de elastase diferentes para pacientes saudáveis, dentro do valor de referência considerado normal (≥200 ug/g).

O número de pacientes com FC com níveis de EL-1 baixos, considerados como IP grave (n=13), demonstra a relevância deste marcador para verificar a presença de insuficiência pancreática e o grau desta nos pacientes fibrocísticos.

4.2.1.5 Elastase x Calprotectina

A Tabela 8 apresenta os dados de relação da calprotectina e elastase fecal em pacientes com fibrose cística:

TABELA 8 RELAÇÃO CALPROTECTINA E ELASTASE EM PACIENTES COM FC

Paciente	Calprotectina		Total Geral
	Elevado	Normal	
Elastase < 200 µg/g	9	4	13
> 200 µg/g	3	2	5
Total Geral	12	6	18

FONTE: O autor (2022).

Considerando que p valor = 0,5609 é maior que o nível de significância de 5%, não se pode rejeitar H_0 ; A e B são independentes.

Não foi considerada significativa estatisticamente a associação entre os valores alterados de calprotectina e os de elastase fecal-1. Ou seja, a presença insuficiência pancreática não significa valores maiores de calprotectina, não há evidência de maior inflamação nos insuficientes pancreáticos quando comparados aos suficientes pancreáticos.

4.2.1.6 Teste de Independência - pacientes Fibrose Cística \leq 4 anos.

Foram realizados testes de independência, conforme demonstrado nos quadros abaixo para as diversas variáveis analisadas. A Tabela 9 apresenta um sumário dos testes de associação ou independência.

Os cálculos e resultados em detalhe podem ser obtidos no Apêndice.

TABELA 9 RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CALPROTECTINA (ALTERADA E NORMAL), USO DE MEDICAÇÕES E PRESENÇA DE SINTOMAS EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

Associação	Variável ou Nível	p valor
A=Calprotectina e B=Elastase	Elevado x Alterado	0,5609
A= Calprotectina e B=uso de Enzima	Elevado x Sim	0,8893
A= Calprotectina e B=uso de Antibiótico	Elevado x Sim	0,8344
A= Calprotectina e B=presença de Esteatorreia	Elevado x Sim	0,4561
A= Calprotectina e B=presença de Tosse Crônica	Elevado x Sim	0,4796
A= Calprotectina e B=ocorrência de Internação	Elevado x Sim	0,7781

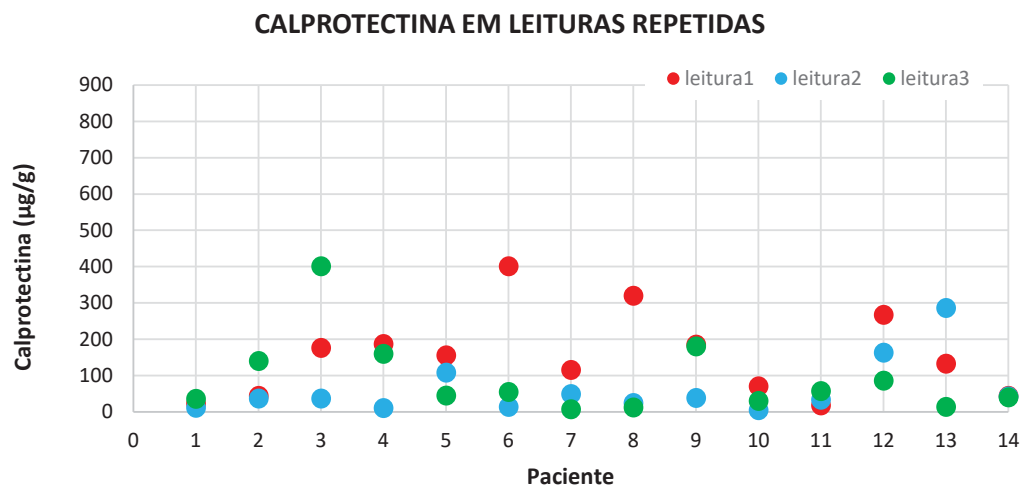
FONTE: O autor (2022).

4.2.1.7 Teste Paramétrico - Análise de Variância ANOVA.

Para análise de variância foi utilizado o método de ANOVA, mesmo com a ressalva da limitação devido aos valores flutuantes da calprotectina fecal. Neste caso foi utilizado o modelo com medidas repetidas (leitura1, leitura2, leitura3) para um conjunto de 14 pacientes.

A Figura 8 apresenta os resultados de calprotectina, por paciente, obtidos nas 3 leituras.

FIGURA 8 NÍVEIS DE CALPROTECTINA EM LEITURAS REPETIDAS PARA PACIENTES ≤ 4 ANOS.



FONTE: O autor (2022).

A análise de variância foi realizada através do teste ANOVA, porém, não houve diferença estatística significativa tanto para pacientes como para leituras dos valores de amostra.

4.2.2 PACIENTES MAIS DE 4 ANOS

4.2.2.1 ScoreZ para medidas de Peso, Altura e IMC

A Tabela 10 apresenta uma síntese dos escores normalizados para os pacientes acima de 4 anos.

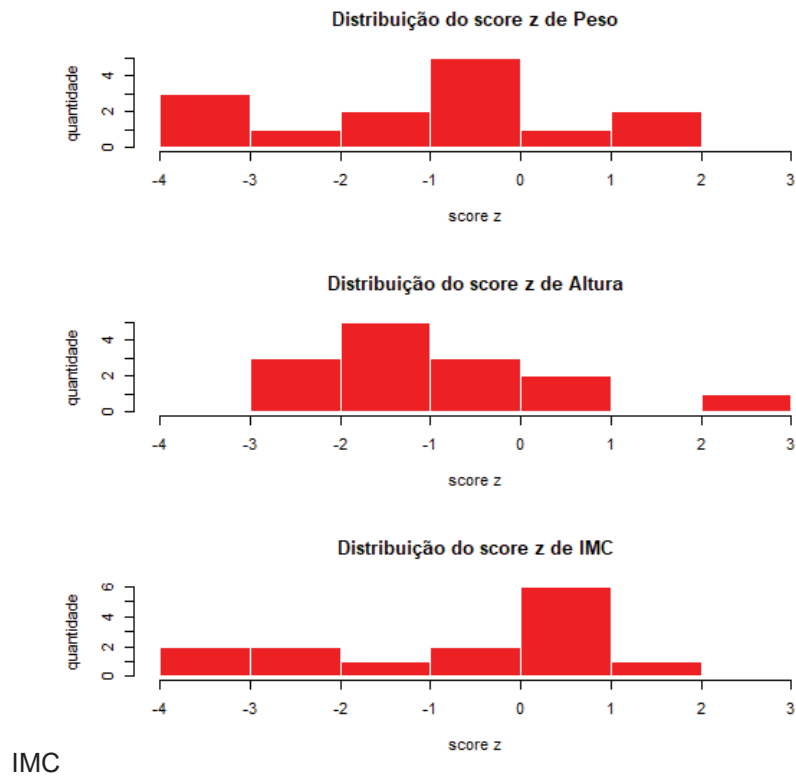
Tabela 10 SÍNTESE DE RESULTADOS AMOSTRAIS DOS ESCORES NORMALIZADOS

Score z	Quartil 1	Mediana	Quartil 3	Média	Desvio-pd	Valor min	Valor max	Amostra
Peso	-2,130	-0,490	-0,115	-1,053	1,628	-3,530	1,430	14
Altura	-1,800	-1,315	-0,383	-1,044	1,322	-2,880	2,370	14
IMC	-1,973	0,050	0,470	-0,664	1,629	-3,940	1,880	14

FONTE: O autor (2022).

A Figura 9 apresenta os histogramas para as variáveis escore normalizado de peso, altura e IMC, no eixo Y é possível verificar a quantidade de pacientes, enquanto no eixo X é possível verificar os valores do score z.

FIGURA 9 HISTOGRAMAS DE SCORE Z DE PESO, ALTURA E



FONTE: O autor (2022).

A Tabela 11 apresenta um sumário das medidas amostrais de pacientes com fibrose cística para duas leituras. O que deve ser observado é a mediana e os quartis, uma vez que a média e desvio padrão são maiores devido à característica de flutuação dos valores de calprotectina.

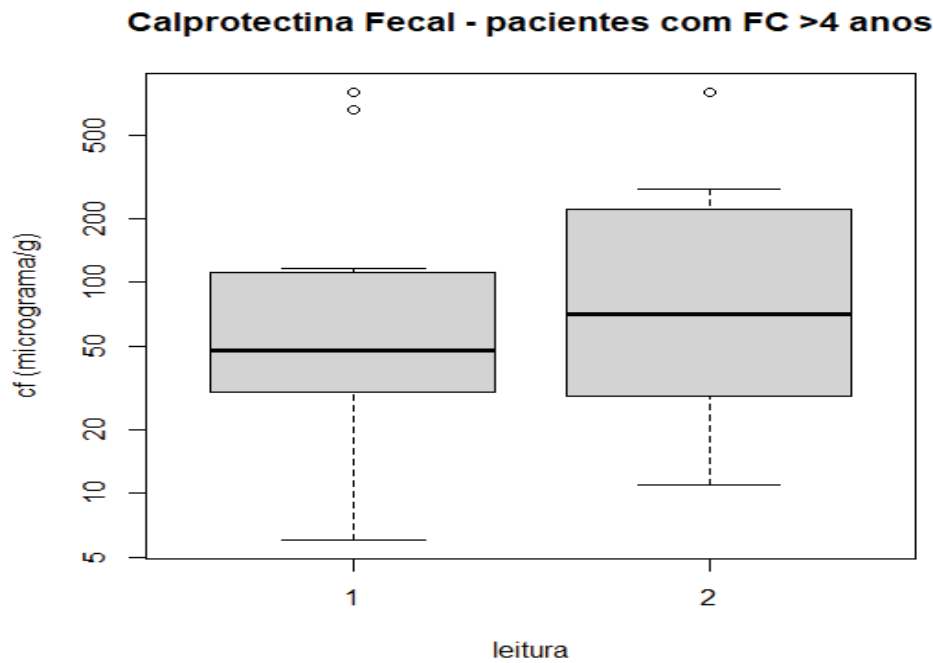
TABELA 11 SÍNTESE DE RESULTADOS AMOSTRAIS CALPROTECTINA FECAL EM PACIENTES COM FC

Leitura	Quartil 1	Mediana	Quartil 3	Média	Desvio-pd	Valor min	Valor max	Amostra
1	30,3	47,5	110,5	151,5	248,5	6	800	17
2	29,0	71,0	223,5	198,1	282,3	11	800	7

FONTE: O autor (2022).

Na Figura 10 são apresentados os resultados de calprotectina, no formato gráfico boxplot, obtidos de duas leituras.

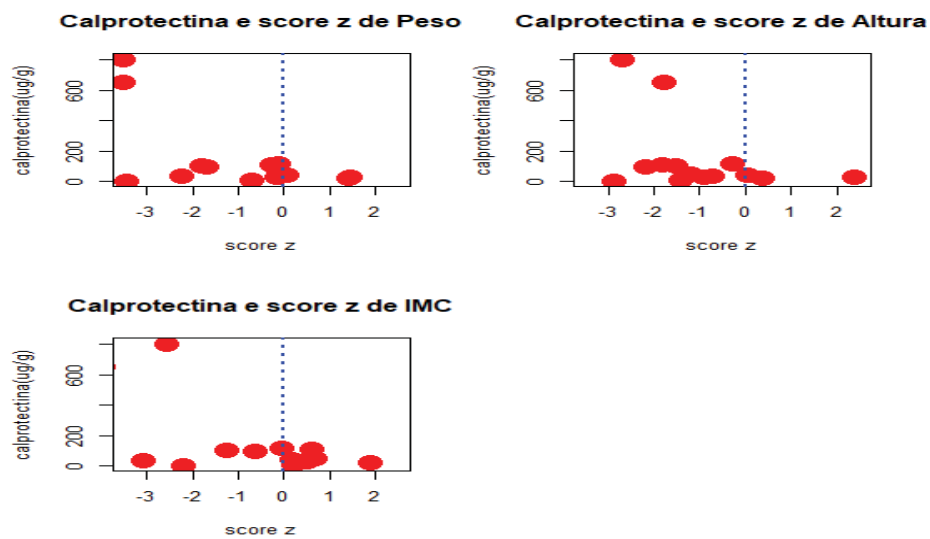
FIGURA 10 NÍVEIS DE CALPROTECTINA EM PACIENTES FIBROSE CÍSTICA MAIORES DE 4 ANOS EM DUAS AVALIAÇÕES



FONTE: O autor (2022).

Na Figura 11 são apresentados três gráficos de dispersão do score z das variáveis Peso, Altura e IMC em relação ao nível de calprotectina fecal.

FIGURA 11 GRÁFICOS DE DISPERSÃO COM RELAÇÃO A CALPROTECTINA FECAL



FONTE: O autor (2022).

À semelhança do que ocorreu com os pacientes de até 4 anos, para as três variáveis demográficas relacionadas com calprotectina fecal, os gráficos de

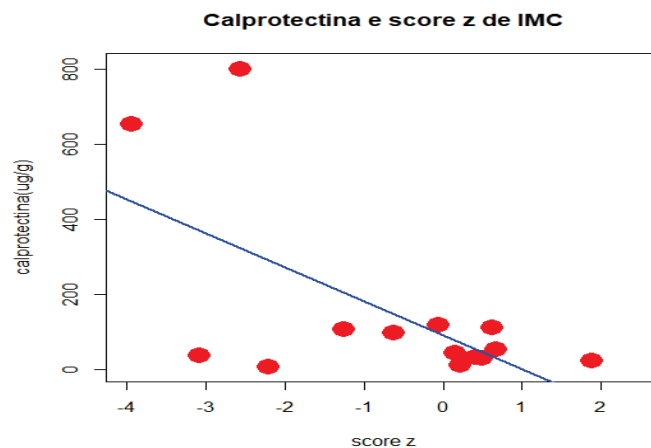
dispersão apresentam um padrão aleatório sem tendência, o que implica em valores baixos de correlação, próximos de zero.

É notável a presença de pontos com score z (abscissa) abaixo de 0, o que mostra uma correlação negativa entre os valores de CLP e as variáveis peso, altura e IMC dos pacientes com FC > 4 anos.

4.2.2.2 Análise de Correlação entre Score Z de IMC e Calprotectina Fecal

A Figura 12 apresenta o gráfico de dispersão do score z de IMC e calprotectina fecal acrescido com uma linha de tendência.

FIGURA 12 RELAÇÃO ENTRE O SCORE-Z DE IMC E NÍVEIS DE CALPROTECTINA FECAL



FONTE: O autor (2022).

Com o aplicativo R, obteve-se uma correlação amostral de $r = -61,57\%$, considerada elevada. O coeficiente angular da linha de tendência, de $b = -90.53$ é significativo, como mostra a medida de p valor de 0,0190 inferior ao nível de significância de 5%, o que indica existência de regressão. Houve uma correlação negativa entre os níveis de calprotectina e score z de IMC, ou seja, quanto mais baixos os níveis de calprotectina, melhor o estado nutricional.

A Tabela 12 apresenta os resultados de correlação e coeficientes de regressão entre escores z e calprotectina fecal.

TABELA 12 CORRELAÇÃO E COEFICIENTES DE REGRESSÃO ENTRE ESCORES Z E CLP FECAL

Y	X	Pontos	Cor (X, Y)	Coef de $Y = a + bX$		Teste t para o coef angular b			
				A	B	Std(b)	tcalc	pvalue	Conclusão
Calprotectina	Score z de Peso	14	0,6119	56,75	89,99	33,58	2,6799	0,0100	Há regressão
Calprotectina	Score z de Altura	14	0,4008	75,67	72,62	47,92	1,5154	0,0778	Não há regressão
Calprotectina	Score z de IMC	14	0,6157	91,36	90,53	30,96	2,9241	0,0064	Há regressão
Calprotectina	Score z de Idade	14	0,1347	151,50	32,27	68,51	0,4710	0,3230	Não há regressão

FONTE: O autor (2022).

4.2.2.3 Teste de Independência - pacientes Fibrose Cística

A Tabela 13 apresenta uma tabela de contingência de dupla entrada relacionando Calprotectina e Elastase para pacientes com fibrose cística, com dados observados na primeira leitura.

TABELA 13 RELAÇÃO DA CALPROTECTINA E ELASTASE PARA PACIENTES COM FC.

Elastase	Calprotectina		Total Geral
	Elevado	Normal	
Alterado	7	6	13
Normal	0	1	1
Total Geral	7	7	14

FONTE: O autor (2022).

Considerando que p valor = 0,5000 é maior que o nível de significância de 5%, não se pode rejeitar H_0 : as proporções são independentes. Não há significância estatística entre as variáveis.

A Tabela 14 apresenta um sumário dos testes de associação ou independência.

TABELA 14 ANÁLISE DE REGRESSÃO PARA AS VARIÁVEIS ELASTASE E CALPROTECTINA, TRATAMENTO, SINTOMAS CLÍNICOS E INTERNAÇÃO

Associação	Variável ou Nível	p valor
A=Calprotectina e B=Elastase	Elevado x Alterado	0,5000
A= Calprotectina e B=uso de Enzima	Elevado x Sim	0,5000
A= Calprotectina e B=uso de Antibiótico	Elevado x Sim	0,5000
A= Calprotectina e B=presença de Esteatorreia	Elevado x Sim	0,8569
A= Calprotectina e B=presença de Tosse Crônica	Elevado x Sim	0,2960
A= Calprotectina e B=ocorrência de Internação	Elevado x Sim	0,0962

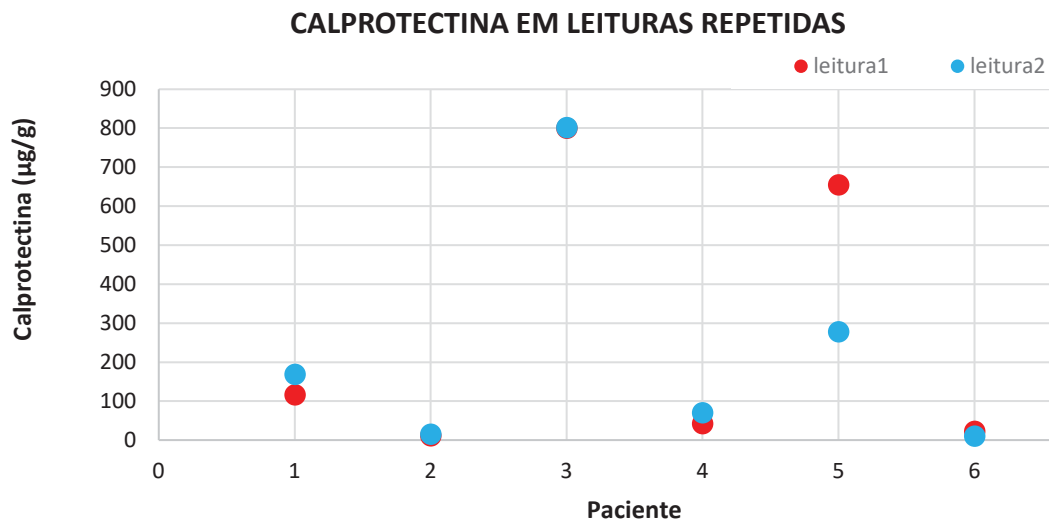
FONTE: O autor (2022).

NOTA: A=Nível de Calprotectina e B=uso de Enzima

No teste paramétrico realizado, não foi encontrada diferença significativa entre as médias de calprotectina fecal observadas nas duas leituras.

A Figura 13 apresenta os resultados de calprotectina fecal por paciente em 2 leituras.

FIGURA 13 RESULTADOS DE CALPROTECTINA FECAL POR PACIENTE EM 2 LEITURAS: GRUPO > 4 ANOS.



FONTE: O autor (2022).

5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, 13 dos 19 pacientes do grupo ≤ 4 anos apresentaram resultados de CLP alterados. Para os pacientes do grupo acima de 4 anos, 8 dos 15 pacientes apresentaram níveis de CLP acima dos níveis considerados normais. O estudo feito em Sydney, na Austrália, (GARG, *et al.*), demonstrou em seu resultado que os níveis de calprotectina em crianças ≤ 4 anos eram menores para pacientes com FC em relação a pacientes saudáveis, alegando existir desde o nascimento uma característica singular para o ambiente intestinal de pacientes fibrocísticos.

No presente estudo o oposto foi encontrado, pacientes com FC apresentaram níveis de CLP mais altos em relação aos pacientes saudáveis, que apresentaram níveis normais, à exceção de um paciente com nível discretamente alterado. No entanto, nossas coletas iniciaram aos três meses de vida, o que pode explicar a diferença para essas mensurações quando comparado ao estudo em questão que iniciou as coletas a partir de um mês de idade.

Além disso, o valor de referência para calprotectina não parece ser confiável para crianças abaixo de 4 anos, e os critérios de exclusão entre os estudos são diferentes, uma vez que nosso estudo não excluiu pacientes com sintomas agudos ao momento da coleta.

O estudo de Parisi *et al.* Avaliou 54 pacientes com FC e 50 pacientes saudáveis e encontrou diferenças nas mensurações de calprotectina para ambos os grupos, com uma média de 598.7 ± 277.5 para FC e de 48.4 ± 34.0 para saudáveis, corroborando com o encontrado em nosso estudo. Entretanto, a variação de idade era maior do que a da atual pesquisa, incluindo também adultos na análise.

Ellemunter *et al.* (2018) publicaram uma carta ao editor comparando seus dados com o do estudo de Garg *et al.* e, para crianças abaixo de 4 anos, encontraram valores de CLP alterados em pacientes com FC, bem como em pacientes saudáveis. Apesar de não termos encontrado valores consideravelmente alterados em nossos pacientes saudáveis, o estudo também demonstra a alteração da calprotectina desde poucos meses de vida em pacientes com FC. Esse resultado reforça a indicação de cautela ao utilizar CLP fecal em crianças menores de quatro anos (GARG *et al.*, 2017).

Alguns estudos apontaram que a coleta diretamente da fralda pode ser prejudicada, pois esta absorve aproximadamente 30% da água das fezes,

umentando a concentração de calprotectina fecal (OLLAFSDOTIR *et al.*,2002). Em nosso estudo, apesar de ter sido realizada coleta direto da fralda, houve o cuidado de realizar a coleta da porção superficial das fezes, que não estava em contato com o material da fralda, poucos minutos após a evacuação dos pacientes.

Nesta pesquisa os níveis de CLP não apresentaram associação com o escore-z para peso, IMC e altura nos pacientes com FC, nota-se, no entanto, que os pacientes acima de 4 anos apresentaram correlação negativa entre estas variáveis e aumento da CLP, o que pode indicar relação da inflamação intestinal com o comprometimento dos parâmetros de crescimento dos pacientes.

Em outros estudos, os níveis de CLP fecal vêm sendo correlacionados negativamente com os parâmetros de crescimento (peso e altura) em pacientes com FC, isto parece indicar que a presença da inflamação intestinal está associada ao comprometimento destes parâmetros (DHALIWAL, 2015; GARG, OOI, 2017).

Além disso, níveis mais altos de CLP foram encontrados em pacientes com mais de 4 anos no estudo de Garg *et al.* (2017), sendo assim, o grupo relacionou a idade com níveis mais altos de calprotectina fecal. No presente estudo, 7 dos 15 pacientes tiveram valores alterados de calprotectina fecal, enquanto 8 apresentaram valores normais. Houve uma variação aleatória nos valores de calprotectina fecal em nossos pacientes, não sendo demonstrado um crescimento ou decréscimo de para qualquer um dos grupos conforme evolui a idade.

Nos casos de valores mais extremos, característicos de doença intestinal, um dos pacientes estava em um quadro de exacerbação pulmonar (valor > 600µg/g) e ainda iria iniciar o tratamento, e outro apresentava um possível quadro de aspergilose broncopulmonar alérgica no momento da coleta (valor 800µg/g), que pode ter influenciado nos valores.

Imanzadeh *et al.* (2022) verificaram níveis alterados de calprotectina com a presença de exacerbação pulmonar em pacientes com FC, e houve redução dos valores com o uso antimicrobianos.

O estudo de Schnapp *et al.* (2019) avaliou os níveis de CLP antes do tratamento com antibióticos para exacerbação pulmonar e após e encontrou resultados demonstrando a redução dos valores de CLP fecal após o tratamento, assim como o estudo de Imanzadeh *et al.* Em nosso estudo, não foi encontrada interferência significativa quando analisado o uso de antibiótico no momento da

coleta. O grupo de Schnapp *et al.* sugeriu que o tratamento da inflamação respiratória poderia induzir alterações no sistema intestinal.

Essa teoria pode ser válida e deve ser mais estudada para melhor compreensão, no entanto, alguns estudos sugerem a hipótese da existência do eixo intestino-pulmão descrito em doenças como asma, também para a FC. O eixo intestino-pulmão pode ser entendido como a influência da microbiota intestinal na doença respiratória, seja no curso ou resultado desta (PRICE, TOOLE, 2021). Um estudo analisou a relação do microbioma intestinal e respiratório de crianças com FC verificando a interação entre os dois sistemas e a relação com o estado nutricional. Os resultados sugeriram que a colonização do sistema respiratório por alguns microrganismos é precedida pela colonização do intestino por estes mesmos microrganismos (MADAN *et al.*, 2012).

Em nosso estudo, não foi encontrada associação significativa entre a exacerbação pulmonar e os valores alterados de calprotectina, nem mesmo uso de antibióticos e valores alterados de calprotectina, entretanto, é possível que isso tenha acontecido devido ao baixo número de pacientes incluídos no estudo. Uma amostra maior poderia refletir resultados mais significativos para esta associação.

Em geral, os níveis de CLP mantiveram-se dentro da normalidade para os pacientes saudáveis durante as três coletas, com apenas uma exceção sutilmente acima do valor de referência. Pacientes com FC apresentaram, na maioria dos casos, uma diminuição nos níveis de calprotectina nas coletas posteriores em relação à primeira. Isso pode ocorrer devido ao fato de iniciarem os tratamentos específicos para a doença, na maioria dos casos, impactando na qualidade de vida. Exceto para os casos nos quais o paciente apresentou fenótipo leve da doença (DE CASTRO, FIRMIDA, 2014).

Não foi encontrada relação entre as variáveis uso de enzimas, uso de antibióticos, tosse crônica, necessidade de internação, presença de esteatorreia, sintomas gastrintestinais e respiratórios. A alteração de calprotectina não foi significativamente afetada por essas variáveis. Esses resultados são semelhantes aos observados por Więcek *et al* em 2017, onde foram avaliados os níveis de calprotectina em 41 pacientes entre 7 semanas e 18 anos de idade. Os autores concluem que níveis elevados de calprotectina forma observados em pacientes com FC, mas não houve correlação com o genótipo, IMC, sintomas respiratórios e IP.

No estudo de Więcek *et al.* (2017) 41 pacientes foram avaliados. Apenas 4 apresentaram alterações nos níveis de calprotectina, porém, o grupo também não encontrou associação entre as manifestações clínicas, como sintomas respiratórios e gastrintestinais e alterações de CLP.

Uma pesquisa realizada em Wisconsin, EUA, avaliando um total de 52 participantes com FC também não encontrou associações significativas entre variáveis como sintomas gastrintestinais, uso de enzimas, ou probióticos, número de exacerbações pulmonares e internamentos (RUMMAN, *et al.*).

A calprotectina fecal é utilizada em diversas doenças como marcador de inflamação intestinal, e embora na FC ela não apresente essa mesma característica, o fato de estar elevada tanto em pacientes SP quanto IP pode ser um sinal de uma enteropatia na fibrose cística.

Dos pacientes acima de 4 anos que apresentaram níveis alterados de CLP, 3 apresentaram a mutação DF508 em homozigose, 2 em heterozigose e 2 apresentaram a mutação G542X em homozigose. Para os pacientes < 4 anos, 8 tinham a mutação DF508 e 2 a mutação G542X. Sabe-se que estas mutações são conhecidas por causar fenótipos graves da doença, caracterizando, geralmente, insuficiência pancreática, doença pulmonar ativa, entre outros.

Uma revisão sistemática e de meta-análise realizada no ano de 2022 analisou diversos estudos sobre calprotectina fecal em FC publicados e chegaram também à conclusão de que o marcador em questão é útil para a detecção de inflamação intestinal, bem como a severidade da doença nos pacientes (TALEBI, DAY, REZAIYAN, M.K., 2022).

A proteína CFTR é amplamente expressa no epitélio intestinal, estando o genótipo do CFTR associado ao transporte de sais através do tecido intestinal, além disso, alguns mecanismos através dos quais a inflamação intestinal ocorre são propostos, bem como a disbiose, aumento da permeabilidade intestinal, dismotilidade (TAM, VAN DORST, MCKAY, *et al.*, 2022). É possível que a alteração da CLP esteja associada, assim como a condição pancreática, à gravidade da doença, uma vez que os pacientes com outras mutações não apresentaram as alterações que os pacientes com mutações graves apresentaram.

Um estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre fez a mensuração da EL-1 para 51 pacientes com FC. Dez dos participantes apresentaram níveis acima de 200 ug/g, enquanto 41 apresentaram níveis abaixo

dos valores de referências, considerados alterados, não houve nenhum paciente que tenha apresentado valores entre 100 e 200 ug/g, considerados como insuficiência moderada (GONZALES, *et al.*, 2011).

No presente estudo apenas 1 paciente de 35 foi enquadrado no grupo definindo como insuficiência moderada. Dos nossos pacientes, apenas 6 de 35 apresentaram níveis considerados normais do marcador, enquanto 28 apresentaram níveis considerados como alterados para insuficiência grave.

O estudo de Tardelli *et al.* (2013) comparou métodos de diagnóstico de insuficiência pancreática, sendo um deles a Elastase Fecal-1. O grupo de pesquisa definiu os valores de referências semelhantes ao nosso, devido ao uso do kit, e encontraram todos os pacientes abaixo de 100 ug/g. Eles consideraram que a despeito do uso de outros métodos, a EL-1 deve ser utilizada para confirmação da Insuficiência Pancreática.

Um dos diferenciais da EL-1 como marcador de função pancreática encontra-se no fato de a elastase pancreática ser uma enzima que não é degradada em seu trânsito, encontrando-se em concentrações maiores nas fezes. Por esse motivo, hoje é considerada amplamente como um marcador para uso em FC. Além disso, a utilização de enzimas pancreáticas para melhora da absorção de nutrientes não afeta as mensurações (AMANQUASH *et al.*, 2004; RAHMAN *et al.*, 2006).

O nosso estudo demonstrou que mesmo quando os pacientes faziam uso de enzimas, os resultados de elastase fecal continuaram alterados. Dos pacientes em tratamento com enzimas, apenas um estava dentro do grupo considerado IP moderada, e um no grupo de pacientes com Suficiência Pancreática.

Apesar disso, isso não significa que os pacientes não possam se tornar Insuficientes Pancreáticos. Estudos demonstram que pacientes com FC costumam evoluir para uma condição pancreática exócrina de insuficiência, ao decorrer do tempo, principalmente quando apresentam ao menos um alelo para mutação considerada grave.

Estudos que relacionam genótipo e fenótipo da Fibrose Cística demonstraram a existência de doença grave pancreática relacionada às mutações de classes consideradas graves como I e II (CADE *et al.*, 2000; DAFTARY *et al.* 2006), isso se refletiu no presente estudo, no qual foi encontrada a informação de que 80% dos pacientes (28) apresentavam as mutações DF508 em heterozigose ou homozigose, e G542X em heterozigose e homozigose.

A apresentação de um fenótipo grave nesses casos ocorre, pois, as consequências das alterações genéticas se apresentam devido aos níveis baixos da proteína madura ou inibição da formação da mesma para a classe I e, para a classe II, a proteína não alcança a membrana para funcionar como canal de Cloreto (SARAIVA-PEREIRA, FITARELLI-KIEHL, SANSEVERINO, 2011).

Foi avaliado se existe uma correlação entre alterações nos níveis de EL-1 e de CLP através das mensurações realizadas e, não houve associação significativa entre os níveis dos marcadores. Embora os níveis de CLP e EL-1 tenham aparecido alterados em um mesmo momento, a IP não apresentou significância como uma causa para alteração da CLP.

O presente estudo encontrou a correlação entre o genótipo e fenótipo da doença, e para os casos de alteração nos níveis de CLP deve-se considerar o acompanhamento de manifestações respiratórias, colonizações, análise de microbioma, entre outros.

A apresentação de um fenótipo grave nesses casos ocorre, pois, as consequências das alterações genéticas se apresentam devido aos níveis baixos da proteína madura ou inibição da formação da mesma para a classe I e, para a classe II, a proteína não alcança a membrana para funcionar como canal de Cloreto (SARAIVA-PEREIRA, FITARELLI-KIEHL, SANSEVERINO, 2011).

Rumman *et al.* Encontraram em seu estudo 10 pacientes considerados SP com níveis de CLP alterados. Para o nosso estudo, 3 dos 6 pacientes com resultados de EL-1 considerados SP apresentaram níveis de CLP elevados, enquanto 17 dos 35 pacientes considerados IP apresentaram níveis de CLP elevados. Uma das explicações levantadas pelos estudiosos é a de que, a despeito da doença pancreática, os níveis de CLP podem aparecer alterados devido ao fato de a CLP ser um marcador de inflamação, esta que é presente na doença como um todo (RUMMAN *et al.*, 2014).

O estudo de Ellemunter *et al.* realizado na Áustria encontrou valores mais altos para pacientes com Insuficiência Pancreática (2061 pacientes), bem como o estudo de Dhaliwal *et al.* e Warlin *et al.* Dhaliwal *et al.* consideraram a opção de existir uma relação entre a inflamação intestinal e a gravidade da alteração da CFTR, assim como no caso da apresentação da IP (WERLIN *et al.*, 2010; DHALIWAL *et al.*, 2015; ELLEMUNTER *et al.*, 2017).

A condição pancreática da fibrose cística é muito bem descrita e delineada em seus mecanismos, o que difere da inflamação intestinal, que ainda vem sendo estudada para ser entendida.

Nosso estudo apresenta como limitações o fato de ter um número pequeno de pacientes incluídos, não terem sido utilizadas metodologias consideradas padrão para comparação dos resultados dos marcadores, e baixa adesão dos pacientes ao estudo. Possivelmente um número maior de participantes e uma delimitação maior das variáveis possa vir a trazer associações significativas entre elas.

Além disso, a observação de níveis de calprotectina fecal em pacientes nos primeiros anos de vida pode ser evidência de presença de inflamação, de enteropatia precoce em pacientes com FC.

Não foram excluídos pacientes com sintomas agudos que podem interferir nos resultados. No entanto, variáveis como IMC que não sofrem alterações em quadros agudos tiveram associação com inflamação intestinal

6 CONCLUSÃO

Foi observada alteração dos níveis de CLP principalmente nos pacientes < 4 anos, enquanto alguns mantiveram valores alterados em presença de outras manifestações clínicas, outros apresentaram diminuição dos valores com o avançar da idade.

Os pacientes > 4 anos com níveis mais altos apresentaram sintomas clínicos específicos, podendo indicar uma relação com a inflamação sistêmica, e não apenas intestinal.

A CLP parece ser um eficaz marcador quando relacionado à inflamação sistêmica causada pela fibrose cística, podendo ser melhor compreendida neste âmbito.

Além disso, a EL-1 apresentou níveis alterados (reduzidos) em pacientes considerados com FC considerados insuficientes pancreáticos

Demonstrando ser um marcador de função pancreática, útil para acompanhamento da doença nos pacientes fibrocísticos e decisão de ajuste de dose.

Não houve correlação com as variáveis clínicas avaliadas ou associação com os genótipos. A avaliação sequencial das amostras não demonstrou diferença significativa.

Considera-se de importância uma amostra de pacientes maior para tornar possível a correlação entre fatores que ficaram de fora no presente estudo.

A CLP e EL-1 em conjunto demonstram ser grandes aliadas no acompanhamento do paciente, podendo auxiliar em decisões médicas relacionadas a tratamentos e intervenções, inclusive na decisão do melhor momento para alteração do uso de enzimas e inclusão de tratamentos como probióticos.

6.1. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A Fibrose Cística é uma doença que vem sendo estudada há anos para compreensão de seus mecanismos e com avanços recentes no tratamento, tais como o uso dos modeladores da proteína CFTR. Muitas manifestações foram bem elucidadas quanto à sua causa, no entanto, a inflamação intestinal permanece uma incógnita, bem como o uso da calprotectina fecal para mensuração desta. Estudos

com uma amostra de pacientes maior e associação dos sintomas ao momento da coleta devem ser feitos para melhor elucidar a função deste marcador na doença, bem como estudos para compreensão do mecanismo definitivo da inflamação intestinal em FC.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, D. H. CYSTIC FIBROSIS OF THE PANCREAS AND ITS RELATION TO CELIAC DISEASE: A CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDY. **American Journal of Diseases of Children**, V. 56, N. 2, P. 344–399, 1938. doi:10.1001/archpedi.1938.01980140114013

ADRIAANSE, M. P. M *et al.* Evidence for a cystic fibrosis enteropathy. **PLoS ONE**, v. 10, p. 101–15, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138062>>.

BAKER, S. S.; BOROWITZ, D.; BAKER, R. D. Pancreatic exocrine function in patients with cystic fibrosis. **Current Gastroenterology Reports**, v. 7, n. 3, p. 227–233, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11894-005-0039-4>>.

BHATTACHARYA, K.; WOTTON, T.; WILEY, V. The Evolution of blood-spot newbornscreening. **Translational Pediatrics**, v. 3, n. 2, p. 63-70, Apr. 2014 doi: 10.3978/j.issn.2224-4336.2014.03.08. PMID: 26835325; PMCID: PMC4729101.

CADE A. *et al.* Evaluation of fecal pancreatic elastase-1 as a measure of pancreatic exocrine function in children with cystic. **Pediatric Pulmonology**, v. 29, n. 3, p. 172–176, 2000.

CHAUDARY, N. Triplet CFTR modulators: future prospects for treatment of cystic fibrosis. **Therapeutic and Clinical Risk Management**, v. 6, n. 14, p. 2375-2383, 2018. Decdoi: 10.2147/TCRM.S147164. PMID: 30584312; PMCID: PMC6287538.

DE BOECK, K.; AMARAL, M. D. Progress in therapies for cystic fibrosis. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 4, n. 8, p. 662–674, 2016. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00023-0)>.

DE CASTRO, M.C; FIRMIDA, M.C. O Tratamento na Fibrose Cística e suas Complicações. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto (TÍTULO NÃO-CORRENTE)**, [S.l.], v. 10, n. 4, dez. 2014. ISSN 1983-2567. Disponível em: <<https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/8882/6765>>. Acesso em: 29 dez. 2022.

DE LISLE, R. C.; BOROWITZ, D. The cystic fibrosis intestine. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 9, p. 009753, sep. 2013. Doi: 10.1101/cshperspect.a009753.

DEL CIAMPO, I. R. L. *et al.* Manifestações precoces da fibrose cística em paciente prematuro com íleo meconial complexo ao nascimento. **Rev. paul. pediatr**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 241-245, June. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-05822015000200241&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: Abril de 2021.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000683>>.

DOMINGOS, M. T. *et al.* Sweat conductivity and coulometric quantitative test in neonatal cystic fibrosis screening. **Jornal de Pediatria**, n. 91, v. 6, p. 590–595, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2015.03.003>>.

DOMÍNGUEZ-MUÑOZ, J. E. *et al.* Potential for Screening for Pancreatic Exocrine Insufficiency Using the Fecal Elastase-1 Test. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 62, n. 5, p. 1119–1130, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10620-017-4524-z>>.

EGAN, M. E. Genetics of Cystic Fibrosis: Clinical Implications. **Clin Chest Med**, v. 37, n. 1, p. 9-16, mar. 2016. Doi: 10.1016/j.ccm.2015.11.002. PMID: 26857764.

ELBORN, J. S. Cystic fibrosis. **The Lancet**, n. 388, v.10059, p. 2519–2531, 2016. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00576-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6)>.

ELLEMUNTER, H *et al.* Fecal Calprotectin in Cystic Fibrosis and Its Relation to Disease Parameters. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 438–442, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/mpg.0000000000001544>>.

ENAUD, R. *et al.* Intestinal Inflammation in Children with Cystic Fibrosis Is Associated with Crohn's-Like Microbiota Disturbances. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 5, p. 645, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jcm8050645>>.

FIRMIDA, M. D. C. Aspectos Epidemiológicos da Fibrose Cística. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, p. 11-22. 2011.

FIRMIDA, M. D.; MARQUES, B. L.; COSTA, C. H. Fisiopatologia e Manifestações Clínicas da Fibrose Cística. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**. 2011. Disponível em: <http://bjhbs.hupe.uerj.br/WebRoot/pdf/72_pt.pdf>. Acessado em: janeiro de 2020.

GARG, M.; LEACH, S. T.; COFFEY, M. J. *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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.03.010>>.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11894-017-0546-0>>.

GIBSON-CORLEY, K. N. *et al.* Pancreatic pathophysiology in cysticfibrosis. **The Journal of pathology**, v. 238, n. 2, p. 311–320. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/path.4634>>.

GONZALES, A. C. S. **Avaliação Da Insuficiência Pancreática Pelo Teste Elastase-1 Fecal Em Pacientes Pediátricos Com Fibrose Cística Portadores Da Mutação Δ F508**. 2010. 100 fl. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Setor - Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/26944/000762482.pdf?>>.

Acessado em: maio de 2019.

GONZALES, A. C. S. *et al.* Utilidade da concentração da elastase-1 fecal monoclonal na avaliação da função pancreática nos pacientes com fibrose cística. **Jornal de Pediatria [online]**, v. 87, n. 2, p. 157-162, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0021-75572011000200012>>. Acessado em: dezembro de 2022.

GORTER, R.R. *et al.* Clinical and genetic characteristics of meconium ileus in newborns with and without cysticfibrosis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 50, n. 5, p. 569-72, maio. 2010. Doi: 10.1097/MPG.0b013e3181bb3427. PMID: 20386322.

HAACK, A.; NOVAES, G.M.R. Atención multidisciplinaria em la fibrosis quística; una revisión clínica y nutricional. **Nutricion Hospitalaria**, v. 27, n. 2, p. 362–371, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.2.5442>>.

IMAZANDEH, F.; KERAMI, F.; HASSANZAD, M. *et al.* The association of fecal calprotectin and respiratory exacerbation in cystic fibrosis patients. **BMC Gastroenterol**, v. 22, p.494, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12876-022-02553-x>

KEREM, B; ROMMENS, J.M.; BUCHANAN, J.A., *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1073-1080, 1989. doi:10.1126/science.2570460

KONSTAN, M.W.; Berger, M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: on set and etiology. **Pediatric Pulmonology**, v. 24, n. 2, p. 137-42, aug. 1997. Doi: 10.1002/(sici)1099-0496(199708)24:2<137:aid-ppul13>3.0.co;2-3. PMID: 9292910.

LAZZAROTTO, E. S. *et al.* Systematic review on fecal calprotectin in cystic fibrosis. **Jornal de Pediatria**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jped.2022.01.006>>.

LEE, J. M. *et al.* Update of Faecal Markers of Inflammation in Children with Cystic Fibrosis. **MediatorsofInflammation**, v. 2012, p. 1–6, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2012/948367>>.

LI, F.; MA, J.; GENG, S. *et al.* Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119574>>.

LI, L.; SOMERSET, S. Digestive system dysfunction in cysticfibrosis: challenges for nutrition therapy. **Digestive and Liver Disease**, v. 46, n. 10, p. 865-74, jul. 2014. doi: 10.1016/j.dld.2014.06.011. PMID: 25053610.

LUBAMBA, B; DHOOGHE, B *et al.* Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 15, p. 1132-44, jun. 2012. Doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.05.034. PMID: 22698459.

MANCEAU, H. *et al.* Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: Update and perspectives. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 55, n. 4, p. 474–483, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0522>>.

MARSON, F. A. L.; BERTUZZO, C. S.; RIBEIRO, J. D. Classification of CFTR mutation classes. **Lancet Respiratory Medicine**, v. 4, n. 8, p. e37-e38, 2016. Doi: 10.1016/S2213-2600(16)30188-6. PMID: 27377414.

MOTA, L. R. *et al.* Estudos genéticos sobre a Fibrose Cística no Brasil: uma revisão sistemática. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 14, n. 2, p. 238-245, mai./ago. 2015. Disponível em: <<https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/13893/10846>>. Acesso em: janeiro 2021.

MUNCK, A. Cystic fibrosis: evidence for gut inflammation. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 52, p. 180-3, jul. 2014. Doi: 10.1016/j.biocel.2014.02.005. PMID: 24548777.

NIKNAZ, Z. *et al.* Does probiotic supplementation affect pulmonar exacerbation and intestinal inflammation in cystic fibrosis: a systematic review of randomized clinical

trials. **World Journal of Pediatrics**, v. 13, n. 4, p. 307–313, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12519-017-0033-6>>.

NOONE, P. G.; KNOWLES, M. R. 'CFTR-opathies': disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. **Respiratory Research**, v. 2, n. 6, p. 328-32, aug. 2001. doi: 10.1186/rr82. PMID: 11737931; PMCID: PMC64805.

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, p. 45-50, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2002.tb01638.x>>.

OOI, C. Y.; DURIE, P. R. Cystic fibrosis from the gastroenterologist's perspective. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 3, p. 175–185, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.226>>.

PARISI, G. F. *et al.* Severe disease in Cystic Fibrosis and fecal calprotectin levels. Italy, **Immunobiology**, v. 222, n. 3, p. 582–586, Nov. 2017. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2016.11.005>>.

PATHIRANA, W. P. N. G. W. *et al.* Faecal calprotectin. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 39, n. 3, p. 77–90, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.07.005>>.

QUINTON, P.M. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. **Physiology (Bethesda)**, v. 22, n. 3, p. 212-25, Jun. 2007. doi: 10.1152/physiol.00041.2006. PMID: 17557942.

RAHMAN, H.A; WAHAB, A.A; RAHMAN, M. O.A; MOSTAFA, O. A. R. Faecal elastase-1 concentration in cystic fibrosis patients with CFTR I1234V mutation. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 95, n. 9, p. 1066–1069, 2006.

RASKIN, S. Estudo multicêntrico de bases da genética molecular e da epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras [teste]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2001.

REIS, F. J. C; DAMACENO, N. Fibrose Cística. **Jornal de Pediatria**, v. 74, n. 1, p. 76-94, 1998.

RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M. A. G. O.; RIBEIRO, A. F. Controversies in cysticfibrosis – from pediatrician to specialist. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 8, p. 171–186, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.2223/jped.896>>.

RIORDAN, J. R.; ROMMENS, J. M.; KEREM, B. S., *et al.* Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1066-1073, 1989. doi:10.1126/science.2475911. Disponível em: <www.sciencemag.org>.

ROGERS, G. B.; HOFFMAN L. R.; JOHNSON, M. W., *et al.* Using bacterial biomarkers to identify early indicators of cystic fibrosis pulmonar exacerbation on set. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 11, n. 2, p. 197-206, 2011. doi:10.1586/erm.10.117.

ROMMENS, J.M., IANNUZZI, M.C., KEREM, B., *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. **Science**, V. 245, N. 4922, P. 1059-1065, 1989. doi:10.1126/science.277265

RUMMAN, N.; SULTAN, M.; EL-CHAMMAS, K.; *et al.* Calprotectin in Cystic Fibrosis. **BMC Pediatrics**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2014.

SANDY, Natascha S. *et al.* Distal intestinal obstruction syndrome: a diagnostic and therapeutic challenge in cystic fibrosis,. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 96, n. 6, p. 732-740, Dec. 2020. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572020000600732&lng=en&nrm=iso>.

SARAIVA-PEREIRA, M. L.; FITARELLI- KIEHL; SANSEVERINO, M. T. V. A *Genética Na Fibrose Cística*. v. 31, n. 2, p. 160-167, 2011.

SATHE, M. N.; FREEMAN, A. J. Gastrointestinal, Pancreatic, and Hepatobiliary Manifestations of Cystic Fibrosis. **PediatricClinicsof North America**, v. 63, n. 4, p. 679–698, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2016.04.008>>.

SERVIDONI, Maria Fátima *et al.* Teste do suor e fibrose cística: panorama da realização do teste em centros públicos e privados do estado de São Paulo. **J. bras. pneumol.** São Paulo, v. 43, n. 2, p. 121-128, Apr. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132017000200121&lng=en&nrm=iso>.

SHERWOOD, R.; WALSHAM, N. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 2019, n.9, p. 21-29, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/CEG.S51902>>.

SILVEIRA, Déborah Aragão de Pinho. Revisão Sistemática e Metanálise sobre o Teste de Suor pela medida da condutividade no diagnóstico de Fibrose Cística: Uma alternativa em países em desenvolvimento? 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher, Instituto Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, 2016.

SINGH, V. K.; SCHWARZENBERG, S. J. Pancreatic insufficiency in Cystic Fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 16, p. S70–S78, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.06.011>>.

SMYTH, R. L. *et al.* Intestinal inflammation in cystic fibrosis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 84, n. 4, p. 374, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/adc.84.4.373c>>.

SOMAYAJI, R. *et al.* Common clinical features of CF (respiratory disease and exocrine pancreatic insufficiency). **Presse Medical**, v. 46, n. 6 p. 109-e124, jun. 2017. Doi: 10.1016/j.lpm.2017.03.021. PMID: 28554722.

TALEBI, S.; DAY, A. S.; REZAIYAN, M.K.; *et al.* Fecal Calprotectin and Phenotype Severity in Patients with Cystic Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition**, v. 25, n.1, p. 1–12, 2022. <https://doi.org/10.5223/pghn.2022.25.1.1>

TAM, R. Y.; VAN DORST, J. M.; MCKAY, I.; *et al.* Intestinal Inflammation and Alterations in the Gut Microbiota in Cystic Fibrosis: A Review of the Current Evidence, Pathophysiology and Future Directions. **Journal of clinical medicine**, v. 11, n. 3, p. 649, 2022. <https://doi.org/10.3390/jcm11030649>

TARDELLI, A. C. S.; CAMARGOS, P. A. M.; PENNA, F. J *et al.* Comparison of diagnostic methods for pancreatic insufficiency in infants with cystic fibrosis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 56, n. 2, p. 178–181, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31826f2b71>>.

THURSFIELD, R. M.; DAVIES, J.C. Cystic fibrosis: therapies targeting specific gene defects. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 13, n. 4, p. 215-9, maio. 2012. Doi: 10.1016/j.prrv.2012.04.003. PMID: 23069118.

VALLIÈRES, E.; ELBORN, J. Cystic fibrosis gene mutations: evaluation and assessment of disease severity. **Advances in Genomics and Genetics**, v. 4, p. 161-172, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/AGG.S53768>>.

VAOS, G. *et al.* The role of calprotectin in pediatric disease. **BioMed Research International**, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2013/542363>>.

WALI, P. D. *et al.* Comparison of fecal elastase-1 and pancreatic function testing in children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 54, n.2, p. 277–280, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31820b0227>>.

WALKOWIAK, J *et al.* Pancreatic Elastase-1 Quick Test for rapid assessment of pancreatic status in cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 15, n. 5, p. 664–668, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcf.2016.05.009>>.

WILSCHANSKI, M.; Novak, I. The cystic fibrosis of exocrine pancreas. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 3, p. a009746, maio. 2013. Doi: 10.1101/cshperspect.a009746. PMID: 23637307; PMCID: PMC3633181.

ZIEGLER, M. M. Meconium ileus. **Current Problems in Surgery**, v. 31, n. 9, p. 731-77, 1994. Doi: 10.1016/0011-3840(94)90040-x. PMID: 8062591.

APÊNDICE 1–TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Nelson Augusto Rosário Filho, Eduarda Sampaio Lazzarotto, Jannaina Ferreira de Melo Vasco, Cristine Secco Rosário, Carlos Antonio Riedi, pesquisadores do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando seu filho, com diagnóstico de Fibrose Cística, a participar de um estudo intitulado *Avaliação da calprotectina fecal e da elastase-I fecal como marcadores inflamatórios intestinais na Fibrose Cística*. A Fibrose Cística, é uma doença genética, que ainda é pouco conhecida por muitos profissionais da área de saúde, gerando diagnósticos imprecisos e em alguns casos levando pacientes à morte, devido à falta de informação que leva a tratamento inadequado. Desta forma esse trabalho visa pesquisar e aprofundar os conhecimentos sobre essa doença, ajudando a comunidade científica e médica, auxiliando no desenvolvimento de novos tratamentos, para uma melhor qualidade de vida às pessoas com Fibrose Cística.

O objetivo desta pesquisa é detectar os níveis dos marcadores de inflamação Calprotectina e Elastase presentes nas amostras de fezes dos pacientes.

Caso ele (a) participe da pesquisa, será necessário a coleta de amostras de fezes a cada três meses, por um período de dois anos. Para tanto ele (a) deverá comparecer ao Complexo Hospital de Clínicas da UFPR trazendo as fezes, que poderão ser coletadas em casa e trazidas nesse mesmo momento.

É possível que ele (a) experimente algum desconforto, principalmente relacionado à dificuldade em coletar as fezes.

Os riscos relacionados ao estudo são mínimos, estando entre eles o desconforto para realizar a coleta.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são:

- 1- Através deste estudo será possível estudar o agravamento da doença, relacionado com a detecção dos níveis de Calprotectina e Elastase, auxiliando em diagnósticos e tratamentos.
- 2- Produzir estudo para a comunidade científica e médica, possibilitando o avanço científico e, futuramente, auxiliando o desenvolvimento de novos tratamentos que melhorem a qualidade de vida do paciente com Fibrose

Rubricas:
 Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____


 MARIA INÊS MODELLI
 Mestre em Ciências Biomédicas
 em ELASTASE E CALPROTECTINA
 (2010-11-2012)

Cística. No entanto, nem sempre ele (a) será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

Os pesquisadores Nelson Augusto Rosário Filho (orientador contato: (41) 99101-5181), Eduarda Sampaio Lazzarotto (pesquisadora contato: (41) 98904-3371), Jannaina Ferreira de Melo Vasco (pesquisadora contato (41) 99803-9696 –3361-4305), responsáveis por este estudo, poderão ser localizados para esclarecer eventuais dúvidas que o (a) Senhor(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo a por e-mail: nelson.rosario@ufpr.br, eduarda.lazzarotto11@gmail.com, jannaina.vasco@gmail.com, e telefone em horário comercial. Em situações de emergência ou urgência, relacionadas à pesquisa, os mesmos poderão ser contatados pelo telefone (41) 98904-3371.

Se o(a) Senhor(a) tiver dúvidas sobre os direitos de seu filho como participante de pesquisa, poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UPFR pelo Telefone 3360-1041 das 08:00 horas as 14:00 horas de segunda a sexta-feira. O CEP é de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

A participação neste estudo é voluntária e se o(a) Senhor(a) não quiser mais fazer parte da pesquisa, poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado. O atendimento e/ou tratamento do seu filho está garantido e não será interrompido caso o(a) Senhor(a) desista de participar.

As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas (orientador e médico). No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, será feito sob forma codificada, para que **a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.**

O material obtido (amostras biológicas) será utilizado unicamente para esta pesquisa e será descartado ao término do estudo, dentro de

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

maria
MARIA ZUCCE NOGUEI
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos - CEP/HC/UPFR
 Maringá, 81130-900

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou seu representante legal para a participação neste estudo.

Nome extenso do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Assinatura do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Curitiba,


MARIA SUSE MOGELIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em São Paulo do HCUFPA
Matrícula: 7482

APÊNDICE 2 – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO - TALE

Título do Projeto: Avaliação da calprotectina fecal e da elastase-1 fecal como marcadores inflamatórios intestinais na Fibrose Cística.

Investigador: Eduarda Sampaio Lazzarotto

Local da Pesquisa: Ambulatório de Fibrose Cística do Complexo do Hospital de Clínicas - UFPR

Endereço: R. Gen. Carneiro, 181 - Alto da Glória, Curitiba - PR

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao Participante: o que é uma pesquisa?

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de detectar os níveis da Calprotectina e Elastase nas amostras de fezes coletadas.

Trata-se de uma pesquisa importante pois a Fibrose Cística é uma doença genética, que ainda é pouco conhecida por muitos profissionais da área de saúde, gerando diagnósticos imprecisos, devido à falta de informação. Desta forma esse trabalho visa pesquisar e aprofundar os conhecimentos sobre essa doença, ajudando a comunidade científica e médica, auxiliando no desenvolvimento de novos tratamentos, para uma melhor qualidade de vida às pessoas com Fibrose Cística.

Caso você aceite participar, será necessário realizar a coleta de fezes quando vier à consulta que é realizada a cada 3 meses, durante o período do estudo (2 anos).

A sua participação é voluntária. Caso você opte por não participar não terá nenhum prejuízo no seu atendimento e/ou tratamento.

Contato para dúvidas

<p>Rubricas: Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____ Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____</p>
--


MARIA JOSÉ MOÇELIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do HC UFPR
Matrícula 7462

Os pesquisadores (Nelson Augusto Rosário Filho (orientador contato: (41) 99101-5181), Eduarda Sampaio Lazzarotto (pesquisadora contato: (41) 98904-3371), Jannaina Ferreira de Melo Vasco (pesquisadora contato (41) 99803-9696 –3361-4305), responsáveis por este estudo, poderão ser localizados para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo a por e-mail: nelson.rosario@ufpr.br, eduarda.lazzarotto11@gmail.com, jannaina.vasco@gmail.com, e telefone em horário comercial. Em situações de emergência ou urgência, relacionadas à pesquisa, os mesmos poderão ser contatados pelo telefone (41) 98904-3371.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UPFR pelo Telefone 3360-1041 das 08:00 horas as 14:00 horas de segunda a sexta-feira. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PARTICIPANTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma via original assinada, rubricada e datada deste Documento de ASSENTIMENTO INFORMADO.

Nome por extenso, legível do Participante menor de idade.

Assinatura do Participante menor de idade

Rubricas: Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____ Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

maria jose mozelin
MARIA JOSÉ MOCELIN
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde
 Matriculada 7462

Nome por extenso, do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Assinatura do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Curitiba,


MÁRIA JOSE MOELIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Saúde Humana do HCUVPP
Matrícula 7462

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

APÊNDICE 3 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS DETALHADAS

Teste Paramétrico - Teste de diferença entre duas médias (amostras pareadas)

Um breve resumo teórico:

Sejam as variáveis aleatórias X_1 e X_2 cujos resultados formam um conjunto de n pares de dados observados de elementos que pertencem a dois grupos: leitura 1 e leitura 2.

Dados os n pares $(x_{11}, x_{21}), (x_{12}, x_{22}), \dots, (x_{1n}, x_{2n})$ são calculadas as diferenças:

$d_i = x_{1i} - x_{2i}$ para $i = 1, 2, \dots, n$ cuja variável aleatória é D com valor esperado:

$$E[D] = E[X_1] - E[X_2] = \mu_1 - \mu_2 = \Delta \quad (\text{a situação mais comum é } \mu_1 - \mu_2 = \Delta = 0).$$

Com base nessas diferenças d_i , a média e o desvio-padrão são calculados por:

$$\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n} \quad s_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n-1}}$$

Supondo **normalidade da distribuição da diferença entre as médias** $\bar{d} = \bar{X}_1 - \bar{X}_2$, a estatística de teste, considerando que os parâmetros da população são desconhecidos, é:

$$t = \frac{\bar{d} - \Delta}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}}$$

TESTE-T REALIZADO COM AS AMOSTRAS.

Teste-t: duas amostras em par para médias

	Calprotectina 1	Calprotectina 2
Média	251,7	198,1
Variância	109043,2	79700,5
Observações	7	7
Correlação de Pearson	0,896	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	6	
Atat t	0,961	
P(T<=t) uni-caudal	0,1877	
t crítico uni-caudal	1,943	
P(T<=t) bi-caudal	0,374	
t crítico bi-caudal	2,447	

FONTE: O autor (2022).

$$H_0: \mu_{\text{leitura1}} - \mu_{\text{leitura2}} = 0$$

$$H_1: \mu_{\text{leitura1}} - \mu_{\text{leitura2}} \neq 0$$

$$\alpha = 5\% \text{ bilateral} \Rightarrow t_{\text{crit}} = t_{n-1=6; \alpha=5\%} = 2,447$$

$$t_{\text{calc}} = 0,961$$

$$\text{conclusão: } t_{\text{calc}} = 0,961 < t_{\text{crit}} = 2,447 \Rightarrow \text{n\~{a}o rejeitar } H_0$$

No n\u00edvel de signific\u00e2ncia de 5%, conclui-se que n\u00e3o h\u00e1 diferen\u00e7a significativa entre as m\u00e9dias de calprotectina fecal observadas nas duas leituras.

An\u00e1lise de vari\u00e2ncia da calprotectina fecal pela metodologia ANOVA.

Em linhas gerais, a an\u00e1lise de vari\u00e2ncia \u00e9 empregada para testar as diferen\u00e7as entre m\u00e9dias de k popula\u00e7\u00f5es distintas.

O teste consiste em testar a hip\u00f3tese $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ contra a hip\u00f3tese alternativa de que existe pelo menos uma m\u00e9dia diferente das outras.

Neste caso \u00e9 utilizado o modelo com medidas repetidas e protectina (leitura1, leitura2, leitura3) para um conjunto de 14 pacientes.

AN\u00c1LISE DE VARI\u00c2NCIA DA CALPROTECTINA FECAL, ANOVA

ANOVA

Fonte de varia\u00e7\u00e3o	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor-P	F cr\u00edtico
Linhas (grupo pacientes)	129871,5	13	9990,1	0,979	0,496	2,119
Colunas (grupo leituras)	61327,0	2	30663,5	3,006	0,067	3,369
Residual	265217,6	26	10200,7			
Total	456416,1	41				

FONTE: (O autor, 2022).

NOTA: (SQ = soma de quadrados, gl = graus de liberdade).

APÊNDICE 4 – DADOS DE COLETAS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Idade	3	3	4	3	3	4	4	4	3
Sexo (F=1 e M=2)	1	1	2	1	1	2	2	2	1
Alteração genética	DF508/2D>G	DF508/DF508	DF508/DF508	DF508/DF508	Gln1476/Ser4	DF508/DF508	G542/G542	DF508/Ser4	G542/G542
Peso	11,2	10,98	16,4	9	12,75	14	11,53	10	12,1
Altura	0,9	0,87	0,96	0,77	0,9	0,965	0,87	0,775	0,87
IMC	13,8	14,5	16,4	14,8	15,7	15,2	15,2	16	16
Enzimas (Não =0 Sim=1)	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Antibióticos (Não=0 Sim=1)	0	0	1	1	0	1	0	1	0
Esteatorreia (Não=0 Sim=1)	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Tosse Crônica (Não=0 Sim=1)	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Internação (Não=0 Sim=1)	0	0	0	0	0	1	0	0	0
CLP 1 (µg/g)	398	14	23	44	176	187	156	401	9
CLP 2 (µg/g)	134	31	11	37	37	10	108	14	
CLP 3 (µg/g)			36	140	401	160	45	55	
EL-1 1 (µg/g)	0,9	1,1	5,4	450,03	487,94	5,4	5,4	5,4	1,5
EL-1 2 (µg/g)		1,1	5,4	0	801	5,4	5,4	5,4	
EL-1 3 (µg/g)			7,7	0	507	5,4	5,4	17,62	

21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10
DF508/DF5 08	DF508/DF5 08	G542/Thr35 1	DF508/Ala4 55Del	DF508/G85 E	G542/C,158 5-1G>A	DF508/I120 +1G>A	DF508/DF5 08	DF508/Arg1 066His	DF508/DF5 08	P.Lys684As nfs*38/p,Arg 117His	DF508/DF5 08
16,5	10,5	10	11,4	8,4	9	14,75	11,85	10,6	10,8	14	14,45
1,14	0,82	0,76	0,91	0,74	0,73	0,94	0,89	0,85	0,81	0,97	0,95
12,7	15,7	16,9	13	15,3	17	14,8	15	14,5	16,5	15	14,4
1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
800	44	6	242	58	133	267	18	70	185	320	115
800	42		48		286	163	33	5	38	24	49
	40				14	86	57	30	180	12	7
5,4	5,4	789	283,95	189	0,2	5,4	5,4		0,9	403,06	5,4
0,2	10		546		5	4,9	16,76	183	0,2	62,96	5,4
	5,4				1,7	1,2	5,4	800	1	267,48	0,3

	33	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22
	13	14	6	6	10	17	7	18	6	12	11	13
	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1
G542/G542		G542/G542	DF508/R347 P	DF508/Gln2 Arg ts*17	DF508/DF5 08	DF508/DF5 08	DF508/DF5 08	DF508/DF5 08	DF508/DF5 08	DF508/DF5 08	DF508/DF5 08	DF508/DF5 08
	32,5	49,3	24,6	29,15	52	15	28	21,55	34,8	27,5	44	
	1,38	1,55	1,245	1,28	1,51	1,11	1,45	1,08	1,43	1,27	1,54	
	17	20,5	15,9	17,8	22,8	12,4	15	18,3	17,3	17,1	18,6	
	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	97	31	30	52	112	37	6	23	43	12	117	169
				49	42			11	71	16		
	0,4	5,4	208,75	0,2	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4
				1,2				0,3				5,54

35	34	
10	10	
1	2	
G542/G542	DF508/TRY 1092	
16	22,5	
1,17	1,25	
11,7	14,4	
1	1	
1	1	
1	0	
1	1	
1	1	
655	106	
278		
5,4	0,2	
0,2		