UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

ROBERTTA KELLY MARQUES FERREIRA

Inflamação intestinal em crianças com fibrose cística

Ribeirão Preto – SP

2019

ROBERTTA KELLY MARQUES FERREIRA

Inflamação intestinal em crianças com fibrose cística

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientadora: Profa. Dra. Regina Sawamura

Co-orientadora: Profa. Dra. Ieda Regina Lopes Del Ciampo

Ribeirão Preto – SP

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ferreira, Robertta Kelly Marques

Inflamação intestinal em crianças com fibrose cística. Ribeirão Preto, 2019.

99 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientadora: Sawamura, Regina

Co-orientadora: Del Ciampo, Ieda Regina Lopes

1. Fibrose cística. 2. Inflamação intestinal. 3. Calprotectina fecal. 4. Crianças.

Nome: FERREIRA, Robertta Kelly Marques

Título: Inflamação intestinal em crianças com fibrose cística

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA).”

DEDICATÓRIA

À minha querida mamãe, meu maior exemplo de integridade, respeito, humildade, justiça, empatia, força e resiliência. Obrigada pelo amor, carinho e proteção incondicionais e pela forma de me educar, que me preparou para enfrentar as adversidades da vida mesmo na sua ausência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter escolhido a melhor família e os melhores amigos para a minha vida, pelas bênçãos concedidas, pela proteção diária, por iluminar meus caminhos e minhas decisões e pela força em mais uma caminhada.

Ao meu papai, Paulo Roberto, pelo amor e apoio incondicionais. Agradeço por todos os ensinamentos e conselhos, que estão presentes em todos os momentos da minha vida, pela proteção e companheirismo, pelos exemplos de retidão, força e superação. Aos meus irmãos, Vitor e Stephany, pelo amor, amizade, companheirismo e pela força que me dão. À tia Arlete, pelo amor e apoio constantes. Agradeço a compreensão por esse momento de renúncia.

À minha dindinha Adriana, pelo amor e cuidado imensuráveis, pelo apoio e incentivo em todos os momentos. Obrigada por me inspirar a ser uma pessoa cada vez melhor, sendo um dos maiores exemplos de caráter, integridade, retidão, força, bondade e generosidade. Que sorte a minha ter uma pessoa tão especial em minha vida. Ao tio Wasther, pelo exemplo, apoio e incentivo constantes. Ao meu afilhado Arthur, meu melhor presente. Obrigada pelos momentos divertidos, carregados de doçura e espontaneidade, que deixam a vida mais leve e mais gostosa de se viver. Agradeço a compreensão por tantos momentos de ausência.

Ao meu amor, Luiz Gustavo, pelo amor e companheirismo, pela paciência enorme nos dias de dificuldade e pela compreensão por todos os momentos de ausência. Agradeço a Deus por ter cruzado nossos caminhos e ter colocado uma pessoa tão especial em minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Regina Sawamura, por sua dedicação e disponibilidade em me orientar, pelo apoio e incentivo constantes, pelos valiosos conhecimentos transmitidos desde a residência de gastropediatria e ao longo deste trabalho, que tanto contribuíram para minha formação médica e pessoal.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Ieda Regina Lopes Del Ciampo, pelas orientações e apoio. Muito obrigada pelas contribuições na realização deste projeto, pelos ensinamentos desde a residência médica, especialmente em fibrose cística, que colaboraram enormemente para a minha formação profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Maria Inez, pelos exemplos de bondade, dedicação e compromisso. Agradeço pelas orientações e ajuda no manejo dos pacientes e por todos os ensinamentos, que contribuíram grandemente para a minha formação como gastropediatra e como pessoa. Obrigada pela ajuda nesta trajetória.

Aos professores da pós-graduação da FMRP- USP, por todos os ensinamentos, sugestões e orientações. Vocês são profissionais e pessoas exemplares.

Às crianças participantes deste projeto e aos seus familiares, meu muito obrigada. Sem vocês, nada disso seria possível. Um agradecimento especial às crianças com fibrose cística e aos seus familiares, verdadeiros exemplos de força e superação, que me inspiram em ser “Médico de Homens e de Almas”.

À equipe do CMSC Vila Lobato, especialmente ao Prof. Dr. Ivan Ferraz, Prof. Dr. Luiz Antônio Del Ciampo, Dra. Thaís, Dr. Alex e Dr. Verri, pelo apoio e pela enorme colaboração na realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Pediatria do HCRP, obrigada por darem todas as condições que permitiram a realização dos experimentos. Agradeço à equipe do Laboratório de Parasitologia do HCRP, que cederam o espaço para realização de parte das análises. Meu agradecimento especial ao Sr. Pedro, pela amizade, alegria, pelos ensinamentos em laboratório e pelo apoio constante, e à Luciana, por me acompanhar na realização dos experimentos, pela disponibilidade, paciência, amizade e pelos momentos de descontração. Vocês contribuíram enormemente para realização deste projeto.

Às equipes da gastropediatria e do Ambulatório Multidisciplinar de Fibrose Cística, pelo apoio e incentivo ao meu projeto e pelas contribuições para realizá-lo.

À FAEPA e ao Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos meus professores da residência de pediatria da UFG, em especial Prof. Dr. Paulo Sucasas, Profa. Dra. Fernanda Peixoto, Profa. Dra. Naflésia Bezerra, Profa. Dra. Lusmaia Damaceno, Profa. Dra. Maria Selma Neves e Prof. Dr. Antônio Alvarenga. Muito obrigada por todos os ensinamentos e pelas grandes contribuições para minha formação profissional e pessoal.

Ao tio Marcelo e ao meu irmão Matteus, pelo amor, apoio e compreensão constantes em todos os momentos da minha vida.

À tia Bel e ao tio Divino, muito obrigada por estarem tão presentes em minha vida e por todo apoio, força e orientações que sempre me deram. À minha querida prima-irmã Nicole, pela amizade, companheirismo, apoio e incentivo. Obrigada por ser meu ombro amigo, por me aconselhar e me ajudar em todos os momentos de dificuldade.

À toda minha família, tios e primos, pelo apoio e compreensão pelos momentos de ausência. A todas as mulheres da minha família, em especial minha tia-avó Janete, pelo exemplo de força, garra e superação.

Aos meus sogros, Cido e Nilza, e a todos da família Cavalari e Doná, por me receberem tão bem. Obrigada pelo carinho, apoio e pela compreensão pelos momentos de ausência.

Aos meus amigos da “Turma do Rock”, pela amizade, companheirismo, apoio e incentivo constantes. A amizade de vocês me fortalece. Agradeço a compreensão por tantos momentos em que não pude estar presente.

Às minhas amigas-irmãs Ojana e Roberta, por estarem presentes em todos os meus momentos, pela amizade linda de mais de 20 anos, pela lealdade e cumplicidade. Obrigada pelo apoio e incentivo e por estarem sempre dispostas a me ouvir e a dar os melhores conselhos.

Às minhas amigas do “Single House”, Ana Paula, Marys e Verena, por todos os momentos que vivemos, pela força e incentivo que sempre me dão.

Às minhas amigas Ana Luiza e Carol, por todos os momentos de diversão e de boas risadas, obrigada pelo companheirismo, incentivo, apoio e pela força que me deram em todos os momentos de dificuldade.

À minha amiga Priscilla, pela amizade, apoio e pelas contribuições para realização do meu projeto. Às amigas Marina Papa e Patrícia Benetolo, pela amizade, apoio e incentivo.

Aos amigos de Rio Preto, pelos excelentes momentos que vivemos. Obrigada pelo apoio e incentivo.

Aos amigos da pós-graduação, especialmente, à Priscila Medeiros, pelas dicas, trocas de experiências e por toda a força durante essa caminhada.

Aos amigos e à toda equipe da USF Paulo Gomes Romeo, da Santa Casa de Ribeirão Preto e do Centro Clínico, pelo apoio e incentivo. Agradeço a compreensão pelos momentos de dificuldade.

A todos os meus demais amigos, tanto os próximos quanto os que estão longe fisicamente, obrigada pela amizade e torcida. Vocês estão sempre em meu coração.

A todos os meus pacientes, agradeço a compreensão por esse momento de renúncia. Vocês são minha inspiração diária para ser uma profissional cada dia melhor.

A todos que de alguma maneira me ajudaram, incentivaram e apoiaram. Muito Obrigada!

RESUMO

FERREIRA, R.K.M. **Inflamação intestinal em crianças com fibrose cística**. 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva, com acometimento de múltiplos órgãos e sistemas. Evidências de inflamação intestinal vêm sendo demonstradas nessa doença e a etiologia parece ser multifatorial. A calprotectina fecal (CLP) é um biomarcador de inflamação intestinal e os estudos vêm mostrando seu aumento em pacientes com FC. O objetivo do estudo foi comparar os valores de CLP entre crianças com fibrose cística e indivíduos saudáveis, avaliar se há diferença dos níveis desse marcador de acordo com a faixa etária (≤ 4 anos e > 4 anos) e investigar a relação entre a CLP e as características clínicas dos pacientes com FC. Foi realizado um estudo transversal. Foram avaliadas 30 crianças com FC, detectadas pelo teste de triagem neonatal e 39 saudáveis, com médias de idade (DP) de 47,63 (27,60) e 43,64 (25,93) meses. A CLP foi determinada por um teste de ELISA. Para a comparação das médias dos valores de calprotectina entre os grupos FC e saudáveis e para avaliar associação entre a CLP e as características clínicas dos pacientes com FC, foram utilizados modelos de regressão linear, simples e múltiplos (ajustado por tipo de parto e dieta). A relação entre duas variáveis quantitativas foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância foi de 5%. Houve uma correlação negativa entre os níveis de calprotectina fecal e a idade, tanto nos saudáveis como nos fibrocísticos. Observou-se uma ampla variabilidade dos valores de CLP nos pacientes com FC com idade ≤ 4 anos, com aumento significativo em relação aos saudáveis ($p = 0,03$). Nas crianças acima de 4 anos, não houve diferença da CLP entre os grupos ($p = 0,74$). Para os maiores de 4 anos, ao usar um ponto de corte de 50 mg/kg, notou-se elevação de CLP em 92,86% das crianças com FC e em 70,59% dos saudáveis ($p = 0,18$). Utilizando um ponto de corte de 100 mg/kg, observou-se aumento em 64,29% e 47,06%, respectivamente ($p = 0,47$). Nas crianças com FC, houve associação entre CLP e ocorrência de síndrome de pseudo-Bartter ($p = 0,01$). Não houve relação desse marcador com outras características presentes na FC como anemia hipoalbuminêmica ($p = 0,24$), insuficiência pancreática ($p = 0,49$), tipo de infecção respiratória por *Pseudomonas aeruginosa* ($p = 0,19$), estado nutricional ($p = 0,12$), uso de inibidor de bomba de prótons ($p = 0,34$), número de ciclos de antibióticos ($p = 0,51$) ou de hospitalizações durante a vida (0,17). Em conclusão, os níveis de calprotectina fecal nas crianças com FC se diferem das saudáveis, sugerindo alteração do ambiente intestinal desde os primeiros anos de vida. Há uma tendência à redução desse marcador com a progressão da idade.

Palavras-chave: 1. Fibrose cística. 2. Inflamação intestinal. 3. Calprotectina fecal. 4. Crianças.

ABSTRACT

FERREIRA, R.K.M. **Intestinal inflammation in children with cystic fibrosis**. 2019. 99 f. Dissertation (Master in Child and Adolescent Health) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease, involving multiple organs and systems. Evidence of intestinal inflammation has been demonstrated in this disease and the etiology seems to be multifactorial. Fecal calprotectin (CLP) is a biomarker of intestinal inflammation and studies have been showing its increase in CF patients. The aim of the study was to compare CLP values among children with cystic fibrosis and healthy individuals, to evaluate whether there are differences in levels of this marker according to the age range (≤ 4 years and > 4 years) and to investigate the relationship between CLP and the clinical characteristics of CF patients. A cross-sectional study was carried out. We evaluated 30 children with CF, detected by the neonatal screening test and 39 healthy, mean age (SD) of 47.63 (27.60) and 43.64 (25.93) months. CLP was determined by an ELISA test. In order to compare the mean values of calprotectin between the CF and healthy groups and to evaluate the association between CLP and the clinical characteristics of CF patients, linear and simple regression models were used (adjusted by type of delivery and diet). The relationship between two quantitative variables was evaluated by the Spearman correlation coefficient. The level of significance was 5%. There was a negative correlation between fecal calprotectin levels and age in both healthy and fibrocystic patients. A wide variability of CLP values was observed in CF patients aged ≤ 4 years, with a significant increase in relation to the healthy ones ($p = 0.03$). In children older than 4 years, there was no difference in CLP between groups ($p = 0.74$). For those over 4 years of age, when using a cut-off point of 50 mg/kg, CLP was elevated in 92.86% of the children with CF and in 70.59% of the healthy ones ($p = 0.18$). Using a cut-off point of 100 mg/kg, an increase was observed in 64.29% and 47.06%, respectively ($p = 0.47$). In children with CF, there was an association between CLP and the occurrence of pseudo-Bartter syndrome ($p = 0.01$). There was no relation of this marker with other characteristics present in CF such as hypoalbuminemic anemia ($p = 0.24$), pancreatic insufficiency ($p = 0.49$), type of respiratory infection by *Pseudomonas aeruginosa* ($p = 0.19$), nutritional status ($p = 0.12$), proton pump inhibitor use ($p = 0.34$), number of antibiotic cycles ($p = 0.51$) or lifetime hospitalizations (0.17). In conclusion, the levels of fecal calprotectin in children with CF differ from healthy ones, suggesting a change in the intestinal environment from the first years of life. There is a tendency to reduce this marker with the progression of age.

Key words: 1. Cystic fibrosis. 2. Intestinal inflammation. 3. Fecal calprotectin. 4. Children.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma da inclusão dos pacientes com FC	35
Figura 2- Fluxograma da inclusão das crianças saudáveis.....	35
Figura 3- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, no grupo de crianças saudáveis	50
Figura 4- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, no grupo de crianças com fibrose cística	50
Figura 5- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, nas crianças saudáveis ≤ 4 anos	51
Figura 6- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, nas crianças com fibrose cística ≤ 4 anos.....	51
Figura 7- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, nas crianças saudáveis maiores de 4 anos	52
Figura 8- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, nas crianças com fibrose cística maiores de 4 anos.	52
Figura 9- Box plot representando a variabilidade dos valores de calprotectina fecal entre os grupos FC e saudáveis, de acordo com a faixa etária	53
Figura 10- Correlação entre os valores de calprotectina fecal e a dose da enzima pancreática	57
Figura 11- Correlação entre os valores de CLP e número de ciclos de antibióticos durante a vida	58
Figura 12- Correlação entre os valores de CLP e a quantidade de internações na vida.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características clínicas e demográficas das crianças com FC e saudáveis	46
Tabela 2- Histórico alimentar dos pacientes com FC e das crianças saudáveis.....	47
Tabela 3- Características clínicas dos pacientes com FC	48
Tabela 4- Níveis de calprotectina fecal nas crianças com FC e nas saudáveis	53
Tabela 5- Níveis de CLP nas crianças com FC e nas saudáveis, de acordo com a faixa etária	54
Tabela 6- Comparação entre as médias de calprotectina fecal entre os grupos FC x saudáveis, sem divisão por faixa etária	54
Tabela 7- Comparação entre as médias de CLP, entre os grupos, em cada faixa etária	54
Tabela 8- Comparação entre as médias da CLP, entre as faixas etárias, em cada grupo.....	55
Tabela 9- Comparação entre os grupos saudável e FC, excluindo os pacientes com FC em uso de corticoide inalatório ou nasal	55
Tabela 10- Relação entre os níveis de CLP e as características clínicas dos pacientes com FC	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	<i>American Academy of Pediatrics</i>
AMFC	Ambulatório Multidisciplinar de Fibrose Cística
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa Humana
CFF	<i>Cystic Fibrosis Foundation</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane regulator</i>
CLP	Calprotectina fecal
DII	Doença inflamatória intestinal
DP	Desvio-padrão
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E/I	Estatura/altura para a idade
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FC	Fibrose cística
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
G	Gramas
GGT	Gamaglutamiltransferase
GS	Grupo dos saudáveis
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
IG	Idade gestacional
IMC	Índice de massa corporal
IP	Insuficiência pancreática
IRT	Imunotripsina reativa
LM	Tempo de aleitamento materno total
LME	Tempo de aleitamento materno exclusivo.
Log10	Logaritmo de base 10
Máx.	Máximo
MED	Mediana
Méd.	Média
Mín.	Mínimo
N	Não
OMS	Organização Mundial da Saúde

P/E	Peso para estatura/altura
P/I	Peso para a idade
<i>Pa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Proteína C Reativa
Q1	Primeiro quartil
Q1- Q3	Intervalo interquartil
Q3	Terceiro quartil
RBH	<i>Royal Brompton Hospital</i>
S	Sim
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TNN	Triagem neonatal
TREP	Terapia de reposição de enzimas pancreáticas
USP	Universidade de São Paulo
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VHS	Velocidade de hemossedimentação
X	<i>Versus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo primário	29
2.2	Objetivos secundários	29
3	MÉTODOS	31
3.1	Desenho do estudo	33
3.2	População e amostragem	33
3.3	Critérios de inclusão	34
3.4	Critérios de exclusão	34
3.5	Variáveis analisadas	36
3.6	Procedimentos previstos	40
3.7	Determinação da calprotectina fecal	41
3.8	Análise estatística	42
3.9	Aspectos éticos.....	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Características clínicas e demográficas das crianças saudáveis e das com fibrose cística	45
4.2	Características clínicas das crianças com fibrose cística	47
4.3	Comparação dos níveis de calprotectina fecal entre as crianças com fibrose cística e as saudáveis	49
4.4	Comparação dos níveis de calprotectina fecal e as características clínicas das crianças com fibrose cística	56
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE A	89
	APÊNDICE B.....	91
	APÊNDICE C	93
	APÊNDICE D.....	95
	APÊNDICE E	95
	APÊNDICE F	96
	ANEXO A	99

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene regulador de condutância transmembrana (“cystic fibrosis transmembrane regulator” – CFTR), que leva à deficiência ou ausência de proteínas CFTR funcionais na membrana apical das células epiteliais de múltiplos sistemas do organismo (GARCIA; QUINTON; YANG, 2009). Em adição ao seu papel como canal de cloro, a proteína CFTR também pode afetar o transporte de bicarbonato. Isso resulta na secreção de fluidos com volume anormalmente reduzido e com composição eletrolítica alterada (DE LISLE; BOROWITZ, 2013). Esse muco desidratado e viscoso altera a mucosa pulmonar e a do trato digestivo, aumentando o risco de infecção e inflamação pulmonar recorrente e crônica, insuficiência pancreática, doença hepática relacionada à FC e diabetes (GARCIA; QUINTON; YANG, 2009; O’SULLIVAN; FREEDMAN, 2009). A prevalência das comorbidades relacionadas à FC vem aumentando com a melhora da expectativa de vida decorrente dos avanços nos tratamentos clínicos na área (PARKINS et al., 2011).

O sistema gastrointestinal é um dos primeiros a ser alterado na FC. A complicação intestinal mais grave é a obstrução do íleo terminal ou da porção proximal do intestino grosso, denominada íleo meconial quando ocorre no período neonatal, podendo ocasionar rotura intestinal e sepse (DE LISLE; BOROWITZ, 2013). O íleo meconial ocorre em 13,4% dos recém-nascidos com FC (CFF, 2016). Essa obstrução também pode ocorrer em pacientes mais velhos e é denominada síndrome da obstrução intestinal distal (HOUWEN et al., 2010).

Aproximadamente 60 % das crianças com mutação do CFTR nascem com insuficiência pancreática (IP), que progride com a idade até afetar 85% a 90 % dos pacientes (CIPOLLI et al., 2007, WILSCHANSKI; NOVAK 2013). A diminuição de bicarbonato nas secreções pancreáticas nos pacientes com IP leva à redução da neutralização ácida no intestino delgado proximal, que associada a um fluido intestinal desidratado, à redução da motilidade intestinal presente na FC e à capacidade enzimática diminuída de digerir os alimentos, contribui para os sinais e sintomas gastrointestinais. O uso frequente de inibidores de acidez gástrica por esses pacientes, tanto para a doença do refluxo gastroesofágico quanto para a potencialização da terapia de reposição de enzimas pancreáticas (TREP), permite maior passagem de bactérias ingeridas para o intestino delgado (DE LISLE; BOROWITZ, 2013). O uso de antibióticos suprime as cepas comensais e pode prover o crescimento de bactérias resistentes, que poderão colonizar o ambiente intestinal, o que em conjunto com os fatores descritos anteriormente,

favorecem a disbiose da microbiota intestinal e o supercrescimento no intestino delgado (DE LISLE; BOROWITZ, 2013; SEKIROV et al., 2010). O fígado e as vias biliares também são afetados na FC e alterações se apresentam de forma variável, incluindo colestase neonatal, elevação de aminotransferases, esteatose hepática, fibrose hepática, cirrose biliar focal e cirrose multilobular, com ou sem hipertensão portal (FLASS; NARKEWICZ, 2013). A doença hepática relacionada à FC ocorre em 5 a 15% dos pacientes (COLOMBO et al., 2006), geralmente na primeira década de vida.

Atualmente, alguns estudos têm demonstrado evidências de inflamação intestinal na FC, doença caracterizada por inflamação sistêmica, que inclui a inflamação pulmonar envolvida na pneumopatia, a principal causa de mortalidade na doença (QUON; AITKEN, 2012). Um estudo usando cápsula endoscópica em indivíduos com FC acima de 10 anos de idade, revelou diferentes graus de inflamação intestinal, englobando edema, erosões e ulcerações jejunais e ileais, em 63% da amostra de pacientes, tanto suficientes quanto insuficientes pancreáticos (WERLIN et al., 2010).

Bruzzese et al. (2004, 2014) também sugeriram que a inflamação intestinal é um aspecto presente nesta doença, quando mostraram níveis elevados nas concentrações de calprotectina fecal (CLP) e de óxido nítrico retal em crianças com FC. Adriaanse et al. (2015) demonstraram lesão de enterócitos e inflamação intestinal, por meio da mensuração dos níveis séricos de proteína ligadora de ácidos graxos intestinais e da CLP, respectivamente, fornecendo evidências de enteropatia na FC. A CLP estava elevada em 93% dos pacientes estudados.

Os mecanismos da inflamação intestinal na FC ainda não estão completamente esclarecidos, mas os estudos sugerem diversas causas, como: desregulação da resposta inflamatória associada à mutação do gene CFTR, escarro deglutido contendo mediadores pró-inflamatórios (ADRIAANSE et al., 2015; WERLIN et al., 2010; RUMMAN et al., 2014) e uso de altas doses de enzima pancreática, que poderiam causar inflamação e colonopatia fibrosante (LLOYD-STILL; BENO; KIMURA, 1999). Adicionalmente, o supercrescimento bacteriano do intestino delgado, o aumento da acidez e a alteração do muco intestinal também parecem contribuir para a sua inflamação (BOROWITZ et al., 2005; DE LISLE, 2009; GELFOND et al., 2013). Dieta com elevada densidade energética e rica em gordura, como a recomendada para os pacientes com FC a fim de manter adequação do estado nutricional, pode alterar os nutrientes intraluminais e os produtos aos quais os enterócitos e os microorganismos estão expostos (MANOR et al., 2016).

Todas essas modificações da mucosa poderiam alterar a composição da flora intestinal, levando à disbiose, que conseqüentemente poderia resultar em inflamação (LEE et al., 2012).

A microbiota intestinal está envolvida nas vias imunológicas regulatórias e pró-inflamatórias por meio da sua interação com receptores da mucosa (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010). O intestino comprometido, com lesão de enterócitos e inflamação, contribui para a má absorção dos nutrientes, interferindo no estado nutricional do paciente com FC (PENCHARZ; DURIE, 2000; WERLIN et al., 2010), resultando tanto em déficit de crescimento, quanto na piora da função pulmonar e da sobrevida (STEINKAMP; WIEDEMANN, 2002; SHARMA et al., 2001).

Os exames considerados padrão-ouro para avaliação da inflamação da mucosa intestinal, endoscopia e biópsia, são considerados invasivos e caros. Atualmente ainda não há disponível um teste não invasivo para detecção acurada da inflamação intestinal na FC (RUMMAN et al., 2014). Diversos biomarcadores, incluindo a CLP, S100A12, interleucina 8, imunoglobulinas M e G, elastase neutrofílica, fator de necrose tumoral alfa e a proteína catiônica eosinofílica têm sido usados para esse fim (BRIARS et al., 1995; LEE et al., 2012). Os marcadores fecais têm sido descritos como importantes testes para avaliação de inflamação em todo o trato gastrointestinal, apresentando maior acurácia que os marcadores séricos, como PCR e VHS (ABRAHAM; KANE, 2012; TIBBLE, 2002).

A calprotectina é uma proteína ligadora de cálcio e zinco, com peso molecular de 36.5 quilodaltons, formada por um complexo de duas proteínas, S100A8 e S100A9 (LEE et al., 2012; NAKASHIGE et al., 2015; VAOS et al., 2013). Ela pertence à família de proteínas S100, que constituem aproximadamente 60% das proteínas citosólicas solúveis nos granulócitos neutrófilos humanos (VERMEIRE; VAN ASSCHE; RUTGEERTS, 2006). É encontrada principalmente em neutrófilos, mas também em monócitos e macrófagos e é liberada durante a destruição ou ativação neutrofílica (LEE et al., 2012).

A calprotectina pode ser mensurada no plasma, bem como em outros fluidos do organismo, mas sua concentração nas fezes é seis vezes maior que a detectada no sangue (FAGERBERG et al., 2007; SUMMERTON et al., 2002). Quando ligada ao cálcio, apresenta alta resistência à degradação proteolítica e ao calor e permanece estável em amostras fecais por até uma semana em temperatura ambiente (FAGERHOL, 1996; ROSETH, 2003). Essas propriedades permitem que essa proteína seja eliminada intacta nas fezes, o que confere uma vantagem como marcador bioquímico não invasivo para avaliação de inflamação intestinal, em comparação com outros marcadores que vem sendo estudados (lactoferrina, elastase neutrofílica e estearase leucocitária); (BONNIN; VILA; ROSELL, 2007). Sua quantificação é feita por um teste de ELISA, exame de fácil execução e pouco dispendioso (ANGRIMAN et al., 2007).

O nível de CLP nas fezes deve ser proporcional à quantidade de neutrófilos que migraram

através da mucosa gastrointestinal. A migração transepitelial de neutrófilos e seu acúmulo na superfície da mucosa e dentro do lúmen intestinal são marcadores da fisiopatologia da inflamação digestiva (LEE et al., 2017). Essa migração se correlaciona com escores de atividade endoscópica e histológica em pacientes com doença inflamatória intestinal (SIPPONEN et al., 2008a; SIPPONEN et al., 2008b).

A CLP é um marcador de inflamação que se encontra elevado tanto em adultos, quanto em crianças com doença inflamatória intestinal (DII), como doença de Crohn e retocolite ulcerativa (ALIBRAHIM; ALJASSER; SALH, 2015; CANANI et al., 2008; OORD; HORNUNG, 2014). Vários estudos vêm investigando a relação da CLP com doenças que apresentam acometimento intestinal, como apendicite, púrpura de Henoch-Schönlein, polipose colônica, enterocolite necrotizante (AMBE et al., 2016; KANIK et al., 2015; PERGIALIOTIS et al., 2016; PEZZILI et al., 2008) além de outras, como alergia à proteína do leite de vaca e doenças atópicas (BESER et al., 2014; ORIVUORI et al., 2015). Ela também se eleva em doenças gastrointestinais infecciosas, porém em concentrações menores que as observadas na DII (DAMMS; BISCHOFF, 2008; CHEN et al., 2012).

A CLP é capaz de distinguir DII de síndrome do intestino irritável, com sensibilidade de 100% e especificidade de 97%, tanto em adultos como em crianças (BUNN et al., 2001; SCHOEPFER et al., 2008; TIBBLE et al., 2000). Estudos em pacientes com suspeita de DII mostraram sensibilidade de 97-99% e especificidade de 65-70% (DEGRAEUWE et al. 2015; HENDERSON; ANDERSON; WILSON, 2014; HOLTMAN, 2016), evidenciando a utilidade desse marcador para avaliar atividade da doença, resposta ao tratamento e prognóstico, ao prever uma recidiva iminente (WALSHAM; SHERWOOD, 2016). Para propósito diagnóstico, valores de CLP inferiores a 50 µg/g são considerados normais para adultos e crianças acima de 4 anos (ALIBRAHIM; ALJASSER; SALH, 2015).

Muitos estudos evidenciaram que crianças saudáveis menores que 4 anos de idade, principalmente os menores que 12 meses, apresentam valores de CLP mais elevados que os estabelecidos para adultos e crianças mais velhas, com tendência a declínio com o avançar da idade. (EZRI; NYDEGGER, 2011; HESTVIK et al., 2011; KAPEL et al., 2010; LEE et al., 2017; LI et al. 2015; OORD; HORNUNG, 2014; SONG et al., 2017; ZHU et al., 2016). Pesquisas recentes mostraram que não houve diferença nos valores de CLP entre os sexos (LEE et al., 2017; LI et al., 2014; LI et al., 2015; ZHU et al., 2016).

Os valores de CLP apresentam uma grande variação interindividual entre os diferentes estudos. Hestvik et al. (2011) encontraram mediana de CLP iguais a 249 µg/g (menores de 1 ano), 75 µg/g (1 a 4 anos) e 28 µg/g (de 4 a 12 anos), em 302 crianças saudáveis de um país

subdesenvolvido da África subsaariana. Quando Li et al. 2015 estudaram 288 crianças chinesas de 1 a 18 meses, observaram mediana de CLP (intervalo) igual a 174,3 µg/g (6,0 – 1097,7). Os valores de CLP se correlacionaram de forma negativa de acordo com a idade: 375,2 µg/g (1–3 meses), 217,9 µg/g (3–6 meses), 127,7 µg/g (6–9 meses) e 96,1 (9–12 meses). Na Coreia, Lee et al. (2017) avaliaram 133 bebês saudáveis menores que 7 meses de idade, nascidos a termo, e detectaram maior concentração de CLP fecal que a observada nos dois estudos anteriores, com mediana (intervalo) igual a 237,40 µg/g (11,5–1330,6 µg/g), também com tendência ao declínio conforme elevação da idade.

O efeito do tipo de alimentação nos níveis de CLP em lactentes ainda é controverso. Dorosko, Mackenzie e Connor (2008), reportaram níveis elevados de CLP em crianças saudáveis menores de 6 meses em aleitamento materno exclusivo em comparação àquelas em aleitamento misto. Alguns estudos observaram altos valores de CLP em lactentes a termo em aleitamento materno, em comparação aos que recebiam fórmula infantil (LI et al., 2014; LI et al., 2015; SAVINO et al., 2010). Lee et al. (2017) demonstraram que os níveis de CLP (mediana) dos amamentados (354,67 µg/g) foram muito superiores aos daqueles que recebiam fórmula infantil (149,44 µg/g); ($p < 0.001$). Outros estudos não observaram diferença significativa entre esses tipos de alimentação (CAMPEOTTO et al., 2004; OSWARI et al., 2013; ROSTI et al., 2011).

Níveis elevados de CLP na infância estariam relacionados a fatores como maior permeabilidade intestinal, estabelecimento da flora intestinal, resposta aos antígenos alimentares, bem como colonização do intestino por bactérias comensais, que previne infecção por bactérias patogênicas (LEE et al., 2017). Estudos têm demonstrado que a microbiota intestinal já se inicia durante a gestação, pois foi visto que o líquido amniótico não é estéril, sendo estabelecida uma microbiota semelhante aos adultos por volta de 2 a 3 anos de idade, após uma dinâmica sucessão de populações bacterianas (AVERSHINA et al., 2013; DIGIULIO et al., 2008; DIGIULIO, D.B, 2012; SATOKARI et al., 2009). Vários fatores que podem influenciar a colonização e a maturação intestinal como transmissão intrauterina da flora materna para o intestino do feto, tipo de parto e de alimentação, idade pós-natal, fatores ambientais como localização geográfica, ambiente familiar e condições sanitárias, podem afetar os níveis de CLP na infância (LEE et al., 2017).

Postula-se que há um aumento da permeabilidade intestinal nas crianças que recebem fórmula infantil, pela deficiência dos fatores do leite humano que promovem o fechamento das junções intercelulares e/ou que a alimentação artificial poderia lesar a mucosa, levando a esse aumento de permeabilidade (TAYLOR et al., 2009). Contraditoriamente, os altos níveis de

CLP encontrados em crianças em aleitamento materno exclusivo em relação àquelas alimentadas com fórmula infantil, poderia se relacionar, então, à promoção do crescimento da mucosa intestinal pelo leite humano, apesar de ter sido demonstrado que o leite materno reduziu a permeabilidade intestinal em comparação às fórmulas infantis (SAVINO et al., 2010; WAGNER; TAYLOR; JOHNSON, 2008).

A microbiota intestinal normal, rica em bifidobactérias e lactobacilos, cuja principal fonte é o leite materno, estimula o desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino, a síntese e secreção de IgA e uma resposta balanceada de células T *helper*. O leite humano estimula o desenvolvimento do sistema imune por meio das citocinas, hormônios e fatores imunoestimulantes e de crescimento, como grelina, leptina, fatores de crescimento semelhantes à insulina, fator de crescimento epidérmico e fatores estimuladores de colônia de granulócitos. Desta forma, o aumento da CLP pode, na verdade, refletir um processo fisiológico de maturação do sistema imune (WAGNER; TAYLOR; JOHNSON, 2008). Tem sido formulado que a colonização intestinal durante as primeiras semanas de vida e que agentes quimiotáticos potentes, teriam um importante papel no estímulo à migração transepitelial de granulócitos através da mucosa intestinal durante o desenvolvimento de tolerância e regulação da flora microbiana, levando ao aumento dos níveis de CLP (ROSETH et al., 1992).

Em estudos com FC, a CLP é o biomarcador mais utilizado. Alguns estudos mostraram níveis elevados principalmente naqueles com insuficiência pancreática (DHALIWAL et al., 2015; WERLIN et al., 2010). Rumman et al. (2014) evidenciaram aumento da CLP tanto em pacientes insuficientes quanto nos suficientes pancreáticos e não encontraram relação entre os seus níveis e as características clínicas estudadas. Adriaanse et al. (2015) encontraram uma correlação inversa significativa entre lesão de enterócitos e função pulmonar em crianças com FC. Mostraram também uma associação significativa de níveis elevados de CLP com uso de inibidores de bomba de prótons, diabetes relacionado à FC e insuficiência pancreática, sugerindo uma relação entre inflamação intestinal e disfunção pancreática. Níveis de CLP têm se correlacionado negativamente com os escores z de peso e de altura nos pacientes com FC, sugerindo que a severidade da inflamação intestinal estaria associada a uma piora do estado nutricional (DHALIWAL et al., 2015).

A enteropatia associada à FC pode ser usada como potencial alvo terapêutico no futuro. A modulação intestinal pelo uso de probióticos tem se demonstrado eficaz no manejo da doença pulmonar em crianças, adolescentes e adultos com FC (BRUZZESE et al., 2007; WEISS et al., 2010). Alguns estudos relatam frequências significativamente menores de exacerbação pulmonar após a suplementação por 6 meses com probióticos contendo *Lactobacillus GG* ou

uma mistura de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus* spp., em conjunto com o tratamento de rotina. O mecanismo proposto é o de que certas cepas de probióticos contra regulariam as vias pró-inflamatórias que podem modular uma resposta inflamatória aberrante na via pulmonar dos pacientes com FC (BRUZZESE et al., 2007). Outro possível mecanismo apoia-se na habilidade de cepas de probióticos restaurarem a microbiota intestinal comensal (BRON; VAN; KLEEREBEZEM, 2012).

A alteração da microbiota intestinal pode impactar no metabolismo energético e de nutrientes na FC. A energia obtida sob a forma de ácidos graxos de cadeia curta, proveniente da fermentação microbiana de polissacarídeos não digeríveis, pode ser utilizada tanto pela mucosa colônica quanto pelos tecidos periféricos (MACFARLANE S.; STEED; MACFARLANE G., 2009). Este mecanismo adicional é importante, pois o estado nutricional comprometido está associado à gravidade da FC e à baixa sobrevida (DRAY et al., 2004). As condições clínicas relacionadas à FC podem adicionalmente contribuir para a desnutrição pelo aumento de gasto energético e/ou má-absorção de nutrientes no trato gastrointestinal (LI; SOMERSET, 2014).

Potenciais estratégias incluem suplementação com probióticos, prebióticos, simbióticos e certos flavonóides, alteração das proporções de macronutrientes, micronutrientes e manipulação dos componentes da dieta, como gordura e carboidratos não digeríveis (LI; SOMERSET, 2014).

Apesar do grande número de estudos sobre calprotectina nos últimos anos, há poucos dados em crianças com fibrose cística, os valores de referência na faixa etária pediátrica são conflitantes e sua relação com as manifestações clínicas não está bem esclarecida, justificando a importância deste trabalho.

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo primário

Comparar os valores de calprotectina fecal entre crianças com fibrose cística e crianças saudáveis.

2.2. Objetivos secundários

2.2.1. Avaliar se há diferença dos valores de calprotectina fecal entre as crianças com fibrose cística e as saudáveis, de acordo com a faixa etária.

2.2.2. Investigar se há associação entre os valores de calprotectina fecal e as diferentes características clínicas dos pacientes com fibrose cística.

3.MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico.

3.2. População e amostragem

A população do estudo consiste em crianças com diagnóstico de FC identificadas pelo programa de triagem neonatal (TNN) para FC, desde o período de sua implantação no estado de São Paulo, em fevereiro de 2010; além das crianças com TNN negativa para FC, mas com diagnóstico precoce da doença (antes dos 6 meses de vida); e que fazem acompanhamento no Ambulatório Multidisciplinar de Fibrose Cística (AMFC) do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP).

Considerando-se os critérios de inclusão descritos abaixo, foi selecionada uma amostragem por conveniência, em que 41 pacientes com FC foram previamente considerados elegíveis. Todos foram convidados a participar do estudo. Destes, 40 aceitaram a participação por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos pais ou responsáveis, sendo que 3 não preenchiam os critérios de inclusão e 7 foram excluídos, totalizando uma amostragem igual a 30 crianças. O fluxograma de inclusão dessas crianças encontra-se na figura 1.

Com o intuito de obter um grupo de comparação de 1:1, foi realizada coleta das fezes de 41 crianças aparentemente saudáveis. Para este grupo, inicialmente foram convidados 61 indivíduos pertencentes à mesma faixa etária dos pacientes com FC e que no período do estudo realizavam acompanhamento de puericultura no Centro Médico Social Comunitário Vila Lobato, Ribeirão Preto – SP. 21 crianças foram excluídas e 1 não preencheu os critérios de inclusão, totalizando uma amostragem de 39 indivíduos. O fluxograma de inclusão dessas crianças encontra-se na figura 2.

Para comparação dos valores de CLP entre os grupos, estes também foram subdivididos por faixa etária, ≤ 4 anos e maiores que 4 anos, devido à grande variação desse biomarcador entre crianças de diferentes grupos etários, descrita em alguns estudos publicados na literatura. O poder do teste para comparação da CLP entre as crianças com FC e as saudáveis foi de 77,37%. Considerando as crianças com idade igual ou inferior a 4 anos, o poder do teste foi de 88,40% e para as maiores de 4 anos, o poder foi de 38,82%.

3.3. Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os pacientes com FC maiores que 28 dias de vida, tanto aqueles identificados pelo programa de TNN, quanto os que apresentaram resultado falso negativo à TNN, caracterizado pela detecção de valores normais de imunotripsina reativa (IRT) e posterior diagnóstico de FC antes dos 6 meses de vida, nascidos entre 2010 e 2018; com diagnóstico confirmado pela presença de dois testes do cloro no suor alterados (cloro do suor ≥ 60 mEq/L), (FARRELL et al., 2008) e seguimento no AMFC – HC.

Para o grupo de comparação, foram incluídas crianças maiores que 28 dias, aparentemente saudáveis, nascidas no período de 2010 a 2018. Foram consideradas saudáveis, crianças eutróficas, nascidas a termo, sem histórico de baixo peso ao nascimento, sem qualquer tipo de doença crônica (doenças gastrointestinais, cardiovasculares, respiratórias, alérgicas, inflamatórias, dermatológicas, reumáticas, renais, endocrinológicas, neurológicas ou psiquiátricas).

3.4. Critérios de exclusão

Para as crianças com FC:

- doença aguda intestinal (diarreia, vômitos, hematoquezia ou febre) ou extraintestinal (ex.: infecção de vias aéreas superiores ou inferiores) ou internação nas últimas duas semanas anteriores à coleta das amostras de fezes.

- uso de antibióticos (oral, endovenoso ou inalatório), anti-inflamatórios não hormonais, corticoide oral, probióticos, prebióticos ou simbióticos nas últimas duas semanas anteriores à coleta das amostras de fezes.

Para o grupo de crianças saudáveis:

- doença aguda intestinal ou extraintestinal nas últimas duas semanas anteriores à coleta das amostras de fezes.

- uso de antibióticos (oral, endovenoso ou inalatório), corticosteroides orais, nasais ou inalatórios, anti-inflamatórios não hormonais, inibidores de acidez gástrica (inibidores de bomba de prótons ou antagonistas do receptor H2), probióticos, prebióticos ou simbióticos nas últimas duas semanas anteriores à coleta das amostras de fezes.

- Desistência da participação no estudo ou não entrega das amostras fecais.

Figura 1- Fluxograma da inclusão dos pacientes com FC.

Figura 2- Fluxograma da inclusão das crianças saudáveis.

3.5. Variáveis analisadas

As seguintes variáveis foram registradas para os pacientes com FC: gênero, idade, condições de nascimento (tipo de parto, idade gestacional (IG) e peso de nascimento), histórico alimentar (tempo de aleitamento materno exclusivo e de aleitamento materno total, idade de introdução dos sólidos na dieta), estado nutricional, função pancreática, uso prévio de antibióticos, uso de enzima pancreática e de inibidores de acidez gástrica, manifestações e comorbidades relacionadas à FC (distúrbio hidroeletrólítico, anemia hipoalbuminêmica, síndrome de pseudo-Bartter, íleo meconial, hepatopatia, doença do refluxo gastroesofágico, constipação intestinal), infecção respiratória por *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), número de hospitalizações e histórico de ressecção intestinal.

Para o grupo de comparação, foram registradas as seguintes variáveis: gênero, idade, condições de nascimento (tipo de parto, idade gestacional e peso de nascimento), histórico alimentar (tempo de aleitamento materno exclusivo e de aleitamento materno total, idade de introdução dos sólidos na dieta).

A caracterização das crianças em relação à IG, foi realizada de acordo com a definição (AAP, 2012):

- Pré-termo: IG menor que 37 semanas completas de gestação.
- Termo: IG de 37 semanas a menos de 42 semanas completas de gestação.
- Pós-termo: 42 semanas completas ou mais de gestação.

Baixo peso ao nascimento foi definido como aquele inferior a 2.500g (AAP, 2012).

Aleitamento materno exclusivo foi considerado como o período em que a criança recebeu somente leite materno, sem adição de nenhum outro alimento ou líquidos, inclusive água. Aleitamento materno foi definido como o período em que a criança recebeu leite materno, alimentos e líquidos, incluindo leite não humano e fórmula infantil (WHO, 2007).

Os indicadores nutricionais adotados foram estatura/altura para a idade (E/I), peso para a idade (P/I), peso para estatura/altura (P/E) e índice de massa corporal (IMC), todos expressos sob a forma de z score de acordo com os padrões e referência de crescimento da Organização Mundial da Saúde. Os cálculos dos parâmetros nutricionais foram realizados utilizando-se os programas *Anthro* (versão 3.2.2) e *Anthro Plus* (versão 1.0.0), para os dados referentes às crianças com idades abaixo de 5 anos e com 5 anos ou mais, respectivamente (WHO, 2009; WHO, 2010a).

- Classificação do estado nutricional:

- Crianças abaixo de 5 anos (WHO, 2006):

- Magreza: P/E ou IMC maior que 2 desvios padrões abaixo da mediana dos padrões de crescimento da OMS.
- Baixo peso: P/I maior que 2 desvios padrões abaixo da mediana dos padrões de crescimento da OMS.
- Baixa estatura: E/I maior que 2 desvios-padrões abaixo da mediana dos padrões de crescimento da OMS.
- Sobrepeso: P/E maior que 2 desvios-padrões acima da mediana dos padrões de crescimento da OMS.
- Obesidade: P/E maior que 3 desvios-padrões acima da mediana dos padrões de crescimento da OMS.

- Crianças a partir de 5 anos e adolescentes até 19 anos (DE ONIS et al., 2007):

- Magreza: IMC maior que 2 desvios padrões abaixo da mediana dos padrões de crescimento da OMS.
- Baixo peso: P/I maior que 2 desvios padrões abaixo da mediana dos padrões de crescimento da OMS.
- Baixa estatura: E/I maior que 2 desvios-padrões abaixo da mediana dos padrões de crescimento da OMS.
- Sobrepeso: IMC maior que 1 desvio-padrão acima da mediana da referência de crescimento da OMS.
- Obesidade: IMC maior que 2 desvios-padrões da mediana da referência de crescimento da OMS.

Desnutrição foi definida como a presença de baixa estatura (exceto estatura familiar), baixo peso ou magreza (WHO, 2010b).

A data do diagnóstico de FC foi considerada como aquela do primeiro teste do cloro no suor alterado, conforme recomendação da *Cystic Fibrosis Foundation* (FARRELL, et al. 2017).

A infecção respiratória por *Pseudomonas aeruginosa* foi classificada segundo os critérios de Leeds (LEE, et al.; 2003).

- Infecção crônica: pacientes com $> 50\%$ das culturas positivas para *Pa* nos últimos 12 meses.
- Infecção intermitente: pacientes com $\leq 50\%$ das culturas positivas para *Pa* nos últimos 12 meses.
- Livre de infecção: pacientes com cultura positiva no passado para *Pa*, mas que todas culturas foram negativas nos últimos 12 meses.
- Nunca infectado: paciente que nunca apresentou cultura positiva para *Pa*.

Insuficiência pancreática foi definida pela presença de um dos seguintes critérios: elastase fecal $< 200 \mu\text{g/g}$, avaliação laboratorial mostrando presença de gordura fecal ou evidências clínicas de IP com necessidade de TREP, representada por sintomas de má-absorção ou baixo ganho ponderal (RBH, 2017). Íleo meconial foi determinado pela obstrução do íleo terminal ou da porção proximal do intestino grosso ocorrida no período neonatal (DE LISLE; BOROWITZ, 2013).

Distúrbio hidroeletrolítico foi caracterizado pela presença de níveis séricos de sódio, potássio e/ou cloro abaixo do limite inferior da normalidade e/ou sódio urinário inferior a 20 mmol/l , em amostra isolada. Síndrome de pseudo-Bartter foi definida como a presença de alcalose metabólica hipoclorêmica e hipocalêmica. Anemia hipoalbuminêmica foi determinada pela presença de anemia hemolítica sem causa determinada, hipoalbuminemia e edema (RBH, 2017).

Hepatopatia foi caracterizada pela presença de colestase neonatal ou de doença hepática relacionada à FC, definida como (FLASS; NARKEWICZ, 2013):

- Doença hepática associada à FC com cirrose ou hipertensão portal (baseado na avaliação clínica, exames de imagem, histologia ou laparoscopia) ou;
- Envolvimento hepático sem cirrose ou hipertensão portal consistindo na presença de pelo menos uma das seguintes alterações: aumento persistente de TGO, TGP e GGT maior que 2 vezes o limite superior da normalidade; elevações intermitentes desses exames laboratoriais; esteatose, fibrose hepática ou colangiopatia (baseada em ultrassom, tomografia computadorizada, ressonância magnética ou colangiopancreatografia retrógrada endoscópica) ou;
- Anormalidades ultrassonográficas não consistentes com cirrose hepática.

Para definição de constipação intestinal, foram utilizados os critérios de ROMA IV para constipação funcional, conforme descrito abaixo (HYAMS et al., 2016):

- Critérios diagnósticos para constipação funcional até 4 anos de idade (deve incluir pelo menos 2 dos sintomas seguintes, por pelo menos 1 mês):
 - Duas ou menos evacuações por semana.
 - História de retenção fecal excessiva.
 - História de evacuação dolorosa ou difícil.
 - História de fezes de grande diâmetro.
 - Presença de grande massa fecal em reto.

Em crianças que tenham completado o treinamento de esfíncter, o critério adicional pode ser usado: pelo menos 1 episódio por semana de incontinência após a aquisição do controle esfíncteriano.

- Critérios diagnósticos para constipação funcional em maiores de 4 anos de idade (deve incluir 2 ou mais dos sintomas seguintes, pelo menos 1 vez na semana, por pelo menos 1 mês, com critérios insuficientes para o diagnóstico de síndrome do intestino irritável):
 - Duas ou menos evacuações por semana.
 - Pelo menos 1 episódio de incontinência fecal por semana.
 - História de postura retentiva ou excessiva retenção fecal voluntária.
 - História de evacuação dolorosa ou difícil.
 - Presença de grande massa fecal no reto.
 - História de fezes de grande diâmetro, que podem obstruir o vaso sanitário.

Em relação ao uso de antibióticos pelas crianças com FC e à quantidade de internações durante a vida, foi calculado um índice dividindo o número de ciclos desta medicação e o de internações pelos meses de vida desses pacientes, para permitir a comparação dessas variáveis entre crianças de diferentes idades.

3.6. Procedimentos previstos

Os pacientes com FC e as crianças saudáveis foram convidados a participar do estudo no dia da consulta médica ambulatorial de rotina. Após consentimento dos pais ou responsáveis e assinatura do TCLE, foi realizada uma entrevista sobre as condições de nascimento, o histórico médico e alimentar e sobre o uso de medicações crônicas. As condições atuais de saúde, relato de sintomas gastrointestinais (dor abdominal, náusea, vômito, constipação e diarreia) e extraintestinais recentes, além do uso de medicações, foram obtidos na data da coleta das fezes. Os dados clínicos e demográficos descritos acima foram complementados pela revisão dos prontuários médicos.

As medidas antropométricas foram realizadas por um dos pesquisadores do estudo, no dia da coleta das amostras fecais. As crianças estavam descalças e usando roupas leves e foram pesadas em balanças eletrônicas da marca Filizola®, graduadas em gramas. O comprimento das crianças com menos de 2 anos foi aferido em posição horizontal, com estadiômetro infantil, com precisão de 1 cm. Aquelas com idade igual ou superior a 2 anos foram medidas em pé, com régua antropométrica acoplada à balança ou por meio de estadiômetro.

Todos os participantes receberam um coletor plástico e espátula coletora estéreis, um par de luvas descartáveis, uma caixa térmica de isopor e gelos de plástico. Os pais ou responsáveis receberam instruções detalhadas quanto ao método de coleta estéril. Foram esclarecidos a coletar as fezes das fraldas e logo após, transferi-las para o coletor plástico ou o paciente poderia evacuar diretamente no coletor. Após a coleta, o material deveria ser acondicionado em freezer domiciliar (- 4°C) e, posteriormente, colocado em caixa térmica resfriada com gelo para o seu transporte ao hospital até 1 dia após a coleta, no dia do retorno médico ou em outra data escolhida pelo paciente.

O material recebido, em média 10 g de fezes de cada paciente, foi transportado ao Laboratório de Pediatria do HC-FMRP-USP. As amostras foram fracionadas em alíquotas de 200 mg em microtubos estéreis e imediatamente armazenadas em freezer a -80°C até o momento da análise.

3.7. Determinação da calprotectina fecal

Ao término da coleta das amostras fecais de todos os pacientes, um ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA (RIDASCREEN® Calprotectin, R-Biopharm AG, Alemanha) foi utilizado para medir quantitativamente a concentração de CLP, cujos níveis foram expressos em mg/kg de fezes. Esta etapa do estudo foi realizada no Laboratório de Pediatria do HCRP-FMRP-USP.

Antes da análise, as amostras congeladas atingiram lentamente a temperatura ambiente. Foram pesadas 100 mg de fezes, que foram homogeneizadas com tampão de extração na diluição de 1:50, com um misturador tipo vortex. O sobrenadante do procedimento de extração foi diluído com um tampão de diluição a 1: 50. 100 µl de cada amostra fecal diluída, dos 5 padrões (com concentrações de CLP de 19,5/56/95/275/800 mg/kg), do controle positivo e do controle negativo (tampão de diluição) foram transferidos para uma microplaca revestida com anticorpos monoclonais específicos para a calprotectina humana. A placa ficou incubada à temperatura ambiente (20-25°C) durante 1 hora.

Após a primeira lavagem, foi realizada uma segunda incubação com um anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase de raiz forte. Existindo calprotectina na amostra, formava-se um complexo tipo sanduíche constituído pelo anticorpo imobilizado, pela calprotectina e pelo anticorpo conjugado. Os anticorpos marcados com enzimas não-ligados foram removidos em uma lavagem seguinte. Em seguida, foi realizada uma terceira incubação com substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina) por 15 minutos, ao escuro, à temperatura ambiente. Depois da adição deste substrato, a enzima ligada em amostras positivas transformou a solução incolor nos poços da microplaca em uma solução azul. Posteriormente, foi adicionado reagente de parada para terminar a reação e essa coloração azul mudou para amarelo. Após esse procedimento, foi medida a extinção por um fotômetro para microplacas, a um comprimento de onda de referência de 450 nm e 620 nm. A concentração da CLP foi determinada por comparação da extinção medida das amostras para a curva padrão, que corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância e os de concentração. O limite de detecção do teste foi de 19,5 mg/kg. As amostras com valores superiores a 600 mg/kg foram rediluídas a 1:5 e submetidas a um novo teste.

3.8. Análise estatística

Para a análise das variáveis demográficas e clínicas categóricas foi utilizado o teste exato de Fisher e para as quantitativas, o teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney.

A CLP foi considerada na forma de logaritmo de base 10 (log 10) para as análises, devido à grande variabilidade de seus valores. A comparação entre os grupos foi realizada através das médias dos logaritmos. Para a comparação das médias dos valores de calprotectina fecal entre os pacientes com fibrose cística e o grupo dos saudáveis, foram ajustados modelos de regressão linear, simples (modelo1) e múltiplos (modelo2), considerando as covariáveis tipo de parto e dieta (tempo de aleitamento materno exclusivo e de aleitamento materno total).

Para avaliar a associação entre os níveis de CLP e as características clínicas dos pacientes com FC, também foram utilizados modelos de regressão linear simples (modelo 1) e múltiplos (modelo 2), com ajuste por idade. A relação entre duas variáveis quantitativas foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância adotado foi de 5%. O software utilizado para as análises foi o SAS 9.4.

3.9. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP) do HC-FMRP-USP (Anexo A). Todos os procedimentos previstos no estudo foram realizados somente após aprovação pelo CEP.

Os pais ou responsáveis receberam explicação sobre o objetivo do estudo e os procedimentos necessários para a sua realização - TCLE (Apêndices A e B) e Termo de consentimento para guarda de material biológico (Apêndice C). Foi obtido consentimento informado escrito de todas as crianças envolvidas no estudo.

4.RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características clínicas e demográficas das crianças saudáveis e das com fibrose cística

A coleta das amostras fecais ocorreu de março de 2017 a março de 2018. Foram incluídas no estudo 30 crianças com fibrose cística e 39 saudáveis, com idades variando de 3 a 86 meses e 4 a 88 meses, e médias (DP) de 47,63 (27,60) e 43,64 (25,93), respectivamente. Os dados dos pacientes foram registrados na ocasião da coleta. As características clínicas e demográficas estão descritas na tabela 1. Não houve diferença entre os grupos em relação à idade, sexo, idade gestacional e peso de nascimento. Notou-se uma diferença significativa entre o tipo de parto, com uma elevada taxa de cesariana nos pacientes com fibrose cística em comparação aos saudáveis (76,67% x 38,46%, $p < 0,01$).

O tempo de aleitamento materno exclusivo e de aleitamento materno total foi superior nas crianças saudáveis ($p < 0,01$), mas não houve diferença em relação à idade de introdução de sólidos na dieta entre os grupos ($p = 0,47$), (Tabela 2). Nenhuma criança (com FC ou as pertencentes ao grupo de comparação) estava sendo exclusivamente amamentada no momento de sua inclusão no trabalho. Duas crianças com FC estavam em aleitamento materno e deste grupo, três não havia iniciado sólidos na dieta. Do grupo saudável, nove crianças estavam em aleitamento materno e duas ainda não recebiam sólidos em sua alimentação. Desta forma, devido ao reduzido número desses indivíduos, eles não foram incluídos na comparação entre os grupos em relação à dieta.

Tabela 1- Características clínicas e demográficas das crianças com FC e saudáveis.

	FC (n = 30)	Saudáveis (n = 39)	p - valor
Idade^{a*}			0,63
Média (DP)	47,63 (27,60)	43,64 (25,93)	
Mediana (Q1; Q3)	47,50 (20,00; 75,00)	46,00 (21,00; 66,00)	
Faixa etária, n (%) **			0,81
≤ 4 anos	16 (53,33)	22 (56,41)	
> 4 anos	14 (46,67)	17 (43,59)	
Sexo, n (%) **			1,00
Masculino	17 (56,67)	21 (53,85)	
Feminino	13(43,33)	18 (46,15)	
Tipo de parto, n (%) **			< 0,01
Vaginal	7 (23,33)	24 (61,54)	
Cesáreo	23 (76,67)	15 (38,46)	
Idade Gestacional, n (%) **			0,31
Termo	27 (90)	38 (97,44)	
Pré-termo	3 (10)	1 (2,56)	
Peso de nascimento (g) *			0,10
Média (DP)	2986,07 (488,42)	3193,68 (405,27)	
Mediana (Q1; Q3)	2997,5 (2780; 3330)	3295,00 (2965; 3430)	

^a: Idade expressa em meses.

* “p- valor” obtido pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney.

** “p-valor” obtido pelo teste exato de Fisher.

Tabela 2 - Histórico alimentar dos pacientes com FC e das crianças saudáveis.

	Grupo	Média	DP	Mín.	Q1	Mediana	Q3	Máx.	p-valor
LME ^a	FC	2,74	2,08	0,03	0,50	3,00	4,00	7,00	< 0,01
	GS	4,20	1,84	0,00	3,00	4,50	6,00	6,00	
LM ^a	FC	5,71	7,03	0,03	0,70	3,50	6,00	24,00	< 0,01
	GS	13,61	11,91	2,00	5,00	7,50	24,00	48,00	
Sólidos ^{a, b}	FC	4,89	0,97	3,00	4,00	5,00	6,00	7,00	0,47
	GS	5,06	0,89	4,00	4,00	5,00	6,00	6,00	

FC: pacientes com fibrose cística; GS: grupo dos saudáveis; LM: tempo de aleitamento materno total; LME: tempo de aleitamento materno exclusivo.

^a: variáveis expressas em meses de vida.

^b: idade de introdução de sólidos na dieta em meses.

* “p- valor” obtido pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney.

4.2. Características clínicas das crianças com fibrose cística

As características clínicas dos pacientes com FC são mostradas na tabela 3. A idade média (DP) ao diagnóstico foi de 1,5 (0,89) meses. Todos estavam recebendo polivitamínico, segundo protocolo do serviço. Todos com insuficiência pancreática estavam em uso de terapia de reposição de enzimas pancreáticas (TREP), cuja dose média (DP) foi de 7167 (3010,33) UI/Kg/dia, variando de 1750 a 14814 UI/Kg/dia. Para avaliar a associação dos valores de CLP com o tipo de infecção respiratória por *Pseudomonas aeruginosa*, foram agrupados os pacientes com infecção crônica e intermitente, e os que estavam livres de infecção com os nunca infectados, devido ao número reduzido de indivíduos para comparação. O número de ciclos de antibióticos durante a vida variou de 0 a 38 vezes, com média (DP) de 12,10 (9,73) e média (DP) do índice de 0,24 (0,11) vezes/mês de vida. A quantidade de internações durante a vida variou de 1 a 10 vezes, com uma média (DP) de 3,10 (2,73) e média (DP) do índice de 0,11 (0,11) internações/mês de vida.

Tabela 3- Características clínicas dos pacientes com FC.

	n (%)
Estado nutricional	
Eutrofia	21 (70)
Desnutrição	7 (23,33)
Sobrepeso/Obesidade	2 (6,67)
Insuficiência pancreática	
S	24 (80)
N	6 (20)
Distúrbio hidroeletrólítico	
S	27 (90)
N	3 (10)
Anemia hipoalbuminêmica	
S	11 (36,67)
N	19 (63,33)
Síndrome de pseudo-Bartter	
S	13 (43,33)
N	17 (56,67)
Íleo meconial	
S	4 (13,33)
N	26 (86,67)
DRGE	
S	7 (23,33)
N	23 (76,67)
Constipação intestinal	
S	6 (20)
N	24 (80)
Rinite alérgica	
S	17 (56,67)
N	13 (43,33)
Hepatopatia	
S	5 (16,67)
N	25 (83,33)
Ressecção intestinal	
S	4 (13,33)
N	26 (86,67)
Infecção respiratória por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Crônica	1 (3,33)
Intermitente	16 (53,33)
Livre	5 (16,67)
Nunca infectado	8 (26,67)
Uso de inibidor de acidez gástrica	
S	6 (20)
N	24 (80)
Uso de corticoide nasal/inalatório	
S	13 (43,33)
N	17 (56,67)

DRGE: doença do refluxo gastroesofágico; S: sim; N: não.

4.3. Comparação dos níveis de calprotectina fecal entre as crianças com fibrose cística e as saudáveis

Os gráficos das figuras de 3 a 8, mostram a dispersão dos valores de CLP em relação à idade, em cada grupo. Ao avaliar os indivíduos sem divisão por faixa etária, houve uma correlação negativa entre os níveis de calprotectina fecal e a idade, tanto nas crianças saudáveis como nas com fibrose cística, demonstrando uma tendência à redução da CLP com a idade (Figuras 3 e 4). Nas crianças saudáveis, essa correlação negativa se manteve em cada grupo etário (≤ 4 anos e > 4 anos), (Figuras 5 e 7). Já nas crianças com FC, na avaliação por faixa etária, não houve correlação negativa da CLP com a idade, mostrando que em ambos os grupos a CLP tendeu a se manter elevada (Figuras 6 e 8).

Figura 3- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, no grupo de crianças saudáveis.

Figura 4- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, no grupo de crianças com fibrose cística.

Figura 5- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, nas crianças saudáveis ≤ 4 anos.

Figura 6- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, nas crianças com fibrose cística ≤ 4 anos.

Figura 7- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, nas crianças saudáveis maiores de 4 anos.

Figura 8- Dispersão dos níveis de calprotectina fecal com a idade, nas crianças com fibrose cística maiores de 4 anos.

À subdivisão dos grupos por faixa etária, observou-se uma ampla variabilidade dos valores de CLP nos pacientes com fibrose cística com idade igual ou inferior a 4 anos, tanto em relação aos saudáveis quanto às crianças com FC maiores de 4 anos (Figura 9). Os níveis de CLP estão descritos na tabela 4 e 5. Os valores de calprotectina expressos em log 10, de acordo com a faixa etária, estão no apêndice D.

Figura 9- Box plot representando a variabilidade dos valores de calprotectina fecal entre os grupos FC e saudáveis, de acordo com a faixa etária.

Tabela 4- Níveis de calprotectina fecal nas crianças com FC e nas saudáveis.

Grupo	n	Média	DP	Mín.	Q1	Mediana	Q3	Máx.
FC	30	674,21	873,62	19,50	151,31	293,08	536,33	3435,86
GS	39	239,89	286,92	19,50	52,78	146,78	339,24	1402,15

FC: pacientes com fibrose cística; GS: grupo dos saudáveis.

Tabela 5- Níveis de CLP nas crianças com FC e nas saudáveis, de acordo com a faixa etária.

Grupo	Idade	n	Média	DP	Mín.	Q1	Mediana	Q3	Máx.
FC	≤ 4 anos	16	1058,35	1040,82	19,50	293,08	492,09	1897,67	3435,86
	> 4 anos	14	235,19	251,77	47,08	61,63	169,04	246,02	988,06
GS	≤ 4 anos	22	321,38	345,48	20,13	60,65	203,59	416,24	1402,15
	> 4 anos	17	134,43	133,85	19,50	36,59	85,68	152,81	489,43

FC: pacientes com fibrose cística; GS: grupo dos saudáveis.

Ao comparar-se os níveis de CLP, ajustado por tipo de parto e dieta, entre os grupos das 30 crianças com FC e as 49 saudáveis, não houve diferença entre eles ($p = 0,17$), (Tabela 6).

Tabela 6- Comparação entre as médias de calprotectina fecal entre os grupos FC x saudáveis, sem divisão por faixa etária.

Modelo 1 ^a				Modelo 2 ^b		
Comparação	Δ^c	p-valor	IC95%	Δ^c	p-valor	IC95%
FC - GS	0,38	< 0,01	(0,12; 0,64)	0,24	0,17	(-0,10; 0,58)

^a Modelo de regressão linear simples.

^b Modelo de regressão linear múltiplo (ajustado por tipo de parto e dieta).

^c valores em log 10.

Δ : diferença estimada entre as médias dos logaritmos dos valores da CLP.

Após subdivisão por grupo etário, observaram-se valores de CLP mais elevados nos pacientes com fibrose cística com idade igual ou inferior a 4 anos em comparação ao grupo saudável, sem e com ajuste por tipo de parto e dieta ($p = 0,03$). Nas crianças acima de 4 anos, não houve diferença dos níveis de CLP entre os grupos ($p = 0,74$), (Tabela 7).

Tabela 7- Comparação entre as médias de CLP, entre os grupos, em cada faixa etária

Modelo 1 ^a					Modelo 2 ^b		
Idade	Comp.	Δ^c	p-valor	IC95%	Δ^c	p-valor	IC95%
≤4 a	FC - GS	0,51	< 0,01	(0,15; 0,88)	0,54	0,03	(0,04; 1,03)
>4 a	FC - GS	0,25	0,1	(-0,05; 0,56)	0,10	0,74	(-0,54; 0,74)

^a Modelo de regressão linear simples.

^b Modelo de regressão linear múltiplo (ajustado por tipo de parto e dieta).

^c valores em log 10.

Δ : diferença estimada entre as médias dos logaritmos dos valores da CLP.

No grupo FC, os níveis de CLP foram maiores nos indivíduos com idade menor ou igual a 4 anos, em comparação aos maiores de 4 anos, com e sem ajuste por tipo de parto e dieta ($p = 0,01$). Não houve diferença entre os valores de CLP em relação ao grupo etário nas crianças saudáveis ($p = 0,30$), (Tabela 8)

Tabela 8- Comparação entre as médias da CLP, entre as faixas etárias, em cada grupo.

Modelo 1 ^a					Modelo 2 ^b		
Grupo	Comparação	Δ^c	p-valor	IC95%	Δ^c	p-valor	IC95%
FC	(≤ 4 anos) - (> 4 anos)	0,57	$< 0,01$	(0,20; 0,94)	0,65	0,01	(0,15; 1,15)
GS	(≤ 4 anos) - (> 4 anos)	0,31	0,06	(-0,007; 0,63)	0,19	0,30	(-0,18; 0,55)

^a Modelo de regressão linear simples.

^b Modelo de regressão linear múltiplo (ajustado por tipo de parto e dieta).

^c valores em Log10.

Δ : diferença estimada entre as médias dos logaritmos dos valores da CLP.

Devido ao possível efeito do corticoide nos valores de CLP, posteriormente realizou-se uma nova comparação entre os grupos (FC vs. saudáveis), excluindo os pacientes com FC que estavam em uso de corticoide inalatório e/ou corticoide nasal. Também não houve diferença dos níveis de CLP entre esses pacientes e as crianças saudáveis, com ajuste por tipo de parto e dieta ($p = 0,06$), (Tabela 9).

Tabela 9- Comparação entre os grupos saudável e FC, excluindo os pacientes com FC em uso de corticoide inalatório ou nasal.

Grupo	N	Média ^a	DP ^a	Mín. ^a	Q1 ^a	Mediana ^a	Q3 ^a	Máx. ^a
FC	17	2,69	0,60	1,29	2,42	2,70	3,27	3,54
GS	39	2,11	0,51	1,29	1,65	2,17	2,54	3,15

Modelo estatístico: regressão linear simples (modelo 1) e múltiplo (modelo 2).

Modelo1: diferença entre as médias = -0,57; IC95% (-0,89; -0,26); p-valor $< 0,01$.

Modelo2: diferença entre as médias = -0,39; IC95% (-0,78; 0,006); p-valor = 0,06.

^a Valores expressos em logaritmo de base 10.

Para as crianças maiores que 4 anos, foi realizada uma análise posterior, considerando presença de inflamação intestinal um valor de CLP superior a 50 mg/Kg, conforme indicado pelo fabricante do kit. Destas crianças, 92,86% (13/14) com FC apresentaram nível de CLP

superior ao valor de referência em comparação a 70,59% (12/17) das crianças saudáveis ($p = 0,18$). Ao utilizar um valor de referência de 100 mg/Kg como sugerido por alguns autores, 64,29% (9/14) dos pacientes com FC apresentaram níveis elevados versus 47,06% (8/17) das crianças pertencentes ao grupo saudável ($p = 0,47$). Portanto, não houve diferença entre os grupos em relação à presença de inflamação intestinal, considerando esses valores de referência.

4.4. Comparação dos níveis de calprotectina fecal e as características clínicas das crianças com fibrose cística

Na análise das características clínicas dos pacientes com FC, foi realizado ajuste por idade (modelo 2). Os níveis de CLP de acordo com as características clínicas estão descritos no apêndice E e os valores em log 10, no apêndice F. Não houve associação entre os níveis de calprotectina fecal e gênero ($p=0,77$) ou tipo de parto (0,20). Os valores desse marcador foram maiores nas crianças que já apresentaram pseudo-Bartter, ($p = 0,01$). Não houve relação com presença de anemia hipoalbuminêmica ($p = 0,24$), (Tabela 10).

Os níveis de calprotectina fecal também não se associaram à presença de insuficiência pancreática ($p = 0,49$), (Tabela 10) e não houve correlação desse biomarcador com a dose de enzima pancreática usada pelos pacientes ($p = 0,36$), (Figura 10). Também não se evidenciou associação da CLP com o tipo de infecção respiratória por *Pseudomonas aeruginosa* ($p = 0.19$), estado nutricional ($p = 0.12$) e uso de inibidor de bomba de prótons ($p = 0.34$). Também não houve correlação entre os níveis de calprotectina fecal e o número de uso prévio de antibióticos ou de hospitalizações durante a vida (Figura 11 e 12). Não foi realizada a comparação da CLP e as seguintes características clínicas, devido ao reduzido número de indivíduos: distúrbio hidroeletrolítico, íleo meconial, hepatopatia, doença do refluxo gastroesofágico, constipação e ressecção intestinal.

Tabela 10- Relação entre os níveis de CLP e as características clínicas dos pacientes com FC

	Comparação	Modelo ^a	Δ^b	IC95%	p-valor
Anemia	S x N	1	0,38	-0,03; 0,80	0,07
hipoalbuminêmica	S x N	2	0,24	-0,16; 0,65	0,24
Pseudo- Bartter	S x N	1	0,48	0,08; 0,89	0,02
	S x N	2	0,49	0,14; 0,84	0,01
Insuficiência pancreática	S x N	1	0,26	-0,27; 0,79	0,32
	S x N	2	0,16	-0,31; 0,64	0,49
Estado nutricional	D x E	1	0,08	-0,45; 0,62	0,75
	D x E	2	0,37	-0,10; 0,86	0,12
Infecção por <i>Pa</i>	(C+I) x (L+Nu)	1	-0,31	-0,73; 0,10	0,13
	(C+I) x (L+Nu)	2	0,24	-0,62; 0,13	0,19
Uso de IBP	S x N	1	-0,02	-0,57; 0,52	0,92
	S x N	2	-0,23	-0,71; 0,26	0,34

C: infecção crônica; D: desnutrição; E: eutrofia; I: infecção intermitente; IBP: inibidor de bomba de prótons; IP: insuficiência pancreática; L: livre de infecção; N: não; Nu: nunca infectado; *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*; S: sim.

^a Modelo de regressão linear (1= simples; 2 = múltiplo – ajustado por idade).

^b: valores em Log10.

Δ : diferença estimada entre as médias dos logaritmos dos valores da CLP.

Fig.10- Correlação entre os valores de calprotectina fecal e a dose da enzima pancreática.

Fig.11- Correlação entre os valores de CLP e número de ciclos de antibióticos durante a vida.

Fig.12- Correlação entre os valores de CLP e a quantidade de internações na vida.

5.DISSCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A inflamação intestinal é um aspecto típico da fibrose cística e pode estar associada a múltiplos fatores, como desordem genética, uso crônico de antibióticos e de IBP, alteração da motilidade intestinal e função pulmonar (ADRIAANSE et al., 2015; DHALIWAL et al., 2015; WERLIN et al., 2010). Esses elementos podem desencadear disbiose e supercrescimento bacteriano no lúmen intestinal, com liberação de citocinas inflamatórias e ativação neutrofílica, com consequente aumento da calprotectina fecal (BRUZZESE et al., 2004). Postula-se também que mediadores inflamatórios pulmonares seriam liberados na circulação sistêmica e alcançariam o intestino, ou, alternativamente, poderiam ser deglutidos junto com a secreção pulmonar, e assim, chegariam ao trato gastrointestinal. Além disso, a função pulmonar reduzida, poderia levar a hipoxemia intestinal, contribuindo para a inflamação intestinal. (PARISI et al., 2017).

Nos últimos anos, a calprotectina fecal vem sendo o marcador de inflamação intestinal mais estudado na FC, mas poucos são os estudos em crianças e os resultados são conflitantes. Vários trabalhos vêm demonstrando seu aumento em indivíduos com FC em comparação aos controles saudáveis, evidenciando que a inflamação intestinal é um aspecto relacionado à doença (DHALIWAL et al., 2015; ELLEMUNTER et al., 2017; GARG et al., 2017; PARISI et al., 2017). Trabalhos recentemente publicados mostraram por meio do aumento dos níveis de calprotectina fecal e de outros biomarcadores fecais, como piruvato quinase M2, que a inflamação intestinal está presente precocemente nas crianças com FC, já nos primeiros anos de vida (DE FREITAS et al., 2018; GARG et al., 2017, 2018).

Um estudo em Sidney, na Austrália, avaliou 64 crianças com FC e 114 controles saudáveis menores de 10 anos, utilizando amostras fecais congeladas, e mostrou uma ampla variabilidade da CLP tanto em crianças com FC (19,5 – 522,5 mg/kg nos menores de 4 anos e 19,5–572,1 mg/kg dos 4 aos 10 anos) quanto nas saudáveis menores de 4 anos (19,5–602,6 mg/kg), com uma tendência à redução dos valores com a idade. Os autores evidenciaram níveis significativamente inferiores de CLP nos menores de 12 meses portadores de FC em relação aos saudáveis [mediana (intervalo) 19,7 mg/kg (19,5–522,5 mg/kg) x 127,7 mg/kg (19,5–602,6 mg/kg), $p = 0,03$], com uma tendência de aumento até 4 anos. Não houve diferença entre os grupos nas crianças de 1 a 4 anos e, a partir de 4 anos, mostrou uma reversão dessa tendência, com os níveis de CLP permanecendo persistentemente elevados nos pacientes com FC em relação aos controles saudáveis (GARG et al., 2017). Nosso trabalho mostrou uma relação inversa ao desse estudo. Observamos níveis de CLP significativamente maiores nos fibrocísticos com idade igual ou inferior a 4 anos em comparação aos saudáveis ($p = 0,03$), sendo que nos

maiores de 4 anos, os valores também permaneceram mais elevados nas crianças com FC, mas sem diferença significativa ($p=0,74$). Entretanto, não foi possível analisar os menores de 12 meses, devido ao número reduzido de indivíduos nessa faixa etária.

No presente trabalho, notou-se também uma grande variabilidade da CLP nas crianças com FC menores de 4 anos, tanto em relação às maiores de 4 anos, quanto em comparação aos saudáveis, porém com valores superiores aos encontrados na literatura, chegando a níveis descritos em pacientes com doença inflamatória intestinal (3435,86 mg/kg), (DHALIWAL et al., 2015). Estudo realizado em Florianópolis - SC, utilizando a mesma técnica laboratorial, porém amostrais fecais não congeladas, evidenciou aumento significativo de CLP em crianças e adolescentes com FC em relação aos controles saudáveis, mas identificou valores bem inferiores aos da presente pesquisa, com mediana igual a 40,80 $\mu\text{g/g}$ ($Q1-Q3 = 19,80 - 87,10 \mu\text{g/g}$) x 20,15 $\mu\text{g/g}$ ($Q1-Q3: 16,20 - 31,00 \mu\text{g/g}$) nos pacientes com FC e nos saudáveis, respectivamente (DE FREITAS et al., 2018).

Ao realizar análise por faixa etária, nos pacientes com FC, os valores de CLP tenderam a se manter elevados dentro de um mesmo grupo etário (não houve correlação dos valores de CLP com idade dentro cada grupo), (Figuras 6 e 8). Contudo, na avaliação geral de todos os pacientes, houve uma correlação negativa da calprotectina fecal com a idade, tanto nos indivíduos com FC quanto nos saudáveis, mostrando uma tendência de redução em seus níveis com o avançar dos anos (Figuras 3 e 4). Ellemunter, Schüller e Steinkamp (2018) analisaram recentemente dados de um estudo em crianças com FC menores de 12 meses e observaram mediana (intervalo) de CLP igual a 285 $\mu\text{g/g}$ (19 a 3330 $\mu\text{g/g}$), com uma taxa de declínio em seus valores de 23% por mês com o avançar da idade, com resultados similares nas crianças saudáveis.

Contraditoriamente, Parisi et al. (2017) encontraram média (DP) de CLP igual a 517,5 $\pm$ 231,9 $\mu\text{g/g}$ em menores de 18 anos com FC, contudo, mostraram aumento dos valores de CLP em adultos, em comparação aos menores de 18 anos e Ellemunter et al. (2017) não evidenciaram alteração da CLP entre os diferentes grupos etários avaliados. Porém, esses estudos utilizaram uma ampla faixa etária para comparação dos dados e não usaram um vasto critério de exclusão, sendo englobadas variáveis como diarreia e exacerbação pulmonar, potenciais confundidores nos valores da calprotectina fecal.

As pesquisas vêm demonstrando que a CLP é naturalmente elevada nos primeiros 4 anos de vida. Oord e Hornung (2014) sugeriram 3 valores de ponto de corte para avaliar CLP em crianças saudáveis, baseados nos percentis 97,5%: 538 mg/kg (1 a 6 meses), 214 mg/kg (6 meses a 3 anos) e 75 mg/kg (3 a 4 anos). Roca et al. (2017) também encontraram valores

elevados de CLP nos primeiros anos de vida de crianças saudáveis (17,3 mg/kg a 2681,7 mg/kg) e sugeriram valores de referência para a faixa pediátrica, considerando o percentil 95% para cada faixa etária: 910,3 mg/kg (0 a 12 meses), 285,9 mg/kg (1 a 4 anos) e 54,4 mg/kg (4 a 12 anos). No presente estudo, também foram observados valores maiores de CLP nos menores de 4 anos em relação às crianças saudáveis, porém sem diferença significativa em relação aos maiores de 4 anos ($p = 0,30$), com médias e medianas superiores às descritas na literatura.

No período neonatal, a permeabilidade do intestino delgado é maior do que nos adultos, devido à imaturidade do trato gastrointestinal e do sistema imunológico. O sistema gastrointestinal passa por um significativo desenvolvimento no primeiro ano de vida, assim como por um crescimento em extensão até os 3 a 4 anos de idade. A aquisição da microbiota intestinal ocorre durante o primeiro ano de vida, atingindo um perfil de microbiota adulta ao final deste primeiro ano. Além disso, o sistema de imunoglobulina A, a primeira linha de defesa da barreira imunológica, não amadurece completamente até os 4 anos de idade e dessa forma, considera-se geralmente que a barreira mucosa não está totalmente madura, justificando o aumento de CLP nesses primeiros anos de vida (ANDERSON et al., 2012).

Os achados de CLP em crianças abaixo de 4 anos são bem conflitantes, sugerindo que ela deve ser interpretada com cautela nessa faixa etária. Apesar da sugestão de alguns autores em relação aos pontos de corte em diferentes grupos etários, os achados são muito variáveis entre os trabalhos, ainda não permitindo o estabelecimento de um ponto de corte para essas crianças. Isso sugere que a principal utilidade da CLP em menores de 4 anos, seria a monitorização da variação intraindividual, o que permitiria a avaliação da progressão da doença ou resposta a intervenções terapêuticas (ROCA et al., 2017).

Para crianças maiores que 4 anos e em adultos, o valor de calprotectina fecal superior a 50 mg/kg vem sendo utilizado para indicar presença de inflamação intestinal (ALIBRAHIM; ALJASSER; SALH, 2015). Utilizando esse valor de referência, estudos em crianças e adolescentes têm mostrado um aumento desse biomarcador em 47% a 57,3% dos pacientes com FC em comparação a 10% nas crianças saudáveis (DE FREITAS et al., 2018; GARG et al., 2017). Um único estudo mostrou aumento de CLP em apenas 9,7% das crianças com FC estudadas, mas foi utilizada uma ampla faixa etária para comparação, não foram definidos critérios de exclusão e não houve comparação com crianças saudáveis (WIECEK et al., 2017). No presente estudo, utilizando o ponto de corte igual a 50 mg/kg, foram observados valores aumentados de CLP na maioria das crianças com idade superior a 4 anos, tanto nas com FC quanto nas saudáveis (92,86% x 70,59%, respectivamente; $p = 0,18$). Ao ser utilizado um valor de referência igual a 100 mg/Kg como sugerido por alguns autores (PARISI et al., 2017; DE

FREITAS et al., 2018), 64,29% dos pacientes com FC apresentaram níveis elevados em comparação a 47,06% das crianças saudáveis ($p = 0,47$). Porém, não houve evidência de diferença entre os grupos em relação à presença de inflamação intestinal, considerando ambos os valores de referência, o que foi atribuído ao elevado percentual de crianças saudáveis com valores aumentados de CLP. Além disso, a diferença entre os grupos pode não ter sido detectada devido ao baixo poder do teste para comparação dos níveis de CLP entre os indivíduos dessa faixa etária.

Além dos valores da CLP se apresentarem normalmente mais elevados em crianças, outros possíveis fatores para este aumento observado nos saudáveis podem ter sido a utilização de amostras fecais congeladas e a presença de enteropatia ambiental, condição do intestino delgado associada à inflamação e ao aumento da permeabilidade intestinal. Essa condição é muito comum em países em desenvolvimento e está relacionada à carga de enteropatógenos nas crianças desses países (PRAHARAJ et al., 2018). Em um estudo na cidade de São Paulo, os autores analisaram a microbiota fecal de crianças saudáveis menores de 1 ano com baixo nível sócioeconômico e encontraram uma alta abundância relativa de *Escherichia coli* (*E. coli*) (34%), diferentemente do observado em crianças de países desenvolvidos (TADDEI et al., 2014). Pesquisa realizada na Índia evidenciou uma alta carga de enteropatógenos e níveis de calprotectina fecal significativamente maiores em lactentes que viviam em condições ambientais menos favorecidas, em comparação a crianças da mesma faixa etária que viviam em melhores condições. Nesse estudo, *E. coli* enteroagregativa e *Campylobacter* spp foram as bactérias patogênicas mais prevalentes (PRAHARAJ et al., 2018). A região geográfica em que a criança nasce parece ser um dos principais fatores na composição da microbiota intestinal, a qual parece diferir entre crianças de países desenvolvidos em comparação com países em desenvolvimento. Uma das explicações seria a alta contaminação ambiental em que as crianças dos países em desenvolvimento estão expostas nos primeiros anos de vida, associada às diversidades dietéticas (FALLANI et al., 2011; TADDEI et al., 2014).

Na presente pesquisa, também foram observados alguns valores atípicos de CLP. Nos saudáveis maiores de 4 anos, houve 2 *outliers* (489,43 e 384,64 mg/kg), identificados em crianças que nasceram de parto normal e receberam aleitamento materno por menos de 6 meses. Nesse mesmo grupo, mas nos menores de 4 anos também foram observados 2 valores aberrantes, um de 1402,15 mg/kg em uma criança de 42 meses, que nasceu de parto cesáreo, recebeu aleitamento materno por 2 meses e teve introdução de sólidos em sua dieta de forma precoce, aos 4 meses; e outro de 1022,35 mg/kg, num bebê de 4 meses, nascido de parto cesáreo e que estava em aleitamento materno exclusivo. Esses valores podem se justificados pela alta

permeabilidade da mucosa intestinal nessa idade associado ao tipo de parto e à dieta, em adição a uma possível presença de enteropatia ambiental. Também foi observado mais um *outlier* de 988,06 mg/kg numa criança com FC de 86 meses, nascida de parto cesáreo, com fenótipo grave. Apresentou quadro de desidratações com anemia hipoalbuminêmica e síndrome de pseudo-Bartter nos primeiros meses de vida, 8 internações hospitalares (devido a distúrbios metabólicos, quadros de exacerbação pulmonar e tratamento de infecção respiratória por *Pseudomonas aeruginosa*), além de uso de antibióticos por 38 vezes na vida. Outra possibilidade que poderia justificar esses valores elevados, seria uma informação equivocada dos pais em relação aos critérios de exclusão (presença de alguma doença aguda ou uso de medicações nos 15 dias que antecederam a coleta das amostras fecais).

Alguns estudos sugerem associação do tipo de parto e da dieta (aleitamento materno x fórmula infantil) com os valores de CLP (LEE et al., 2017; LI et al., 2014; LI et al., 2015). Em nosso trabalho houve uma diferença significativa entre os grupos avaliados (FC x saudáveis) em relação a essas variáveis. Desta forma, foi realizado ajuste por tipo de parto, tempo de aleitamento materno exclusivo e de aleitamento materno total para tentar reduzir os possíveis vieses a elas relacionados. Referente ao tipo de parto, notou-se uma elevada taxa de cesariana nos pacientes com fibrose cística em comparação aos saudáveis (76,67% x 38,46%, $p < 0.01$). Essa taxa foi semelhante a encontrada por De Freitas et al. (2018), que mostraram uma alta proporção de parto cesáreo na FC (73,7%) e um índice de 52,9% de partos vaginais nas crianças saudáveis. Em nosso estudo não foi demonstrada associação entre CLP e tipo de parto nas crianças com FC ($p = 0,20$).

O tempo de aleitamento materno foi significativamente menor nas crianças com FC ($p < 0,01$), provavelmente pelas intercorrências nos primeiros meses de vida, internações frequentes, baixo ganho ponderal (devido insuficiência pancreática, infecções de repetição com consequente aumento do gasto energético, inflamação intestinal e sistêmica), o que poderia ter levado à necessidade frequente de uso de fórmulas infantis e à introdução precoce da alimentação complementar. Alguns estudos sugerem diferença nos níveis de CLP nas crianças em uso de fórmula em comparação àquelas em aleitamento materno. O efeito direto da dieta (fórmula x aleitamento) nos níveis de CLP não foi avaliado em nosso estudo. Porém, ao comparar os níveis de CLP entre os grupos FC e saudáveis sem estratificação por faixa etária e sem ajuste por tipo de parto e dieta, notou-se uma diferença entre os grupos ($< 0,01$). Quando ajustado por tipo de parto e dieta, essa diferença não foi mais evidenciada ($p = 0,17$), sugerindo a importância de incluir essas variáveis na análise dos valores de CLP.

A presente pesquisa não evidenciou associação entre os valores de CLP e gênero na FC, concordando com outros estudos publicados na literatura (ELLEMUNTER et al., 2017; RUMMAN et al., 2014; WIECEK et al., 2017). Os níveis de CLP foram maiores nas crianças que apresentaram pseudo-Bartter ($p = 0,01$). Esta síndrome geralmente se manifesta em pacientes com fenótipos mais graves e alguns estudos sugerem uma tendência a maiores valores de CLP em indivíduos com esse tipo de fenótipo e com mutação $\Delta F508$ em homozigose, também associada a quadros mais graves de disfunção do CFTR (ELLEMUNTER et al., 2017; PARISI et al. 2017; RUMMAN et al., 2014; WIECEK et al. 2017).

Diferentemente da maioria dos estudos publicados em fibrose cística, o presente estudo não mostrou relação entre os valores de CLP e a insuficiência pancreática (ADRIAANSE et al., 2015; DHALIWAL et al., 2015; ELLEMUNTER et al., 2017; WIECEK et al. 2017). Garg et al. (2017) estudaram especificamente crianças menores de 10 anos e também não observaram essa relação, sugerindo que a inflamação intestinal possa estar presente nas crianças com FC independente do *status* pancreático. A associação da inflamação intestinal com função pulmonar permanece ainda controversa. Alguns autores mostram uma correlação negativa entre os valores de CLP e função pulmonar, outros já não evidenciam essa relação (ADRIAANSE et al., 2015; ELLEMUNTER et al., 2017; PARISI et al., 2017). Em nosso estudo, não foi possível avaliar função pulmonar devido à baixa idade das crianças.

Em concordância com a maioria dos trabalhos publicados também não foi evidenciada relação entre os valores de CLP e outras características clínicas relacionadas à FC, como presença de anemia hipoalbuminêmica, dose de enzima pancreática, tipo de infecção respiratória por *Pseudomonas aeruginosa*, estado nutricional, uso de inibidor de bomba de prótons, uso prévio de antibióticos e hospitalizações durante a vida (ELLEMUNTER et al., 2017; RUMMAN et al., 2014; WIECEK et al., 2017). Segundo alguns desses autores, esses achados sugerem que aspectos clínicos e demográficos não poderiam explicar o aumento de CLP em pacientes com FC. Do contrário, Parisi et al. (2017) relacionaram a CLP com vários parâmetros clínicos e sugeriram que ela deveria ser considerada não apenas marcadora de enteropatia, mas também um indicador de severidade na fibrose cística, podendo ser útil para monitorizar longitudinalmente deterioração clínica.

Os estudos vêm mostrando disbiose associada à inflamação intestinal em crianças com FC, com redução significativa de Bacteroides, Firmicutes, *Eubacterium rectale* e *Faecalibacterium prausnitzii*, e aumento de *Clostridium difficile*, *E. coli* e *P. aeruginosa* em relação às crianças saudáveis, com correlação significativa da CLP com algumas bactérias, sugerindo a presença de inflamação (DE FREITAS et al., 2018). Hoffman et al. (2014)

evidenciaram abundância relativa de *Escherichia coli* significativamente maior em lactentes com FC em Seattle – EUA, em comparação a crianças saudáveis da mesma faixa etária (29,64% x 2,67%), o que se correlacionou com os valores de calprotectina fecal e de gordura fecal.

Não está esclarecido se o aumento da abundância relativa de *E. coli* seria causa ou consequência da inflamação intestinal. A relação da abundância dessa bactéria com a presença de gordura nas fezes na FC pode ser explicada pela seleção desse grupo de bactérias, que podem metabolizar as proteínas e gorduras não absorvidas. Por outro lado, pode ser consequência de outros aspectos, como alteração da motilidade intestinal e acúmulo de muco, e a presença de gordura fecal seria apenas um dos aspectos da FC (DE LISLE; BOROWITZ, 2013). Independente do mecanismo, a alta abundância de *E. coli* pode contribuir para inflamação intestinal na FC, alteração do metabolismo e da absorção dos lipídios, piora dos sintomas gastrointestinais e consequentemente da nutrição do paciente (HOFFMAN et al., 2014).

São necessários mais estudos com amostragem maior de indivíduos, que avaliem as mudanças da microbiota intestinal de crianças com FC com a idade, determinem a abundância de *E. coli*, a presença de disbiose em relação a outras bactérias e o impacto da manipulação terapêutica da microbiota nos desfechos clínicos. A modulação da microbiota intestinal deve ter algum papel no tratamento da inflamação. Um potencial efeito de probióticos na redução da inflamação intestinal e das exacerbações pulmonares vem sendo reportado em alguns trabalhos (DEL CAMPO, et al., 2014; ELLEMUNTER et al., 2017). São necessários ensaios maiores, controlados, para avaliar o uso rotineiro de probióticos no tratamento da inflamação intestinal, investigar a eficácia de diferentes cepas e comparar o uso de cepas isoladas ou combinadas (VAN BIERVLIET; DECLERCQ; SOMERSET, 2017; VAN BIERVLIET et al., 2018; GARG et al., 2017).

Recentemente, foram desenvolvidas novas terapias que atuam nos defeitos básicos da proteína CFTR, os “corretores” e os “potencializadores”. Pouco se sabe sobre seus efeitos no trato gastrointestinal. Alguns estudos investigaram o efeito dessas terapias sobre fatores gastrointestinais de nutricionais, como peso, índice de massa corporal, pH intestinal e elastase fecal. Um estudo recente com Ivacaftor, um potencializador, evidenciou mudanças na microbiota intestinal e redução na inflamação do intestino em crianças e adultos com FC (OOI et al., 2018). A calprotectina fecal pode ser útil na avaliação dos efeitos intestinais dessas novas terapias nos pacientes com FC, especialmente em lactentes e crianças pequenas, quando as principais medidas de resposta a esses medicamentos, como função pulmonar, estão frequentemente dentro dos limites normais inicialmente (BODEWES et al., 2015; BODEWES; VERDAKE; WILSCHANSKI, 2016).

A diferença dos níveis de CLP entre os estudos pode ser influenciada pela genética, fatores ambientais, como localização geográfica ou ambos, além das diferenças nos critérios de exclusão e nos métodos de análise das amostras fecais (GARG et al. 2017; TAMBOLI; RICHARD; COLOMBEL, 2003). Isso sugere que o valor de referência fixo de 50 mg/kg ou de 100 mg/kg não é confiável como indicador de presença de inflamação intestinal em crianças de diferentes regiões geográficas, principalmente quando são utilizadas amostras fecais congeladas. Os diferentes métodos utilizados nos estudos para avaliar a CLP dificultam a comparação dos resultados. Mais pesquisas são necessárias para avaliar os exatos mecanismos envolvidos na inflamação intestinal na FC e o papel da alteração do CFTR (DHALIWAL et al., 2015). Na avaliação de pacientes pediátricos é necessário a comparação por faixas etárias, além de uso de um critério de exclusão amplo para evitar possíveis confundidores.

Este foi o segundo estudo a avaliar a CLP especificamente em crianças pequenas com FC de acordo com a faixa etária e o primeiro a investigar os fibrocísticos detectados pela triagem neonatal, abrangendo um grupo de crianças com características clínicas mais homogêneas, que tiveram diagnóstico e intervenções terapêuticas mais precoces. Nosso trabalho teve um amplo critério de exclusão para reduzir potenciais influenciadores nos valores de CLP, como doenças crônicas intestinais ou extra-intestinais, presença de exacerbação pulmonar ou outra doença aguda, uso de anti-inflamatórios, antibióticos, probióticos. Além disso, foi realizada uma análise dos dados excluindo os pacientes com FC em uso de corticoide inalatório ou nasal, mas não houve diferença nos resultados, sugerindo que essas medicações não interferiram nos níveis de CLP. Não foi dosada a calprotectina no escarro das crianças com FC, mas para tentar reduzir esse potencial viés, foi realizada a coleta das amostras em crianças clinicamente estáveis, sem sintomas de exacerbação pulmonar ou outra doença aguda. A correlação da CLP nas fezes e no escarro também não está comprovada (ADRIANSE et al., 2015). Além disso, todas as amostras foram congeladas apenas uma vez e não foram descongeladas e recongeladas em nenhum momento, foram analisadas simultaneamente utilizando a mesma técnica e os valores acima de 600 mg/kg foram repetidos.

A maior dificuldade do presente trabalho foi em relação aos critérios de exclusão. Devido à recorrência de infecções nas crianças com FC com necessidade frequente de uso de antibióticos e de internações, foram realizadas de 2 a 6 tentativas de coleta de fezes para cada criança com FC. Ele também apresenta algumas limitações. O número de pacientes envolvidos restringe a comparação de características clínicas e demográficas por mais grupos etários. Outra limitação é o fato de parte das amostras fecais terem sido coletadas das fraldas das crianças. Olafsdottir et al. (2002) relataram que este método de coleta pode aumentar a concentração de

CLP em até 30 %, devido à absorção da água das fezes pela fralda. Portanto, a coleta direta das fezes nas emissões poderia ser o mais indicado (SYKORA et al., 2010). Ainda outra restrição, é que apenas uma amostra de CLP foi obtida de cada paciente. Entretanto, este trabalho abre as possibilidades para que outros estudos, multicêntricos e prospectivos, possam avaliar se os níveis de calprotectina seriados e longitudinais teriam alguma relevância clínica e se determinadas intervenções teriam impacto nos valores desse marcador.

6.CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Houve uma tendência à redução da CLP com a progressão da idade na faixa etária pediátrica, entretanto, os níveis desse marcador nas crianças com FC foram diferentes e maiores do que os observados nas crianças saudáveis, sugerindo que possa haver alteração do ambiente intestinal desde os primeiros anos de vida nessa doença.

Estudos multicêntricos, longitudinais e com uma amostragem maior são necessários para confirmar a associação entre os níveis de calprotectina fecal e as características clínicas das crianças com FC, e para esclarecer os mecanismos envolvidos na inflamação intestinal.

Aplicabilidade clínica sugerida pelos autores

Devido à elevada variabilidade dos valores de CLP especialmente nas crianças menores de 4 anos e ausência de valores de referências confiáveis, medidas sequenciadas deveriam ser avaliadas como alternativa ao uso de valores de referência definitivos.

A principal utilidade da CLP em menores de 4 anos, seria a monitorização da variação intraindividual, permitindo avaliar progressão da doença ou resposta a intervenções terapêuticas.

Os biomarcadores podem ser utilizados para avaliar o efeito dos probióticos e de novas terapias no trato gastrointestinal.

Determinar o início da inflamação intestinal nos pacientes com FC auxiliaria na compreensão de sua etiologia, assim como no desenvolvimento de novas intervenções alvejando os possíveis mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- ABRAHAM, B. P.; KANE, S. Fecal markers: calprotectin and lactoferrin. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 41, n. 2, p. 483-95, Jun 2012.
- ADRIAANSE, M. P. et al. Evidence for a Cystic Fibrosis Enteropathy. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0138062, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26484665> >. Acesso em: 10 fev. 2019.
- ALIBRAHIM, B.; ALJASSER, M. I.; SALH, B. Fecal calprotectin use in inflammatory bowel disease and beyond: A mini-review. **Can J Gastroenterol Hepatol**, v. 29, n. 3, p. 157-63, Apr 2015.
- AMBE, P. C. et al. Calprotectin could be a potential biomarker for acute appendicitis. **J Transl Med**, v. 14, n. 1, p. 107, Apr 2016.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS; AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. **Guidelines for perinatal care**. 7th ed. Washington, DC, 2012.
- ANDERSON, R. C. et al. The role of intestinal barrier function in early life in the development of colitis. **Colitis**. 2012. Disponível em: < <https://www.intechopen.com/books/colitis/the-role-of-intestinal-barrier-function-in-early-life-in-the-development-of-colitis> > Acesso em: 10 mar. 2019.
- ANGRIMAN, I. et al. Enzymes in feces: useful markers of chronic inflammatory bowel disease. **Clin Chim Acta**, v. 381, p. 63-8, 2007.
- AVERSHINA, E. et al. Bifidobacterial succession and correlation networks in a large unselected cohort of mothers and their children. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, p. 497-507, 2013.
- BESER, Ö.F. et al. Can fecal calprotectin level be used as a marker of inflammation in the diagnosis and follow-up of cow's milk protein allergy? **Allergy Asthma Immunol**, v. 6, p. 33-38, 2014.
- BODEWES, F. A. et al. Cystic fibrosis and the role of gastrointestinal outcome measures in the new era of therapeutic CFTR modulation. **J Cyst Fibros**, v. 14, n. 2, p. 169-77, Mar 2015.
- BODEWES, F. A.; VERKADE, H. J.; WILSCHANSKI, M. Gastroenterological endpoints in drug trials for cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v. 51, n. 44, p. 18-22, Oct 2016.
- BONNIN, T.A.; VILA, V.M.; ROSELL, C.A. Fecal calprotectin as a biomarker to distinguish between organic and functional gastrointestinal disease. **Rev Esp Enferm Dig**, v. 99, p. 689-693, 2007.
- BOROWITZ, D. et al. Gastrointestinal outcomes and confounders in cystic fibrosis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 41, p. 273-285, 2005.

BRIARS, G. L. et al. Faecal interleukin-8 and tumour necrosis factor-alpha concentrations in cystic fibrosis. **Arch Dis Child**, v. 73, p. 74–6, 1995.

BRON, P. A.; VAN, B. P.; KLEEREBEZEM, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. **Nat Rev Micro**, v. 10, p. 66-78, 2012.

BRUZZESE, E. et al. Disrupted Intestinal Microbiota and Intestinal Inflammation in Children with Cystic Fibrosis and Its Restoration with Lactobacillus GG: A Randomised Clinical Trial. **PLoS ONE**, v.9, p.e87796, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586292> >. Acesso em: 10 fev. 2019.

BRUZZESE, E. et al. Effect of Lactobacillus GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study. **Clin Nutr**, v.26, p. 322-8, 2007.

BRUZZESE, E. et al. Intestinal inflammation is a frequent feature of cystic fibrosis and is reduced by probiotic administration. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 20, p. 813–819, 2004.

BUNN, S. K. et al. Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 32, p. 171–177, 2001.

CAMPEOTTO, F. et al. High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 89, p. 353-5, 2004.

CANANI, R. B. et al. Faecal calprotectin as reliable non-invasive marker to assess the severity of mucosal inflammation in children with inflammatory bowel disease. **Dig Liver Dis**, v. 40, p. 547–553, 2008.

CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? **Nat Rev Immunol**, v. 10, p. 735-44, 2010.

CHEN, C.C. et al. Fecal calprotectin as a correlative marker in clinical severity of infectious diarrhea and usefulness in evaluating bacterial or viral pathogens in children. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 55, p. 541-547, 2012.

CIPOLLI, M. et al. Pancreatic phenotype in infants with cystic fibrosis identified by mutation screening. **Arch Dis Child**, v. 92, p. 842–846, 2007.

COLOMBO, C. et al. Liver disease in cystic fibrosis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 43, p. 49-55, 2006.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. **Patient Registry 2015 Annual Data Report**. Bethesda, MD, 2016.

DAMMS, A.; BISCHOFF, S.C. Validation and clinical significance of a new calprotectin rapid test for the diagnosis of gastrointestinal diseases. **Int J Colorectal Dis**, v. 23, p. 985-992, 2008.

DE FREITAS, M. B. et al. Altered intestinal microbiota composition, antibiotic therapy and intestinal inflammation in children and adolescents with cystic fibrosis. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0198457, 2018. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29933382> >.

Acesso em: 10 fev.2019.

DE LISLE, R.C. Pass the bicarb: the importance of HCO₃⁻ for mucin release. **J Clin Invest**, v.119, p. 2535-7, 2009.

DE LISLE, R.C.; BOROWITZ, D. The cystic fibrosis intestine. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v.3, n. 9, p. a009753, 2013.

DE ONIS, M. et al. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bull World Health Organ**, v. 85, p. 660-7, 2007.

DEGRAEUWE, P.L. et al. Faecal calprotectin in suspected paediatric inflammatory bowel disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 60, p. 339–346, 2015.

DEL CAMPO, R. et al. Improvement of digestive health and reduction in proteobacterial populations in the gut microbiota of cystic fibrosis patients using a *Lactobacillus reuteri* probiotic preparation: a double blind prospective study. **J Cyst Fibros**, v. 13, n. 6, p. 716-22, Dec 2014.

DHALIWAL, J. et al. Intestinal inflammation and impact on growth in children with cystic fibrosis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.60, p. 521-6, 2015.

DIGIULIO, D. B. et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. **PloSOne**, v. 3, n. 8, p. 1-10, 2008.

DIGIULIO, D.B. Diversity of microbes in amniotic fluid. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 17, p. 2–11, 2012.

DOROSKO, S.M.; MACKENZIE, T.; CONNOR, R.I. Fecal calprotectin concentrations are higher in exclusively breastfed infants compared to those who are mixed-fed. **Breastfeed Med**, v. 3, p. 117–9, 2008.

DRAY, X. et al. Malnutrition in adults with cystic fibrosis. **Eur J Clin Nutr**, v. 59, p. 152-4, 2004.

ELLEMUNTER, H.; SCHULLER, K.; STEINKAMP, G. Faecal calprotectin concentrations in young children with cystic fibrosis. **J Cyst Fibros**, v. 17, n. 1, p. 8-9, 2018.

ELLEMUNTER, H. et al. Fecal Calprotectin in Cystic Fibrosis and Its Relation to Disease Parameters: A Longitudinal Analysis for 12 Years. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 65, n. 4, p. 438-442, Oct 2017.

EZRI, J.; NYDEGGER, A. Fecal calprotectin in children: use and interpretation. **Rev Med Suisse**, v.7, p. 69-70, 2011.

FAGERBERG, U. L. et al. Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, vol. 45, p. 414–420, 2007.

FAGERHOL, M.K. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive

myelomonocytic protein? **Clin Mol Pathol**, v. 49, p. 74-9, 1996.

FALLANI, M. et al. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1385-92, 2011.

FARRELL, P. M. et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. **J Pediatr**, v. 153, n. 2, p. 4-14, Aug 2008.

FARRELL, P.M. et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. **J Pediatr**, v. 181, p. 4-15, 2017.

FLASS, T; NARKEWICZ, M.R. Cirrhosis and other liver disease in cystic fibrosis. **J Cyst Fibros**, v. 12, p. 116-24, 2013.

GARCIA, M. A. S.; QUINTON, P. M.; YANG, N. Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. **J Clin Invest**, v. 119, p. 2613-22, 2009.

GARG, M. et al. Age-related levels of fecal M2-pyruvate kinase in children with cystic fibrosis and healthy children 0 to 10 years old. **J Cyst Fibros**, v. 17, n. 1, p. 109-113, 2018.

GARG, M. et al. Age-dependent variation of fecal calprotectin in cystic fibrosis and healthy children. **J Cyst Fibros**, v. 16, p. 631-6, 2017.

GELFOND, D. et al. Intestinal pH and gastrointestinal transit profiles in cystic fibrosis patients measured by wireless motility capsule. **Dig Dis Sci**, v. 58, p. 2275-81, 2013.

HENDERSON, P.; ANDERSON, N.H.; WILSON, D.C. The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. **Am J Gastroenterol**, v. 109, p. 637-645, 2014.

HESTVIK, E. et al. Faecal calprotectin concentrations in apparently healthy children aged 0–12 years in urban Kampala, Uganda: a community-based survey. **BMC Pediatr**, v. 11, p. 9, 2011.

HOFFMAN, L. R. et al. Escherichia coli dysbiosis correlates with gastrointestinal dysfunction in children with cystic fibrosis. **Clin Infect Dis**, v. 58, n. 3, p. 396-9, 2014.

HOLTMAN, G.A. et al. Noninvasive Tests for Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis. **Pediatrics**, v. 137, n. 1, p. e20152126, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26681783>>. Acesso 10 fev. 2019.

HOUWEN, R.H. et al. Defining DIOS and constipation in cystic fibrosis with a multicentre study on the incidence, characteristics, and treatment of DIOS. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 50, p. 38–42, 2010.

HYAMS, J. S. et al. Functional Disorders: Children and Adolescents. **Gastroenterology**, v. 16, p. 181-5, 2016.

KANIK, A. et al. Faecal calprotectin levels in children with Henoch–Schönlein purpura: is this a new marker for gastrointestinal involvement? **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 27, p. 254–258, 2015.

KAPEL, N. et al. Faecal calprotectin in term and preterm neonates. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 51, p. 542–547, 2010.

LEE, J. M. et al. Update of faecal markers of inflammation in children with cystic fibrosis. **Mediators Inflamm**, vol. 2012, p. 948367, 2012.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22988347> >. Acesso: 10 mar. 2019.

LEE, T.W. et al. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. **J Cyst Fibros**, v. 2, p. 29-34, 2003.

LEE, Y.M. et al. Delivery and feeding mode affects fecal calprotectin levels in infants <7months old. **Early Hum Dev**, v. 108, p. 45-8, 2017.

LI, F. et al. Comparison of the different kinds of feeding on the level of fecal calprotectin. **Early Hum Dev**, v. 90, p. 471-5, 2014.

LI, F. et al. Fecal calprotectin concentrations in healthy children aged 1-18 months. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p.e0119574, 2015.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25742018> >. Acesso: 10 mar. 19.

LI, L.; SOMERSET, S. The clinical significance of the gut microbiota in cystic fibrosis and the potential for dietary therapies. **Clinical Nutrition**, vol. 33, p. 571-80, 2014.

LLOYD-STILL, J. D.; BENO, D. W.; KIMURA, R. M. Cystic fibrosis colonopathy. **Curr Gastroenterol Rep**, v.1, p. 231–7, 1999.

MACFARLANE, S.; STEED, H.; MACFARLANE, G. T. Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. **Crit Rev Clin Lab Sci**, vol. 46, p. 25-54, 2009.

MANOR, O. et al. Metagenomic evidence for taxonomic dysbiosis and functional imbalance in the gastrointestinal tracts of children with cystic fibrosis. **Sci Rep**, v. 6, p. 22493, 2016.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26940651> >. Acesso em: 15 mar. 2019.

NAKASHIGE, T. G. et al. Human calprotectin is an iron-sequestering host-defense protein. **Nat Chem Biol**, v. 11, n. 10, p. 765-71, Oct 2015.

O’SULLIVAN, B. P.; FREEDMAN, S. D. Cystic fibrosis. **Lancet**, vol. 373, p. 1891-904, 2009.

OLAFSDOTTIR, E. et al. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. **Acta Paediatr**, v. 91, n. 1, p. 45-50, 2002.

OOI, C. Y. et al. Impact of CFTR modulation with Ivacaftor on Gut Microbiota and Intestinal Inflammation. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 17834, Dec 2018. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30546102> >. Acesso em: 12 jan. 2019.

OORD, T.; HORNING, N. Fecal calprotectin in healthy children. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 74, n. 3, p. 254-8, Apr 2014.

ORIVUORI, L. et al. High level of fecal calprotectin at age 2 months as a marker of intestinal inflammation predicts atopic dermatitis and asthma by age 6. **Clin Exp Allergy**, v. 45, n. 5, p. 928-39, May 2015.

OSWARI, H. et al. Comparison of stool microbiota compositions, stool alpha1-antitrypsin and calprotectin concentrations, and diarrhoeal morbidity of Indonesian infants fed breast milk or probiotic/prebiotic-supplemented formula. **J Paediatr Child Health**, v. 49, n. 12, p. 1032-9, Dec 2013.

PARISI, G. F. et al. Severe disease in Cystic Fibrosis and fecal calprotectin levels. **Immunobiology**, v. 222, n. 3, p. 582-586, Mar 2017.

PARKINS, M. D. et al. Changing epidemiology and clinical issues arising in an ageing cystic fibrosis population. **Ther Adv Respir Dis**, vol. 5, p. 105-19, 2011.

PENCHARZ, P. B.; DURIE, P. R. Pathogenesis of malnutrition in cystic fibrosis, and its treatment. **Clin Nutr**, v. 19, p. 387-94, 2000.

PERGIALIOTIS, V. et al. Calprotectin levels in necrotizing enterocolitis: a systematic review of the literature. **Inflamm Res**, v. 65, p. 1-6, 2016.

PEZZILLI, R. et al. Fecal calprotectin levels in patients with colonic polyposis. **Dig Dis Sci**, v. 53, p. 47-51, 2008.

PRAHARAJ, I. et al. Enteropathogens and Gut Inflammation in Asymptomatic Infants and Children in Different Environments in Southern India. **Am J Trop Med Hyg**, v. 98, n. 2, p. 576-580, 2018.

QUON, B. S.; AITKEN, M. L. Cystic fibrosis: what to expect now in the early adult years. **Paediatr Respir Rev**, vol. 13, p. 206-14, 2012.

ROCA, M. et al. Fecal Calprotectin and Eosinophil-derived Neurotoxin in Healthy Children Between 0 and 12 Years. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 65, n. 4, p. 394-398, Oct 2017.

ROSETH, A.G. Determination of faecal calprotectin, a novel marker of organic gastrointestinal disorders. **Dig Liver Dis**, v. 35, p. 607-9, 2003.

ROSETH, A.G. et al. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. **Scand J Gastroenterol**, v. 27, p. 793-798, 1992.

ROSTI, L. et al. Formula milk feeding does not increase the release of the inflammatory marker calprotectin, compared to human milk. **Pediatr Med Chir**, v. 33, p. 178-81, 2011.

ROYAL BROMPTON HOSPITAL PAEDIATRIC CYSTIC FIBROSIS TEAM. **Clinical guidelines for the care of children with cystic fibrosis**. 7th ed. London, UK, 2017.

RUMMAN, N. et al. Calprotectin in cystic fibrosis. **BMC Pediatr**, v. 14, p. 133, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24885444> >. Acesso em: 05 mar. 2019.

SATOKARI, R. et al. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 8, 2008.

SAVINO, F. et al. High faecal calprotectin levels in healthy, exclusively breast-fed infants. **Neonatology**, v. 97, p. 299–304, 2010.

SCHOEPFER, A. M. et al. Discriminating IBD from IBS: comparison of the test performance of fecal markers, blood leukocytes, CRP, and IBD antibodies. **Inflamm Bowel Dis**, v. 14, p. 32-39, 2008.

SEKIROV, I. Gut microbiota in health and disease. **Physiol Rev**, v. 90, p. 859 – 904, 2010.

SHARMA, R. et al. Wasting as an independent predictor of mortality in patients with cystic fibrosis. **Thorax**, v. 56, p. 746–50, 2001.

SIPPONEN, T. et al. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. **Inflamm Bowel Dis**, v. 14, p. 40-46, 2008.

SIPPONEN, T. et al. Fecal calprotectin, lactoferrin, and endoscopic disease activity in monitoring anti-TNF-alpha therapy for Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 14, p. 1392–1398, 2008.

SONG, J. Y. et al. Fecal calprotectin level in healthy children aged less than 4 years in South Korea. **J Clin Lab Anal**, v. 31, n. 6, Nov 2017. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28092115> >. Acesso em: 05 jan. 2019.

STEINKAMP, G; WIEDEMANN, B. Relationship between nutritional status and lung function in cystic fibrosis: cross sectional and longitudinal analyses from the German CF quality assurance (CFQA) project. **Thorax**, v. 57, p. 596–601, 2002.

SUMMERTON, C. B. et al. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, vol. 14, p. 841–845, 2002.

SYKORA, J. et al. Evaluation of faecal calprotectin as a valuable non-invasive marker in distinguishing gut pathogens in young children with acute gastroenteritis. **Acta Paediatr**, v. 9, p. 1389–1395, 2010.

TADDEI, C. R. et al. High abundance of Escherichia during the establishment of fecal microbiota in Brazilian children. **Microb Ecol**, v. 67, n. 3, p. 624-34, 2014.

TAMBOLI, C.P.; RICHARD, F.; COLOMBEL, J.F. Fecal calprotectin in Crohn's disease: new familyties. **Gastroenterology**, v. 124, p. 1972–1974, 2003.

TAYLOR, S.N. et al. Intestinal permeability in preterm infants by feeding type: mother's milk v

ersus formula. **Breastfeed Med**, v. 4, p. 11-5, 2009.

TIBBLE, J. et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. **Gut**, v. 47, p. 506-13, 2000.

TIBBLE, J. et al. Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from non-organic intestinal disease. **Gastroenterology**, v. 123, p. 450–60, 2002.

VAN BIERVLIET, S. et al. Probiotics in cystic fibrosis patients: A double blind crossover placebo controlled study: Pilot study from the ESPGHAN Working Group on Pancreas/CF. **Clin Nutr ESPEN**, v. 27, p. 59-65, Oct 2018.

VAN BIERVLIET, S.; DECLERCQ, D.; SOMERSET, S. Clinical effects of probiotics in cystic fibrosis patients: A systematic review. **Clin Nutr ESPEN**, v. 18, p. 37-43, Apr 2017.

VAOS, G. et al. The role of calprotectin in pediatric disease. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 542363, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24175291> >. Acesso em: 05 fev. 2019.

VERMEIRE, S.; VAN ASSCHE, G.; RUTGEERTS, P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? **Gut**, v. 55, n. 3, p. 426-31, Mar 2006.

WAGNER, C. L.; TAYLOR, S. N.; JOHNSON, D. Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 34, n. 2, p.191-204, 2008.

WALSHAM, N. E.; SHERWOOD, R. A. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. **Clin Exp Gastroenterol**, v. 9, p. 21-9, 2016.

WEISS, B. et al. Probiotic supplementation affects pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study. **Pediatr Pulmonol**, vol. 45, p. 536-40, 2010.

WERLIN, S. L. et al. Evidence of intestinal inflammation in patients with cystic fibrosis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, vol. 51, p. 304–308, 2010.

WIECEK, S. et al. The concentration of calprotectin in the stools of children with diagnosed cystic fibrosis. **Prz Gastroenterol**, v. 12, n. 1, p. 38-43, 2017.

WILSCHANSKI, M.; NOVAK, I. The cystic fibrosis of exocrine pancreas. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 5, p. a009746, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637307> >. Acesso em: 05 fev. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Anthro for personal computers, version 3.2.2, 2011: **Software for assessing growth and development of the world's children**. Geneva: WHO, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION AnthroPlus for personal computers Manual: **Software for assessing growth of the world's children and adolescents**. Geneva: WHO, 2009.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Indicators for assessing infant and young child feeding practices**. Part 1 definitions. Washington DC: World Health Organization; 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Nutrition Landscape Information System (NLIS) country profile indicators: interpretation guide**. Geneva: World Health Organization, 2010.

ZHU, Q. et al. Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0150725, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26950440> >. Acesso em 05 fev. 2019.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes

Introdução

Prezados pais ou responsáveis, o seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo denominado **“Inflamação intestinal em crianças com fibrose cística”**.

A fibrose cística é uma doença herdada dos pais, que faz com que o corpo produza um líquido muito espesso e pegajoso, conhecido como muco, que se acumula nas passagens respiratórias dos pulmões, intestino e outras áreas do corpo. O acúmulo desse muco leva à infecções respiratórias e a problemas digestivos. Os principais sintomas dessa doença são: pneumonia de repetição, tosse crônica, dificuldade de ganhar peso e altura, diarreia, desidratação sem motivo aparente, suor mais salgado que o normal, diabetes e doença no fígado.

Como será feito o estudo?

Será realizada uma análise das fezes do seu filho(a) para avaliar se o intestino dele(a) está inflamado. Para isso, o(a) senhor(a) deverá trazer uma amostra de fezes de seu filho(a) colhida no dia da entrega. Além disso, serão feitas várias perguntas sobre a saúde e os hábitos de seu filho(a) e as respostas serão anotadas para podermos analisar depois.

Existem riscos para os participantes do estudo?

Em nenhum momento durante a realização do estudo, ou durante a divulgação dos resultados, a identidade de seu filho(a) será revelada. Todas as informações fornecidas serão confidenciais e o seu filho(a) será identificado apenas por um código de letras e números. Somente os investigadores terão acesso a esses dados, que serão mantidos de forma estritamente confidencial, garantindo o sigilo e privacidade do seu filho.

Quais os benefícios do estudo?

O benefício desta pesquisa é contribuir para o conhecimento da presença de inflamação intestinal nos pacientes com fibrose cística e avaliar a relação da inflamação intestinal com algumas características clínicas, como infecção pulmonar, diarreia, uso de enzima pancreática, internações, entre outras, em comparação com crianças saudáveis. Não haverá benefício direto ao participante.

O seu filho(a) é obrigado a participar do estudo?

O(a) senhor(a) tem o direito de não querer que seu filho(a) participe deste estudo e mesmo que decida participar, pode retirá-lo(a) do estudo em qualquer momento que desejar, o que não prejudicará o atendimento dele(a) no serviço.

Ressarcimento de despesas

Haverá ressarcimento no valor de R\$ 25,00 (vinte e cinco reais) referente aos gastos com alimentação e transporte.

Informações adicionais

Os resultados deste estudo serão divulgados independente dos resultados. A qualquer momento o(a) senhor(a) poderá solicitar esclarecimentos adicionais sobre a participação de seu filho(a) no estudo. Em caso de dúvidas, durante ou após a participação no estudo, você ou qualquer membro de sua família poderá entrar em contato com os responsáveis pelo estudo, pessoalmente, por e-mail ou por telefone, conforme abaixo.

Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas, para fazer perguntas, sugestões ou denúncias relacionadas a este estudo, pelo telefone **16-3602-2228**.

Responsáveis pela pesquisa:

- Dra Regina Sawamura – Professora Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP - sawamura@fmrp.usp.br

- Dra Ieda Lopes Del Ciampo - Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP - irciampo@gmail.com

- Dra Robertta Kelly Marques Ferreira – Pós-graduanda do programa Saúde Criança e Adolescente da FMRP-USP - roberttakmf@hotmail.com ; telefone: (16) 99713-6236.

Universidade de São Paulo - Hospital de Clínicas - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP – Departamento de Pediatria

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre. CEP: 14049-900 Ribeirão Preto/SP.

Telefone: (16) 3602- 2672

Autorização para inclusão no estudo

Eu, _____, após ler este documento pessoalmente, e receber todas as informações necessárias e ter minhas dúvidas esclarecidas, e tendo conhecimento de todos os meus direitos, autorizo voluntariamente a inclusão do meu filho (a) no estudo **“Inflamação intestinal em crianças com fibrose cística”**.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Responsável:

Assinatura responsável:

Pesquisador:

Assinatura pesquisador:

APÊNDICE B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - População saudável

Introdução

Prezados pais ou responsáveis, o seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo denominado **“Inflamação intestinal em crianças com fibrose cística”**.

A fibrose cística é uma doença herdada dos pais, que faz com que o corpo produza um líquido muito espesso e pegajoso, conhecido como muco, que se acumula nas passagens respiratórias dos pulmões, intestino e outras áreas do corpo. O acúmulo desse muco leva à infecções respiratórias e a problemas digestivos. Os principais sintomas dessa doença são: pneumonia de repetição, tosse crônica, dificuldade de ganhar peso e altura, diarreia, desidratação sem motivo aparente, suor mais salgado que o normal, diabetes e doença no fígado.

Como será feito o estudo?

Seu filho foi convidado por não ter nenhuma doença e constituirá o grupo controle do estudo como representante da população normal. Será realizada uma análise das fezes do seu filho(a) para avaliar se o intestino dele(a) está inflamado. Para isso, o(a) senhor(a) deverá trazer uma amostra de fezes de seu filho(a) colhida no dia da entrega. Além disso, serão feitas várias perguntas sobre a saúde e os hábitos de seu filho(a) e as respostas serão anotadas para podermos analisar depois.

Existem riscos para os participantes do estudo?

Em nenhum momento durante a realização do estudo, ou durante a divulgação dos resultados do estudo, a identidade de seu filho(a) será revelada. Todas as informações fornecidas serão confidenciais e o seu filho(a) será identificado apenas por um código de letras e números. Somente os investigadores terão acesso a esses dados, que serão mantidos de forma estritamente confidencial, garantindo o sigilo e privacidade do seu filho.

Quais os benefícios do estudo?

O benefício desta pesquisa é contribuir para o conhecimento da presença de inflamação intestinal nos pacientes com fibrose cística, em comparação com crianças saudáveis. Não haverá benefício direto ao participante.

O seu filho(a) é obrigado a participar do estudo?

O(a) senhor(a) tem o direito de não querer que seu filho(a) participe deste estudo e mesmo que decida participar, pode retirá-lo(a) do estudo em qualquer momento que desejar, o que não prejudicará o atendimento dele(a) e nem ocasionará qualquer penalidade.

Ressarcimento de despesas

Haverá ressarcimento no valor de R\$ 25,00 (vinte e cinco reais) referente aos gastos com alimentação e transporte.

Informações adicionais

Os resultados deste estudo serão divulgados independente dos resultados. A qualquer momento o(a) senhor(a) poderá solicitar esclarecimentos adicionais sobre a participação de seu filho(a) no estudo. Em caso de dúvidas, durante ou após a participação no estudo, você ou qualquer membro de sua família poderá entrar em contato com os responsáveis pelo estudo, pessoalmente, por e-mail ou por telefone, conforme abaixo.

Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas, para fazer perguntas, sugestões ou denúncias relacionadas a este estudo, pelo telefone 16-3602-2228.

Responsáveis pela pesquisa:

- Dra Regina Sawamura – Professora Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP - sawamura@fmrp.usp.br

- Dra Ieda Lopes Del Ciampo - Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP - irciampo@gmail.com

- Dra Robertta Kelly Marques Ferreira – Pós-graduanda do programa Saúde Criança e Adolescente da FMRP-USP - roberttakmf@hotmail.com ; telefone: (16) 99713-6236.

Universidade de São Paulo - Hospital de Clínicas - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP – Departamento de Pediatria

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre. CEP: 14049-900 Ribeirão Preto/SP.

Telefone: (16) 3602- 2672

Autorização para inclusão no estudo

Eu, _____, após ler este documento pessoalmente, e receber todas as informações necessárias e ter minhas dúvidas esclarecidas, e tendo conhecimento de todos os meus direitos, autorizo voluntariamente a inclusão do meu filho (a) no estudo **“Inflamação intestinal em crianças com fibrose cística”**.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Responsável:

Assinatura responsável:

Pesquisador:

Assinatura pesquisador:

APÊNDICE C: Termo de Consentimento para Guarda de Material Biológico

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Puericultura e Pediatria

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Responsável pelo biorrepositório referente ao projeto de pesquisa intitulado **“Inflamação intestinal em crianças com fibrose cística”**: Profa. Dra. Regina Sawamura. O biorrepositório será criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto com o objetivo de guardar amostras de fezes do seu (sua) filho (a), para analisar, durante o período do projeto de pesquisa, a presença de inflamação no intestino dele (a).

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a autorizar a guarda de amostras de fezes de seu (sua) filho (a) para fins de pesquisa e análises científicas vinculadas ao projeto de pesquisa denominado acima. Sua participação é voluntária, desse modo, tem a liberdade de aceitar ou não que amostra de seu (sua) filho (a) seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhes for prestado. O (A) senhor (a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

As amostras de fezes serão coletadas pelo (a) senhor (a) ou por outro responsável, em seu domicílio, serão colocadas em um coletor estéril (quantidade máxima de 70 ml) e serão trazidas ao hospital. Posteriormente, serão armazenadas no Laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. A coleta e o transporte das fezes de seu (sua) filho (a) pode lhe causar algum desconforto, para isso serão fornecidas luvas descartáveis, espátula estéril e caixa térmica para armazenamento das fezes.

A equipe de pesquisa se compromete a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garantam o sigilo e a confidencialidade dos doadores, para isso as amostras serão identificadas por números.

O (A) senhor (a) deve fornecer todos os dados para que possa ser localizado pelos pesquisadores. Tem o direito de solicitar as informações de seu interesse relacionadas à pesquisa.

Solicitamos sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de que a amostra de material biológico do seu (sua) filho (a) seja armazenada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada será entregue ao (à) senhor (a).

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente. Para esclarecimentos de questões éticas, o(a) senhor(a) também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, que aprovou este biorrepositório, pelo telefone (16) 3602-2228.

Nome do responsável pelo paciente

(Assinatura do responsável pelo paciente) _____ dia / ____ mês / ____ ano

Local:

Endereço:

Telephone:

Nome do Pesquisador

(Assinatura do Pesquisador)

_____/_____/_____
dia mês ano

Local:

Responsáveis pela pesquisa:

- Dra Regina Sawamura – Professora Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP - sawamura@fmrp.usp.br
- Dra Ieda Lopes Del Ciampo - Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP - irciampo@gmail.com
- Dra Robertta Kelly Marques Ferreira – Pós-graduanda do programa Saúde da Criança e do Adolescente da FMRP-USP - roberttakmf@hotmail.com ; telefone: (16) 99713-6236.
- Universidade de São Paulo - Hospital de Clínicas - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP – Departamento de Pediatria
- Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre. CEP: 14049-900 Ribeirão Preto/SP.
- Telefone: (16) 3602- 2672

APÊNDICE D - Valores de calprotectina expressos em Log10, de acordo com a faixa etária.

Grupo	Idade	n	Média	DP	Mín.	Q1	Mediana	Q3	Máx.
FC	≤4anos	16	2,77	0,57	1,29	2,47	2,69	3,28	3,54
	>4 anos	14	2,19	0,40	1,67	1,79	2,22	2,39	2,99
GS	≤4anos	22	2,25	0,53	1,30	1,78	2,31	2,62	3,15
	>4 anos	17	1,94	0,43	1,29	1,56	1,93	2,18	2,69

FC: pacientes com fibrose cística; GS: grupo dos saudáveis.

APÊNDICE E - Valores de calprotectina fecal de acordo com as características clínicas das crianças com fibrose cística.

		n	Méd.	DP	Mín.	Q1	MED	Q3	Máx.
Anemia hipoalb	S	11	926,49	973,51	87,82	265,76	475,78	1565,47	3435,86
	N	18	371,89	794,87	19,50	52,65	293,08	239,77	2719,37
Pseudo-Bartter	S	13	1082,11	1035,35	181,10	355,16	521,83	1565,47	3435,86
	N	15	471,38	786,50	19,50	57,41	196,69	368,32	2719,37
IP	S	24	689,72	849,31	19,50	188,90	327,61	748,23	3435,86
	N	6	612,16	1050,11	47,08	53,19	153,83	545,64	2719,37
Estado nutricional	D	7	922,25	1299,51	19,50	53,19	416,24	1967,36	3435,86
	E	21	628,60	748,94	47,08	181,10	265,76	545,64	2719,37
Infec. Pa	C/I	17	515,45	863,38	19,50	117,01	234,96	475,78	3435,86
	L/Nu	13	881,81	876,43	47,08	246,02	471,70	1565,47	2719,37
IBP	S	6	974,70	1333,26	19,50	53,19	387,08	1565,47	3435,86
	N	24	599,09	739,21	47,08	161,24	283,21	521,83	2719,37

Anemia hipoalb: anemia hipoalbuminêmica; C: infecção crônica; D: desnutrição; E: eutrofia; Estado nutricional: estado nutricional; I: infecção intermitente; IBP: uso de inibidor de bomba de prótons; IP: insuficiência pancreática; L: livre de infecção; N: não; Nu: nunca infectado; Infec. Pa: infecção respiratória por *Pseudomonas aeruginosa*; S: sim.

APÊNDICE F - Valores de calprotectina fecal (em log10) de acordo com as características clínicas das crianças com FC.

		n	Méd.	DP	Mín.	Q1	MED	Q3	Máx.
Anemia	S	11	2,71	0,50	1,94	2,37	2,68	3,19	3,54
hipoalbuminêmica	N	18	2,33	0,55	1,29	1,79	2,38	2,67	3,43
Pseudo-Bartter	S	13	2,75	0,39	2,26	2,42	2,68	2,99	3,54
	N	15	2,26	0,60	1,29	1,73	2,29	2,62	3,43
Insuficiência pancreática	S	24	2,55	0,53	1,29	2,28	2,52	2,85	3,54
	N	6	2,29	0,70	1,67	1,73	2,09	2,74	3,43
Estado nutricional	D	7	2,44	0,83	1,29	1,73	2,62	3,29	3,54
	E	21	2,52	0,51	1,67	2,26	2,42	2,74	3,43
Infecção por Pa	C/I	17	2,36	0,55	1,29	2,07	2,37	2,68	3,54
	L/Nu	13	2,68	0,56	1,67	2,39	2,67	3,19	3,43
Uso de IBP	S	6	2,48	0,86	1,29	1,73	2,57	3,19	3,54
	N	24	2,51	0,50	1,67	2,20	2,45	2,72	3,43

C: infecção crônica; D: desnutrição; E: eutrofia; I: infecção intermitente; IBP: inibidor de bomba de prótons; IP: insuficiência pancreática; L: livre de infecção; N: não; Nu: nunca infectado; Pa: Pseudomonas aeruginosa; S: sim.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Humana

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 21 de março de 2017

Ofício nº 816/2017
CEP/MGV

CÓPIA

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“INFLAMAÇÃO INTESTINAL EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 446ª Reunião Ordinária, realizada em 20/03/2017 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Biorrepositório, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Termo de Guarda de Material Biológico, de acordo com o Processo HCRP nº 2649/2017.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
ROBERTA KELLY MARQUES FERREIRA
PROFª.DRª. REGINA SAWAMURA(Orientadora)
Depto. de Puericultura e Pediatria

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br