

Maiara Brusco de Freitas

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SIMBIÓTICO SOBRE A  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE CRIANÇAS E  
ADOLESCENTES COM FIBROSE CÍSTICA**

Florianópolis

2017



Maiara Brusco de Freitas

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SIMBIÓTICO SOBRE A  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE CRIANÇAS E  
ADOLESCENTES COM FIBROSE CÍSTICA**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Emilia Addison Machado Moreira.

Florianópolis  
2017

## Maiara Brusco de Freitas

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

de Freitas, Maiara Brusco  
Efeito da suplementação com simbiótico sobre a  
resposta inflamatória de crianças e adolescentes com  
fibrose cística / Maiara Brusco de Freitas ;  
orientadora, Emilia Addison Machado Moreira, 2018.  
191 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de  
Pós-Graduação em Nutrição, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Nutrição. 2. Fibrose cística. 3. Simbióticos. 4.  
Inflamação. 5. Microbiota intestinal. I. Machado  
Moreira, Emilia Addison . II. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição. III. Título.

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SIMBIÓTICO SOBRE A  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
COM FIBROSE CÍSTICA**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de “Doutora”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Florianópolis, 18 de dezembro de 2017.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Patrícia Faria Di Pietro  
**Coordenadora do Curso**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Emília Addison Machado Moreira  
**Orientadora e Presidente da banca**

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sandra Soares Melo  
Universidade do Vale do Itajaí

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Amanda Bagolin do Nascimento  
Universidade do Sul de Santa Catarina

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mariangela Pimentel Pincelli  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Debora Kurrle Rieger Venske  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Patricia De Fragas Hinnig  
Universidade Federal de Santa Catarina



Dedico esta dissertação aos meus pais Pedro e Maria, que são exemplos de vida, profissionais corretos e competentes e sempre me apoiaram em minhas decisões. Obrigada por todo o apoio, carinho, compreensão e por ser fonte de inspiração. Amo vocês.





## AGRADECIMENTOS

### **Agradeço**

À **Deus**, por me dar perseverança e força para lutar.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Nutrição**, por proporcionar um ensino de qualidade em nutrição.

Ao **UNIEDU Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina**, pela concessão de uma bolsa de estudo, permitindo que houvesse dedicação exclusiva ao doutorado.

À minha orientadora, Prof<sup>ra</sup>. **Dra. Emília Addison Machado Moreira**, o meu agradecimento pelas contribuições, pelo crescimento, pela atenção e seus valiosos conhecimentos transmitidos e dedicados a mim durante todo este período. Agradeço a oportunidade de ser sua orientanda durante o mestrado e o doutorado.

À professora **Dra. Yara Maria Franco Moreno** pelos constantes ensinamentos que ajudaram na construção deste trabalho.

Aos professores **Dr. Alfredo Guarino e Dra. Vittoria Buccigrossi** pelo acolhimento durante a realização do doutorado sanduíche assim como pelas valiosas contribuições.

Ao **Hospital Infantil Joana de Gusmão e a diretoria** do mesmo pelo acolhimento e apoio na realização da pesquisa.

À **Associação Catarinense de Assistência ao Mucoviscidótico** em especial a **assistente social Maryhana Morais** pela cooperação e auxílio na realização do estudo.

À **equipe de profissionais da saúde pertencentes ao grupo de atendimento dos pacientes com fibrose cística** em especial ao **Dr. Norberto Ludwig Neto**, a **nutricionista Eliana Barbosa**, a **Dra. Vanessa Platt** e a **técnica de enfermagem Marta Winck** por todo apoio e auxílio na realização do estudo.

Aos **pacientes** pela paciência e comprometimento com o estudo.

As minhas colegas de grupo **Diane Oliveira**, Camila Tomio, **Suellen Guesser**, **Alice Freitas da Silva** e **Gabriela Cristofoli Barni** pelo auxílio no estudo e companheirismo.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação**, pelos constantes ensinamentos que me fizeram crescer.

À minha **turma de doutorado**, pelos momentos que passamos juntos, de ajuda e de descontração em nossos encontros.

Aos meus pais, **Pedro Ferreira de Freitas** e **Maria Justina Brusco de Freitas**, pelo apoio incondicional, incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao meu irmão, **Mateus Brusco de Freitas**, minha cunhada **Adrielle** e meu sobrinho **João Pedro**, pelo apoio e carinho dado.

À minha tia, **Lídia Marina Brusco**, por todo apoio e incentivo dado.

Ao meu namorado **João Paulo Ristow** pelo companheirismo, apoio, motivação, compreensão e parceria nos inúmeros finais de semana em que passamos trabalhando.

Aos meus sogros **Vania Ristow** e **Mario Ristow** por todo apoio, pelas orações e todo carinho dado.

À minha amiga **Vivian Francielle França** pela amizade, parceria nas viagens e momentos incríveis compartilhados.

Às minhas amigas, **Mayara Gomes**, **Taimara Carla Bernardi** e **Aline Thaísa Bortolozzo**, que mesmo a distância me apoiaram e confortaram.

Às pessoas incríveis que conheci na Itália, **Antonella** e seus familiares, **Noemi**, **Dajana**, **Andrea**, **Deniz**, **Raluca**, **Fabiola** e tantos outros que me acolheram e tornaram esse período tão agradável.

A todos, que me ajudaram durante o doutorado.

**Muito Obrigada!**

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King



## RESUMO

**Introdução:** A fibrose cística (FC) é caracterizada pelas infecções persistentes das vias respiratórias e a ativação excessiva de processos imunes. A ingestão de simbióticos pode ser benéfica para pacientes com FC por estar relacionado com a modulação da microbiota intestinal, redução da exacerbação pulmonar e atenuação da inflamação. **Objetivo:** Avaliar o efeito da suplementação com simbiótico nos marcadores da resposta inflamatória sistêmica e a composição da microbiota intestinal de crianças e adolescentes com FC. **Metodologia:** ETAPA 1 - Ensaio clínico, randomizado, duplo-cego, suplementado e controlado por placebo 90 dias. As 72 crianças/adolescentes foram distribuídas em grupo controle (GC, n = 17, idade:  $5,88 \pm 3,80$  anos), grupo placebo (maltodextrina) FC (GPFC, n = 19, idade:  $10,74 \pm 2,54$  anos) e o grupo simbiótico [frutooligossacarídeo, *Lactobacillus (L.) paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium (B.) lactis*] FC (GSFC, n = 22, idade:  $9,59 \pm 2,79$  anos). Avaliou-se: Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>), estado nutricional e a resposta inflamatória [interleucina (IL) 12, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , mieloperoxidase (MPO), proteína-C reativa (PCR) e metabólitos do óxido nítrico (NOx)]. O modelo linear generalizado com interação entre suplemento-simbiótico e tempo (final-basal) foi ajustado para sexo e idade. ETAPA 2 - Estudo clínico transversal. Amostra com 36 crianças, de 0 a  $\leq 15$  anos, de ambos os sexos, foi distribuída em dois grupos: GFC (n = 19) e GC (n = 17) que frequentavam o ambulatório de puericultura. O estado nutricional foi avaliado pelo índice de massa corporal para idade (IMC/I) e estatura para idade (E/I) e a inflamação intestinal foi avaliada pela dosagem de calprotectina fecal. A quantificação dos microrganismos *Bacteróides*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *L. paracasei*, *Escherichia (E.) coli*, *Clostridium (C.) difficile*, Firmicutes, *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, *Eubacterium (E.) rectale* e *Faecalibacterium (F.) prausnitzii* foi realizada por meio da técnica de hibridização fluorescente *in situ*. **Resultados:** ETAPA 1 - A PCR e os NOx foram significativamente maiores nos GPFC e GSFC (ambos  $p < 0,001$ ) quando comparados ao GC. No GSFC o NOx diminuiu significativamente ( $p = 0,030$ ). No GSFC categorizado em bacteriologia positiva, foi observada diminuição nas concentrações das citocinas IL-6 ( $p = 0,033$ ) e IL-8 ( $p = 0,009$ ). ETAPA 2 - Houve diferença significativa entre os grupos FC e GC para a calprotectina fecal ( $p = 0,040$ ). Os microrganismos *Bacteróides*, *F. prausnitzii*, Firmicutes e *E. rectale* encontram-se diminuídos no GFC em relação ao GC ( $p = 0,034$ ;  $p = 0,035$ ;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,002$ ,

respectivamente). Enquanto que os microrganismos *C. difficile*, *P. aeruginosa* e *E. coli* encontram-se aumentados significativamente no GFC ( $p = 0,024$ ;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,007$ , respectivamente). **Conclusão:** A suplementação com o simbiótico se mostrou efetiva na diminuição dos marcadores pró-inflamatórios IL-6, IL-8 e NOx em crianças/adolescentes com FC. A diminuição de importantes grupos funcionais de bactérias como *Bacteróides*, *F. prausnitzii*, Firmicutes e *E. rectale* e consequente aumento das bactérias *C. difficile*, *P. aeruginosa* e *E. coli* pode ter importante efeito sobre a ecologia intestinal e metabolismo celular.

**Palavras chaves:** Fibrose cística, simbióticos, inflamação, estado nutricional, microbiota intestinal.

## ABSTRACT

**Background:** Cystic fibrosis (CF) is characterized by persistent infections of the airways and excessive activation of immune processes. Ingestion of synbiotics may be beneficial for CF patients because it is related to intestinal microbiota modulation, reduction of pulmonary exacerbation and attenuation of inflammation. **Objective:** Evaluate the effect of symbiotic supplementation on systemic inflammatory response markers and intestinal microbiota composition of children and adolescents with CF. **Methods:** STEP 1 - Clinical, randomized, double-blind, placebo-controlled, 90-day trial. The 72 children/adolescents were distributed in the control group (CG, n = 17, age:  $8.55 \pm 3.03$  years), placebo group (maltodextrin) CF (PCFG, n = 19, age:  $10.74 \pm 2.54$ ) and the synbiotic group (fructooligosaccharide, *Lactobacillus (L.) paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium (B.) lactis*] FC (SCFG, n = 22, age:  $9.59 \pm 2.79$  years). Forced Expiratory Volume in the first second (FEV<sub>1</sub>), nutritional status and inflammatory response (interleukin (IL) 12, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , myeloperoxidase (MPO), C-protein reactive (PCR) and nitric oxide (NO<sub>x</sub>) metabolites]. The generalized linear model with interaction between synbiotic supplement and time (final-basal) was adjusted for sex and age. STEP 2 - Cross-sectional study. A sample of 36 children, aged 0 to  $\leq 15$  years, of both sexes, was divided into two groups: CFG (n = 19) and CG (n = 17) attending the child care outpatient clinic. Nutritional status was assessed by body mass index for age (BMI/I) and height for age (E/I), and intestinal inflammation was assessed by fecal calprotectin. The quantification of the microorganisms *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *L. paracasei*, *Escherichia (E.) coli*, *Clostridium (C.) difficile*, Firmicutes, *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, *Eubacterium (E.) rectale* and *Faecalibacterium (F.) prausnitzii* was performed by fluorescence *in situ* hybridization technique. **Results:** STEP 1 - PCR and NO<sub>x</sub> were significantly higher in PCFG and SCFG (both p < 0.001) compared to the CG. In the SCFG the NO<sub>x</sub> decreased significantly (p = 0.030). In SCFG categorized as positive bacteriology, a decrease in IL-6 cytokine concentrations (p = 0.033) and IL-8 (p = 0.009) was observed. STEP 2 - The significant difference between CF and CG for fecal calprotectin (p = 0.040). The microorganisms *Bacteroides*, *F. prausnitzii*, Firmicutes and *E. rectale* were found to be decreased in CFG compared to CG (p = 0.034, p = 0.035, p < 0.001, p = 0.002, respectively). While the microorganisms *C. difficile*, *P. aeruginosa* and *E. coli* are significantly increased in the CFG (p = 0.024, p < 0.001, p =

0.007, respectively). **Conclusion:** Synbiotic supplementation was shown to be effective in reducing the proinflammatory markers IL-6, IL-8 and NO<sub>x</sub> in children/adolescents with CF. The decrease of important functional groups of bacteria such as *Bacteroides*, *F. prausnitzii*, Firmicutes and *E. rectale* and consequent increase of the bacteria *C. difficile*, *P. aeruginosa* and *E. coli* can have important effect on the intestinal ecology and cellular metabolism.

**Keywords:** Cystic fibrosis, synbiotics, inflammation, nutritional status, intestinal microbiota.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição dos gêneros mais abundantes da microbiota intestinal de crianças com fibrose cística.....	39
Figura 2 – Seleção e randomização do grupo controle (GC), do grupo placebo fibrose cística (GPFC) e do grupo simbiótico fibrose cística (GSFC). .....	69
Figura 3 – Correlação entre o índice de massa corporal, a calprotectina fecal e os microrganismos intestinais.....	96
Figura 4 – Comparação entre antibioticoterapia e microrganismos intestinais..	97
Figura 5 – Microbiota intestinal de um paciente com FC colonizado por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( $\times 10^9$ /mL de fezes).....	103



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das mutações do gene do Canal Regulador de Condutância Transmembrana de Fibrose Cística (CFTR) .....	34
Quadro 2 – Estudos de revisões sistemáticas com meta-análise que abordam a suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico em diversas doenças .....	58
Quadro 3 – Estudos que avaliam a suplementação com prebiótico, probiótico ou simbiótico em pacientes com FC.....	60
Quadro 4 - Estudos que avaliam a suplementação com prebiótico, probiótico ou simbiótico em pacientes com FC.....	61
Quadro 5 – Equações para o cálculo da Densidade Corporal e Percentual de Gordura Corporal.....	75



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização do suplemento simbiótico. ....	71
Tabela 2 – Dados de identificação e marcadores clínicos, nutricionais e inflamatórios séricos do grupo controle (GC), grupo fibrose cística (GFC): Grupo placebo FC e Grupo simbiótico FC (Continua). ....	86
Tabela 3 – Função pulmonar, estado nutricional e marcadores inflamatórios séricos em pacientes com fibrose cística suplementados com placebo ou simbiótico.....	89
Tabela 4 – Função pulmonar, estado nutricional e marcadores inflamatórios séricos em pacientes com fibrose cística suplementados com placebo (Grupo placebo FC) de acordo com a ausência ou presença de microrganismos patogênicos.....	90
Tabela 5 – Função pulmonar, estado nutricional e marcadores inflamatórios séricos em pacientes com fibrose cística suplementados com simbiótico (Grupo simbiótico FC) de acordo com a ausência ou presença de microrganismos patogênicos.....	91
Tabela 6 – Dados de identificação e marcadores clínicos dos grupos controle e fibrose cística. ....	93
Tabela 7 – Inflamação intestinal e microbiota intestinal dos grupos controle e fibrose cística. ....	94
Tabela 8 – Taxa minimamente aceitável de ganho de peso diário (g/dia) e altura anual (cm/ano), de acordo com sexo e idade.....	170



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGB	Área gordurosa do braço
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AP-1	Proteína de ativação-1 (do inglês: <i>activator protein-1</i> )
AMB	Área muscular do braço
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês: <i>Adenosine Cyclic Monophosphate</i> )
CB	Circunferência do braço
CFTR	Canal regulador de condutância transmembrana de fibrose cística (do inglês: <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> )
CMB	Circunferência muscular do braço
CVF	Capacidade vital forçada
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano (do inglês: <i>damage associated molecular patterns</i> )
DCB	Dobra cutânea bicipital
DCT	Dobra cutânea tricípital
DCSE	Dobra cutânea subescapular
DCSI	Dobra cutânea suprailíaca
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
E/I	Estatura-para-idade
Escore S-K	Escore de Shwachman-Kulczycki
FC	Fibrose Cística
FOS	Frutooligossacarídeo
GC	Gordura corporal

%GC	Percentual de gordura corporal
GOS	Galacto-oligosacarídeos
hβD2	Beta defensina humana 2
ICAM-1	Molécula de adesão celular-1 (do inglês: <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i> )
IFN-γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IKkB	Quinase inibidora do fator nuclear kB (do inglês: <i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i> )
IL-1β	Interleucina-1 beta
IMC/I	Índice de massa corporal-para-idade
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida (do inglês: <i>Inducible nitric oxide synthase</i> )
IRAK	Interleucina-1 associada ao receptor quinase (do inglês: <i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i> )
MAP	Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês: <i>Mitogen activated protein kinases</i> )
MyD88	Fator 88 de Diferenciação Mieloide [do inglês: <i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i> ]
NF-kB	Fator nuclear kB
NOS	Óxido nítrico sintase (do inglês: <i>Nitric oxide synthase</i> )
P/I	Peso-para-idade
PMAPs	Padrões moleculares associados aos patógenos (do inglês: <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> )
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão (do inglês: <i>Pattern recognition receptors</i> )
PSA	Polissacarídeo A



RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro (do inglês: <i>Ribonucleic acid messenger</i> )
RTEEI	Relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior
SBID	Supercrescimento bacteriano no intestino delgado
SOID	Síndrome da obstrução intestinal distal
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento-beta (do inglês: <i>Transforming growth factor-beta</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
TLR	Receptores semelhantes a <i>Toll</i> (do inglês: <i>Toll-like receptor</i> )
TRAF-6	Fator-6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (do inglês: <i>TNF receptor-associated factor-6</i> )
VEF <sub>1</sub>	Volume expiratório forçado no primeiro segundo



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>27</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>31</b>
2.1 FIBROSE CÍSTICA E A FUNÇÃO PULMONAR E GASTROINTESTINAL	31
2.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA FIBROSE CÍSTICA E SUA RELAÇÃO COM O ESTADO NUTRICIONAL	44
2.3 SIMBIÓTICO (PREBIÓTICO – PROBIÓTICO)	51
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>62</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	63
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
<b>4 JUSTIFICATIVA, RELEVÂNCIA, ORIGINALIDADE E CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO</b>	<b>65</b>
<b>5 MÉTODOS</b>	<b>67</b>
5.1 ETAPAS DA PESQUISA	67
<b>5.1.1 ETAPA 1: Avaliação da suplementação com simbiótico sobre os marcadores da resposta inflamatória</b>	<b>67</b>
<b>5.1.2 ETAPA 2: Composição da microbiota intestinal e inflamação intestinal</b>	<b>79</b>
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>85</b>
6.1 ETAPA 1: AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SIMBIÓTICO	85
<b>6.1.1 Caracterização da amostra</b>	<b>85</b>
<b>6.1.2 Efeito do simbiótico sobre os marcadores da função pulmonar e do estado nutricional</b>	<b>88</b>
<b>6.1.3 Efeito do simbiótico sobre os marcadores inflamatórios</b>	<b>88</b>
6.2 ETAPA 2: COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E INFLAMAÇÃO INTESTINAL	92

<b>6.2.1 Marcadores demográficos, clínicos, inflamação intestinal e microbiota intestinal</b>	<b>92</b>
<b>6.2.2 Avaliação do tipo de alimentação, tipo de parto, calprotectina fecal e microrganismos intestinais</b>	<b>95</b>
<b>6.2.3 Avaliação do índice de massa corporal, calprotectina fecal, microrganismos intestinais e antibioticoterapia</b>	<b>95</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>99</b>
7.1 ETAPA 1: AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SIMBIÓTICO	99
7.2 ETAPA 2: COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E INFLAMAÇÃO INTESTINAL	102
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>107</b>
<b>9 CONCLUSÕES</b>	<b>109</b>
<b>REFERÊNCIA</b>	<b>111</b>
<b>APÊNDICE A</b>	<b>145</b>
<b>APÊNDICE B</b>	<b>147</b>
<b>APÊNDICE C</b>	<b>149</b>
<b>APÊNDICE D</b>	<b>151</b>
<b>APÊNDICE E</b>	<b>153</b>
<b>APÊNDICE F</b>	<b>155</b>
<b>APÊNDICE G</b>	<b>157</b>
<b>APÊNDICE H</b>	<b>163</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>165</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>167</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>169</b>
<b>ANEXO C</b>	<b>177</b>
<b>ANEXO D</b>	<b>182</b>
<b>ANEXO E</b>	<b>188</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A progressiva e irreversível lesão pulmonar causada pela recorrente e crônica infecção e inflamação é a maior causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes com fibrose cística (FC), o que o torna um fator central na progressão da doença (SAGEL e ACCURSO, 2002; SAGEL *et al.*, 2007; CORVOL *et al.*, 2008). Os protocolos clínicos consideram, dentre as principais bactérias patogênicas para a FC, a *Pseudomonas (P.) aeruginosa* como sendo a mais agressiva (GRASSME *et al.*, 2010; ATHANAZIO *et al.*, 2017).

Uma das características da inflamação das vias aéreas na FC é a predominância de neutrófilos em fluxo contínuo resultando em acúmulo (CONESE *et al.*, 2003; DOWNEY *et al.*, 2009; KIENINGER e REGAMEY, 2010). Os neutrófilos liberam proteases, incluindo a elastase neutrofílica, a qual prejudica as funções antibacterianas dos macrófagos e neutrófilos estimulando-se assim a liberação de quimiocinas e interleucinas (IL) como, por exemplo, a IL-8 (SAGEL e ACCURSO, 2002; COURTNEY *et al.*, 2004; ELIZUR *et al.*, 2008). As bactérias estimulam a liberação de quimiocinas que recrutam mais neutrófilos para as vias aéreas, o que resulta no aumento da resposta inflamatória (CHMIEL e KONSTAN, 2007).

O infiltrado persistente de neutrófilos nas vias aéreas favorece uma resposta inflamatória anormal, ou seja, com elevadas concentrações de fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) que, por sua vez, promove a síntese de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (BARNES e KARIN, 1997; DIMANGO *et al.*, 1998; BERGER, 2002; ARMSTRONG *et al.*, 2005; HANSEN *et al.*, 2010). Os pacientes com FC também têm diminuição das concentrações de IL-10, uma citocina que tem propriedade antiinflamatória. Acredita-se que a diminuição da concentração de IL-10 contribui para a produção excessiva das citocinas pró-inflamatórias, impedindo a resolução da inflamação das vias aéreas (STAROSTA *et al.*, 2006). Esse desequilíbrio entre citocinas pró e antiinflamatórias promove a amplificação da resposta inflamatória na FC (COURTNEY *et al.*, 2004; CORVOL *et al.*, 2008).

Alterações presentes nos pacientes com FC como inflamação intestinal e alterações da motilidade intestinal conjuntamente com a ingestão de medicamentos como, por exemplo, os antibióticos estão relacionados com o aumento da permeabilidade intestinal e com menor resposta dos mecanismos de reparação da mucosa (VAN ELBURG *et al.*, 1996; LLOYD-STILL *et al.*, 1998; RAIA *et al.*, 2000; SMYTH *et al.*

*al.*, 2000; BRUZZESE *et al.*, 2004; WHITE *et al.*, 2007; ATHANAZIO *et al.*, 2017).

A alteração da homeostase intestinal, resultado da interação entre hospedeiro e microbiota, está associada com a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a estimulação da secreção de íon/água promovendo a inflamação, lesão intestinal e diarreia. O epitélio intestinal é responsável por regular o transporte de eletrólitos como, por exemplo, a secreção de cloreto, contudo as células epiteliais são alvos primários de bactérias, citocinas e neuromediadores (ABREU *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006). O uso de antibióticos como a trobamicina e colistina, por pacientes com FC em exacerbação pulmonar, pode promover alteração da microbiota intestinal, por não agirem somente nas cepas patogênicas e diarreia (JERNBERG *et al.*, 2007; DETHLEFSEN *et al.*, 2008). A microbiota intestinal está envolvida com a resistência à colonização, processos metabólicos, regulação da proliferação do epitélio intestinal e com a modulação da resposta imunológica (CEBRA, 1999; MACPHERSON e UHR, 2004; NOVERR e HUFFNAGLE, 2004).

Como forma de modular a microbiota intestinal tem-se estudado a ingestão de componentes que favorecem o crescimento e o metabolismo de espécies benéficas (prebióticos), a ingestão de microrganismos vivos (probióticos) e a combinação destas duas estratégias (simbióticos) (SAAD, 2006).

A ingestão de prebióticos como os frutooligossacarídeos (FOS), inulina e galactooligossacarídeos tem sido associada com a melhora da sintomatologia e composição da microbiota intestinal em casos de síndrome do intestino irritável, regulação do sistema imunitário, diminuição da duração da diarreia e diminuição do uso de antibióticos em casos de doenças respiratórias (SAAVEDRA *et al.*, 1999; TSCHERNIA *et al.*, 1999; LOMAX e CALDER, 2009; SILK *et al.*, 2009). Algumas cepas de bactérias probióticas têm sido investigadas em diversas condições clínicas. Os *Lactobacillus* (L) tais como: *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. paracasei paracasei*, *L. rhamnosus GG*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. delbrueckii bulgaricus* estão sendo associados com a indução da produção de beta defensina humana 2 (hβD2) em células epiteliais, atividade antimicrobiana, indução da secreção de mucina, diminuição das lesões provocadas por TNF-α, atenuação da resistência transepitelial induzida por peróxido de hidrogênio, diminuição da produção de IL-8, indução da produção de IL-10 e imunomodulação de células dendríticas (CABALLERO-FRANCO *et al.*, 2007; YAN *et al.*, 2007; KONSTANTINOV *et al.*, 2008; SCHLEE *et al.*, 2008; SETH *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2009). As cepas de

bifidobactérias têm sido associadas com: a inibição da elastase pancreática e neutrófilos [*Bifidobacterium (B.) longum longum*]; regulação dos genes que expressam IL-6 (*B. animalis lactis*); aumento da função da barreira da mucosa e atenuação da inflamação e aumento da permeabilidade capilar no cólon em ratos deficientes em IL-10 (*B. longum infantis*); e sobrevivência prolongada e maturação de células dendríticas, produção aumentada de IL-10 e produção de IL-12 por células dendríticas (*B. breve*) (IVANOV *et al.*, 2006; EWASCHUK *et al.*, 2008; HOARAU *et al.*, 2008; MITSUMA *et al.*, 2008).

A utilização de prebióticos e probióticos pode ser benéfica para pacientes com FC por estarem constantemente expostos à medicação e antibióticos de amplo espectro, por apresentarem permeabilidade intestinal aumentada, microbiota anormal, mediadores imunitários inatos desregulados e inflamação pulmonar crônica (vanVAN ELBURG *et al.*, 1996; CLAEYS *et al.*, 2005; BRUZZESE *et al.*, 2007; WEISS *et al.*, 2010).

Considerando as situações apresentadas, pretende-se neste estudo avaliar o efeito da suplementação com simbiótico nos marcadores da resposta inflamatória sistêmica e a composição da microbiota intestinal de crianças e adolescentes com fibrose cística.





## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 FIBROSE CÍSTICA E A FUNÇÃO PULMONAR E GASTROINTESTINAL

A Fibrose Cística (FC) ou mucoviscidose é uma doença causada por mutações deletérias no gene FC, formado por 250 quilobases de ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid* - DNA) com 27 éxons localizado no braço longo do cromossomo sete no locus q31, o qual codifica um ácido ribonucleico mensageiro (*Ribonucleic acid messenger* – RNAm) de 6,5 quilobases. O RNAm é responsável por codificar a proteína do canal de cloro denominada proteína reguladora da condutância transmembrana da FC (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* - CFTR) composta por 1.480 aminoácidos (DAVIS, 2006; ROSA *et al.*, 2008). A proteína CFTR é sintetizada no núcleo, sendo transportada para as organelas citoplasmáticas onde ocorre a maturação, para posteriormente ser expressa nas membranas apicais das células epiteliais (ROSA *et al.*, 2008; ROLIM *et al.*, 2010).

Em 1938 a FC foi identificada como uma doença que promove à formação de muco espesso e viscoso e como consequência ocorre o bloqueio dos ductos glandulares tendo sido denominada FC do pâncreas ou mucoviscidose (ANDERSEN, 1938; FARBER *et al.*, 1943). O gene da FC que codifica a proteína CFTR, a qual funciona como um canal que realiza o transporte de cloro é regulada pelo monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), e foi descoberto apenas em 1989 em células provenientes dos ductos de suor (KEREM *et al.*, 1989; RIORDAN *et al.*, 1989; ROMMENS *et al.*, 1989; DAVIS, 2006). Além do transporte de íons de cloro através das superfícies epiteliais, a proteína CFTR tem sido relacionada com o transporte de tiocianato, bicarbonato e proteínas (QUINTON, 2001; RIORDAN, 2008).

O gene CFTR é espesso em células epiteliais presentes nas vias aéreas, nos ductos pancreáticos e nos ductos excretores de suor, no intestino, nas vias biliares e nos vasos deferentes. A disfunção na CFTR pode resultar em alteração do conteúdo de eletrólitos no meio externo da membrana celular epitelial e desencadear o aumento da concentração de cloreto no suor, insuficiência pancreática, cirrose biliar, doença pulmonar caracterizada por infecção bacteriana e bronquiectasias, além da obstrução intestinal (DAVIS, 2006; GELFOND e BOROWITZ, 2013).

A estimativa da incidência e da prevalência de FC no mundo e por região é um desafio devido à heterogeneidade da doença e a erros

e/ou limitações dos testes diagnósticos e as análises genéticas incompletas, o que dificulta o diagnóstico. Além disso, a não realização da triagem neonatal (como por exemplo o teste do pezinho) em toda a população e os casos não notificados e/ou classificados de forma inadequada também dificultam a estimativa da incidência e da prevalência de FC (FARRELL, 2008; SALVATORE *et al.*, 2011). A frequência da FC varia de acordo com a etnia, sendo mais comum em caucasianos. No mundo a frequência de FC é de cerca de 1 em 2.500 nascidos vivos (RATJEN e DÖRING, 2003), sendo que aproximadamente 70.000 pessoas possuem a doença (GIBSON *et al.*, 2003; FARRELL, 2008; RAMSEY *et al.*, 2011; BARRETT *et al.*, 2012).

Na Europa a incidência varia de 1:1.800 a 1:25.000 nascidos vivos, de acordo com a região, nos Estados Unidos a incidência é de cerca de 1 a cada 3.500 nascidos vivos (WHO, 2004). Na América Latina há uma heterogeneidade étnica da população, sendo que a incidência varia de 1:3.900 a 1:8.500 nascidos vivos. No Brasil a incidência é de 1:6.902 nascidos vivos (WHO, 2004). Com relação à região Sul, estudos tem mostrado que a incidência no Paraná, Santa Catarina e no Rio Grande do Sul é de 1:9.520, 1:8.700 e 1:1.587 nascidos vivos respectivamente (WHO, 2004).

No Brasil, segundo o Registro Brasileiro de Fibrose Cística, foram registrados 2.182 pacientes com FC no ano de 2011 (GBEFC, 2011). Na região Sul foi registrado 551 (25,3%) casos, sendo distribuídos: 97 (17,6%) pacientes são do estado do Paraná, 138 (25%) pacientes no estado de Santa Catarina e 316 (57,3%) no estado do Rio Grande do Sul (GBEFC, 2011).

O diagnóstico da FC pode ser feito inicialmente pela triagem neonatal, a qual no Brasil é baseada na quantificação, em dois momentos, dos níveis de tripsinogênio imunorreativo até 30 dias de vida (BHATTACHARYA *et al.*, 2014; ATHANAZIO *et al.*, 2017). Caso as duas dosagens deem positivo, pois a triagem neonatal sozinha não confirma nem exclui o diagnóstico, é realizado o teste de suor por meio da avaliação das concentrações de sódio e cloreto no suor dos pacientes (DI SANT'AGNESE *et al.*, 1953; SMYTH *et al.*, 2014; ATHANAZIO *et al.*, 2017). O método utilizado para a dosagem de cloretos no suor é a iontoforese por pilocarpina (GIBSON e COOKE, 1959), que é considerado o padrão ouro para o diagnóstico de FC (COLLIE *et al.*, 2014). Além do teste do suor, o diagnóstico é complementado por meio das características clínicas dos pacientes, tais como: insuficiência pancreática exócrina, as infecções respiratórias recorrentes, a

bronquiectasia em ambos os pulmões e a hipertripsinogenemia neonatal. Podendo ainda ser realizada a identificação genética dos alelos mutantes da FC (DE BOECK *et al.*, 2006; FARRELL, 2008). No Brasil o diagnóstico da FC durante a infância é significativo, sendo realizado por meio de programas de triagem neonatal ou teste de suor (GBEFC, 2011).

Após o diagnóstico, a gravidade da doença pode ser avaliada por meio do escore de Shwachman e Kulczycki (escore S-K), o qual considera a atividade geral do paciente, os exames físicos, os aspectos nutricionais e os achados radiológico (SHWACHMAN e KULCZYCKI, 1958). A avaliação da função pulmonar e a progressão da FC pode ser realizada por meio da espirometria, que permite a detecção precoce e a prevenção de alterações pulmonares mais graves (KONSTAN *et al.*, 2007; LOEVE *et al.*, 2011). A espirometria pode ser realizada em crianças a partir de cinco anos de idade. Entre os parâmetros avaliados pela espirometria estão o volume expiratório forçado no primeiro segundo ( $VEF_1$ ) e a capacidade vital forçada (CVF) (KONSTAN *et al.*, 2007; ROSENTHAL, 2008). O  $VEF_1$  é comumente usado como um indicador de deterioração pulmonar, sendo que quanto menor for o  $VEF_1$  maior será o esforço respiratório devido a problemas nas trocas gasosas. Além disso, o  $VEF_1$  pode indicar o não controle da infecção e da inflamação (GROSSMAN e GROSSMAN, 2005; ZIEGLER *et al.*, 2009). A CVF corresponde à quantidade total de ar expirado com o esforço máximo após uma inspiração máxima (JAT, 2013).

As manifestações da FC podem aparecer no período neonatal ou mais tardiamente, sendo que alguns pacientes permanecem assintomáticos por vários anos (HAACK *et al.*, 2013). O diagnóstico da FC, atualmente, pode ser realizado utilizando-se testes para a identificação de dois alelos mutantes da FC. Os testes comerciais identificam os 86 alelos em 93% dos casos (DAVIS, 2006). Contudo, já foram relatados mais de 1.900 alelos, ou seja, podem não ser identificadas mutações raras (DATABASE, 2013; LYNCH e BRUCE, 2013). Além disso, as consequências funcionais das mutações e a gravidade da doença foram definidas para um número relativamente pequeno de genótipos da CFTR (LYNCH e BRUCE, 2013).

A ausência ou a disfunção da CFTR afeta a produção de muco, as organelas intracelulares, os grânulos de secreção e consequentemente os órgãos, como por exemplo os do trato respiratório e do trato gastrointestinal (HAACK *et al.*, 2013). As mutações podem ser divididas em seis classes (GELFOND e BOROWITZ, 2013) conforme listadas no quadro a baixo (Quadro 1).

Dentre as mutações do gene CFTR a com maior incidência é a Phe508del ( $\Delta F508$ ) (GELFOND e BOROWITZ, 2013). Cerca de 90% da população com FC apresenta a mutação Phe508del, e destes 50% são homocigotos e 40% heterocigotos (THURSFIELD e DAVIES, 2012; ROWE e VERKMAN, 2013). No Brasil, 26% dos fibrocísticos são homocigotos para a mutação Phe508del e 42% são heterocigotos para a mesma mutação, sendo a incidência de 68% (GBEFC, 2011).

**Quadro 1** - Classificação das mutações do gene do Canal Regulador de Condutância Transmembrana de Fibrose Cística (CFTR).

Classe	Mutação	Consequencias
<b>Fenótipo grave da fibrose cística</b>		
I	Trp1282X (W1282X) G542X R553X 3950delT	A CFTR não é sintetizada devido a presença de códon de parada ou defeitos de “splicing”.
II	Phe508del ( $\Delta F508$ ) N1303K	A CFTR é sintetizada, mas em uma forma imatura (parcialmente glicosilada e deformada, não sendo liberada do retículo endoplasmático), e é principalmente degradada pela via ubiquitina-proteossoma.
III	Gly551Asp (G551D)	A CFTR atinge a membrana da célula, mas não responde a sinais intracelulares.
VI	Gln1412X (Q1412X) 1811+1.6 kb A>G	A CFTR instável e sua meia vida está diminuída na superfície celular.
<b>Fenótipo leve da fibrose cística</b>		
IV	Arg117His (R117H) R334W G314E R347P D1152H	A CFTR atinge a superfície da célula, mas com conformação anormal do poro resultando em má condutividade de íons cloreto.
V	3849+10 kb C>T 3272-26 A>G	Quantidade diminuída de proteína CFTR funcional.

Fonte: Adaptado de (LUBAMBA *et al.*, 2012) e (THURSFIELD e DAVIES, 2012)

A mutação Phe508del é o resultado de uma deleção de três pares de bases de um resíduo do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR (GELFOND e BOROWITZ, 2013), como consequência a proteína é degradada pelo sistema lisossomal. Entretanto as proteínas não degradadas chegam até a superfície celular, exercendo sua atividade funcional (THURSFIELD e DAVIES, 2012). Os pacientes com FC homocigotos para esta mutação apresentam a forma mais grave da doença (LYNCH e BRUCE, 2013).

Estudos tem mostrado a relação entre o genótipo e o fenótipo desses pacientes. Pacientes com as mutações da classe I, II, III e VI (mutações “graves”) apresentam insuficiência pancreática e maior risco para desenvolvimento de doença pulmonar, contudo aqueles com mutações da classe IV e V (mutações “leves”) geralmente apresentam suficiência pancreática e doença pulmonar menos severa (DAVIS, 2006; GELFOND e BOROWITZ, 2013).

A presença de doença pulmonar está relacionada com o tipo de mutação, devido a presença de alterações genéticas adicionais como polimorfismo em genes que codificam mediadores inflamatórios, os quais podem influenciar na expressão de determinados genes e consequentemente o fenótipo da FC (BUSCHER e GRASEMANN, 2006; VANSKOY *et al.*, 2007; CORVOL *et al.*, 2008).

O comprometimento no transporte de íons de cloro, devido à mutação no gene CFTR, promove alterações das condições fisiológicas na superfície epitelial, gerando um ambiente ideal para a colonização de bactérias nas vias aéreas e consequente declínio da função pulmonar (LYNCH e BRUCE, 2013). O defeito ou até mesmo a ausência da proteína CFTR, acarreta uma diminuição na secreção de cloreto de sódio e um aumento na absorção de água na superfície epitelial. A diminuição do líquido superficial nas vias aéreas, pode ocasionar uma alteração ciliar e comprometimento do transporte mucociliar (LYNCH e BRUCE, 2013). Como consequência, há desidratação do muco da superfície da mucosa das vias aéreas que associada à colonização por microrganismos, pode contribuir para o declínio progressivo da função pulmonar desses pacientes (LYNCH e BRUCE, 2013).

Estudos com o intuito de caracterizar a microbiota das vias respiratórias de pacientes com FC tem indicado a presença de diversos filotipos bacterianos neste meio (LYNCH e BRUCE, 2013). Os principais patógenos relacionados com infecções pulmonares em pacientes com FC são: *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. Maltophilia*), *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) e *P. aeruginosa*

estando essa fortemente associada com uma maior resposta inflamatória (GOVAN e DERETIC, 1996; HUTCHISON e GOVAN, 1999). Além desses patógenos, cinco outros (*Mycoplasma salivarium*, *Ralstonia taiwanensis*, *Rothia mucilaginosa*, *Vincentii treponema*, e *Veillonella atypical*) foram identificados e estes contribuem para a evolução da doença pulmonar, nesta população (ROGERS *et al.*, 2004; LYNCH e BRUCE, 2013).

A alteração na colonização da microbiota nas vias aéreas com o passar do tempo tem sido associada com o declínio da função pulmonar. Um estudo mostrou correlação negativa significativa entre a idade do paciente e a função pulmonar, ou seja, pacientes com FC mais velhos, em comparação aos mais jovens, apresentam maior comprometimento das vias respiratórias (COX *et al.*, 2010). Neste mesmo estudo foi mostrado que pacientes mais velhos apresentavam patógenos da família Pseudomonadaceae, a qual apresentou correlação positiva com a idade do paciente, enquanto que o *H. influenzae* apresentou correlação negativa com a idade dos pacientes com FC (COX *et al.*, 2010). De uma forma geral, no início da vida, as vias aéreas são colonizadas principalmente por *S. aureus* e *H. influenzae*. Eventualmente passam a ser colonizados por *P. aeruginosa*, que depois de um certo tempo pode desenvolver um fenótipo mucóide nas vias aéreas, que resulta na formação de uma camada de aprisionamento de microrganismos no pulmão e que pode acelerar o declínio da função pulmonar (BALS *et al.*, 2001; TARRAN *et al.*, 2001). A *B. cepacia* é uma bactéria resistente aos antibióticos e, se não tratado em pouco tempo pode levar à morte (LEWIN *et al.*, 1990).

Com a descoberta de que a colonização dava-se entre pacientes infectados e não infectados deu-se início a separação dos mesmos por tipo de colonização (LIPUMA *et al.*, 1990; DAVIS, 2006). Além disso, em relação a diversidade bacteriana, observou-se que pacientes pediátricos com um bom estado pulmonar apresentam uma maior diversidade em relação aos pacientes mais velhos com doença pulmonar em fase terminal. Sendo esta menor diversidade bacteriana atribuída a maior exposição aos tratamentos com antibióticos (ZHAO *et al.*, 2012; LYNCH e BRUCE, 2013).

A doença pulmonar é considerada a principal causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes com FC. Devido a isso há décadas estudos tem sido realizados com o intuito de entender os mecanismos da doença para então poder desenvolver terapias (DI e ANDERSEN, 1946). Os avanços nos estudos patológicos permitiram concluir que ao nascer o pulmão dos pacientes com FC é relativamente normal, exceto

pelo fato de que as glândulas exócrinas já apresentam muco (STURGESS e IMRIE, 1982). As infecções bacterianas na FC geralmente se desenvolvem no início da vida e com o avanço da idade a colonização das vias aéreas permanece, mesmo havendo tratamento precoce da doença com antibióticos (DAVIS, 2006). Ocasionalmente, a infecção bacteriana promove à inflamação crônica e consequente aumento da obstrução das vias aéreas e insuficiência respiratória, caracterizando a doença pulmonar progressiva (ELIZUR *et al.*, 2008). Com a progressão da doença, a inflamação das vias aéreas é associada à resposta inflamatória sistêmica (ELIZUR *et al.*, 2008).

Além das alterações fisiológicas da mucosa do sistema respiratório, as mutações no gene CFTR também podem causar alterações no trato gastrointestinal, em todo o processo de digestão e absorção, resultando em má absorção de nutrientes e desnutrição. Entre as manifestações da FC no trato gastrointestinal estão: refluxo gastroesofágico; acúmulo de muco; obstrução intestinal distal; inflamação; supercrescimento bacteriano no intestino delgado (SBID); tempo lento de trânsito no trato gastrointestinal e doença inflamatória intestinal (LYNCH *et al.*, 2013).

A proteína CFTR é encontrada ao longo de todo o epitélio do trato gastrointestinal e do sistema pancreático (GELFOND e BOROWITZ, 2013). O defeito desta proteína tem como consequência primária a secreção de muco intestinal viscoso e espesso, devido à desidratação, acidificação do meio e alteração da glicosilação das mucinas (NORKINA *et al.*, 2004; DE LISLE, 2007). E como consequência secundária dessas alterações pode haver uma disbiose que pode ser definida como uma alteração no equilíbrio e/ou composição da flora intestinal e consequente resposta inflamatória (LEE *et al.*, 2012).

A microbiota intestinal quando normal está relacionada com o fornecimento de nutrientes para o hospedeiro, armazenamento de gordura, fermentação de componentes dietéticos não digeríveis, desenvolvimento do sistema imunitário, angiogênese e com a resistência à colonização por patógenos (STAPPENBECK *et al.*, 2002; GUARNER e MALAGELADA, 2003; HOOPER *et al.*, 2003; KEILBAUGH *et al.*, 2005; SEKIROV *et al.*, 2010). A disbiose na FC pode ocorrer devido à presença de novos patógenos, alterações alimentares e alterações no ambiente e/ou estresse físico e psicológico, podem desencadear o crescimento excessivo de patógenos oportunistas e contribuir para o desenvolvimento de doenças (EDLUND *et al.*, 2000; HAWRELAK e MYERS, 2004; DETHLEFSEN *et al.*, 2008; ROGERS *et al.*, 2010).

O mecanismo subjacente ao processo inflamatório intestinal ainda não está bem esclarecido, contudo há evidências, descobertas a partir de modelo animal, que comprovam a ocorrência de disbiose e a sua relação com a inflamação (DE LISLE, 2007). Estudos em modelos de FC em animais mostraram que os mesmos apresentavam uma carga bacteriana 40 vezes maior no intestino e dismotilidade caracterizando disbiose (DE LISLE, 2007). Além disso, a expressão de genes relacionados à inflamação diminuiu quando os ratos foram tratados com antibióticos (NORKINA *et al.*, 2004). As alterações na microbiota intestinal também podem ser devido à ressecção intestinal realizada em tratamento do íleo meconial e/ou exposição frequente a antibióticos para tratamento das infecções pulmonares recorrentes (LEE *et al.*, 2012).

Como colocado anteriormente, as mutações no gene CFTR podem alterar a microbiota intestinal, sendo que a mesma também difere com relação à faixa etária (COX *et al.*, 2010). A programação microbiológica tem início ainda no útero e progride gradualmente durante o parto e a infância, sendo ainda influenciada pelo tipo de parto, alimentação, exposição a antibióticos no período perinatal e contato físico materno (RAUTAVA *et al.*, 2012; BERRINGTON *et al.*, 2013). A partir do nascimento há um aumento da diversidade da microbiota intestinal, pelo qual crianças com a idade entre um e três anos já apresentam um padrão semelhante ao do adulto. Contudo, a presença de infecção resulta em uma menor diversidade da microbiota (PALMER *et al.*, 2007; YATSUNENKO *et al.*, 2012).

O leite materno além de estar associado com a promoção de saúde fornece quantidades significativas de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (THOMAS *et al.*, 2011; YOUN *et al.*, 2012). A ingestão de alimentos sólidos também vai influenciar o microbioma de forma positiva, ou não, dependendo do tipo de alimento (BRUZZESE *et al.*, 2007). Na Figura 1 estão representados os 8 gêneros mais abundantes da microbiota intestinal de crianças com FC.

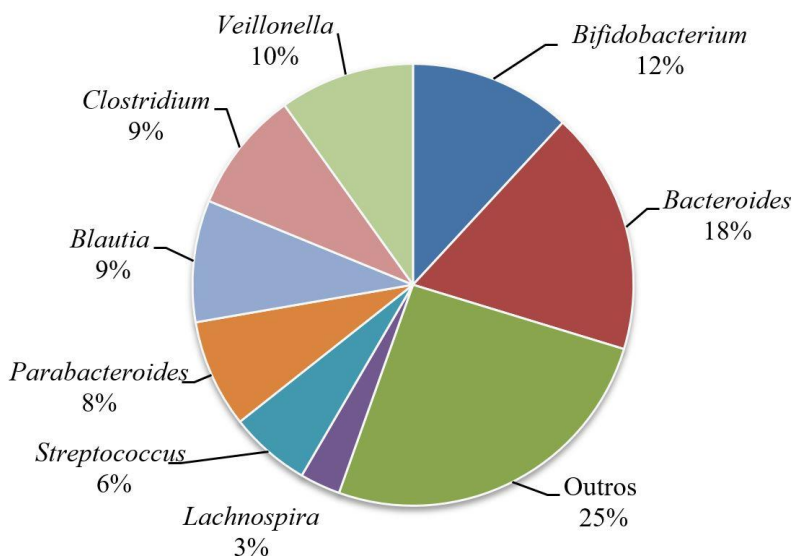
Dentre as manifestações mais comuns na FC destaca-se a ocorrência de íleo meconial que é uma obstrução intestinal, comum em pacientes com mutações graves como a Phe508del e tem início já na infância (WALKOWIAK *et al.*, 2005; CARLYLE *et al.*, 2012). Pacientes homocigotos para a mutação Phe508del apresentam 24,9% de chance de ter íleo meconial, sendo que os heterocigotos para esta mutação possuem apenas 16,9% de chance. O íleo meconial é o primeiro sinal de insuficiência pancreática (BLACKMAN *et al.*, 2006).

A provável causa para a ocorrência de íleo meconial pode ser a secreção deficiente de bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ), o que resulta em um



ambiente luminal mais ácido e desidratado do que o normal (QUINTON, 2010). A formação de muco compreende a secreção de mucinas por exocitose no lúmen intestinal com a formação de uma matriz firme em torno dos íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). E por meio da quelação dos íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , o  $\text{HCO}_3^-$  ajuda a expandir essas mucinas a partir de uma matriz solta e bem hidratada (CARLYLE *et al.*, 2012). Contudo, em casos de íleo meconial o muco apresenta-se desidratado e compacto (CHEN *et al.*, 2010).

**Figura 1-** Distribuição dos gêneros mais abundantes da microbiota intestinal de crianças com fibrose cística.



Fonte: Adaptado de MADAN *et al.* (2012).

A síndrome da obstrução intestinal distal (SOID), comum em pacientes com insuficiência pancreática, é similar ao íleo meconial, contudo a principal diferença entre elas está na idade do paciente. Na SOID ocorre uma compactação de resíduos fecais no íleo terminal, sendo a principal causa a desidratação. Outros mecanismos como a dismotilidade intestinal, a hipertrofia do tecido, a inflamação da mucosa, a má absorção de gordura, a utilização de medicamentos que interferem na motilidade intestinal, o defeito no transporte de íons de cloro e a secreção de água no lúmen também estão relacionadas com a ocorrência de SOID (HAACK *et al.*, 2013). A SOID pode ocorrer tanto de forma

aguda como crônica, sendo os principais sinais e sintomas a dor, constipação, distensão abdominal, vômitos e anorexia (LITTLEWOOD *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2011; HAACK *et al.*, 2013). A ocorrência de dor intermitente e a distensão abdominal podem ser atribuídas a um colapso parcial e acúmulo de material fecal sobre uma massa mucóide fortemente aderente (COLOMBO *et al.*, 2011).

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é observada em cerca de 30% dos adultos com FC, sendo os principais sintomas a azia, a disfagia e a dispepsia (SABATI *et al.*, 2010). O mecanismo que causa a DRGE na FC é igual para os indivíduos sem diagnóstico de FC. Contudo a maior incidência que é observada nos fibrocísticos pode ser consequência das doenças respiratórias subjacentes. A DRGE consiste no relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior (RTEEI), resultando em refluxo do conteúdo gástrico para o esôfago e tendo como sintomas clínicos dor e desconforto (GELFOND e BOROWITZ, 2013).

O supercrescimento bacteriano no intestino delgado (SBID) ocorre em cerca de 30 a 55% dos pacientes com FC. A presença de secreções espessas, os usos crônicos de azitromicina e de agentes de supressão de ácido podem causar estase intestinal o que facilitaria o seu desenvolvimento (FRIDGE *et al.*, 2007). Os principais sintomas observados no SBID são diarreia, dor e distensão abdominal (LISOWSKA *et al.*, 2009). Tem sido observado nesses pacientes que o trânsito do intestino delgado é praticamente o dobro do que em pessoas sem FC. Como consequência da SBID há um excessivo crescimento bacteriano no intestino delgado, o qual é responsável pela produção de metabólitos tóxicos, que por sua vez podem causar dano aos enterócitos, má absorção de nutrientes e desnutrição (FRIDGE *et al.*, 2007). Estudo em modelos animais com FC, realizado com o intuito de classificar as bactérias intraluminais, mostrou que há uma diminuição da diversidade de espécies de microrganismos no intestino destes animais. Dos microrganismos identificados 95% pertenciam a família Enterobacteriaceae e 6% era *Clostridium (C.) perfringens* (NORKINA *et al.*, 2004; DE LISLE, 2007).

O uso de antibióticos como a tobramicina e a eritromicina é outro fator que pode influenciar na microbiota do trato gastrointestinal (RATJEN, 2001). A ingestão de antibióticos pode resultar em grandes perdas de “membros” do microbioma que mesmo após o término do tratamento demora ou não se restabelece mais (DETHLEFSEN *et al.*, 2008; RAFII *et al.*, 2008). Normalmente o balanço ecológico é restaurado em poucas semanas após a ingestão de antibiótico, contudo há evidências de que as perturbações associadas aos antibióticos podem

persistir por um longo período após o tratamento. Assim, a exposição prolongada a antibióticos, pode resultar no crescimento excessivo de bactérias resistentes a antibióticos (IAPICHINO *et al.*, 2008; RAFII *et al.*, 2008; PREIDIS e VERSALOVIC, 2009). Em pacientes com FC, as infecções com patógenos como o *C. difficile* podem causar diarreia severa e/ou colite pseudomembranosa (SCHMITT-GROHE *et al.*, 2002; HUSSAIN *et al.*, 2004).

A relevância clínica da perda de microrganismos ainda não está bem estabelecida. Contudo sabe-se que a microbiota do trato gastrointestinal está relacionada com funções metabólicas importantes como a regulação da resposta imune do hospedeiro. O uso frequente de antibióticos pode acarretar em um efeito cumulativo negativo sobre o metabolismo e sistema imune nesta população (PENDERS *et al.*, 2006; LYNCH *et al.*, 2013).

O pâncreas é outro órgão afetado devido ao defeito ou ausência da proteína CFTR, sendo que 85% a 90% dos pacientes com FC apresentam insuficiência pancreática. Sendo mais comum naqueles com mutações graves, e destes a maior parte apresenta os sinais e sintomas desde o nascimento (PARK e GRAND, 1981; CIPOLLI *et al.*, 2007; HAACK *et al.*, 2013). A porção exócrina do pâncreas esta relacionada com a produção de enzimas para a digestão dos alimentos que ocorrerá no intestino (HAACK *et al.*, 2013). Ou seja, a insuficiência pancreática é caracterizada por diarreia crônica e má digestão dos alimentos (REIS e DAMACENO, 1998). A má digestão se deve a obstrução do canalículo do pâncreas pela presença de muco, o que impede a passagem das enzimas responsáveis pela digestão de proteínas, carboidratos e gordura para o duodeno (REIS e DAMACENO, 1998). Além disso, pode haver uma diminuição da eficácia das enzimas pancreáticas e uma precipitação dos sais biliares devido à diminuição na secreção de bicarbonato de sódio, provocando uma acidificação do meio e consequente má absorção (REIS e DAMACENO, 1998). Este efeito tem sido relacionado com a má absorção e a presença de inflamação intestinal (LEE *et al.*, 2012).

A digestão e absorção inadequadas juntamente com o aumento das necessidades energéticas, devido principalmente à anorexia e às doenças respiratórias recorrentes, são as principais causas de desnutrição nestes pacientes (HAACK e NOVAES, 2013; PANAGOPOULOU *et al.*, 2014). Em crianças recém diagnosticadas já se pode observar problema de má absorção e consequentemente a deficiência de algumas vitaminas lipossolúveis. Devido a isso, todas as crianças diagnosticadas com FC passam a receber a suplementação das vitaminas A, D, E e K

(FERANCHAK *et al.*, 1999; BOROWITZ *et al.*, 2002; DALCIN e ABREU E SILVA, 2008).

A porção endócrina do pâncreas também apresenta alterações, como a intolerância à glicose devido à diminuição da secreção de insulina. A presença de diabetes em pacientes com FC pode resultar em complicações microvasculares e macrovasculares associadas à deterioração pulmonar acelerada, com consequente aumento da taxa de mortalidade (BRENNAN *et al.*, 2004).

Há décadas foram estabelecidos três pilares para o tratamento da FC, sendo eles: a repleção nutricional, o alívio da obstrução das vias aéreas e a antibióticoterapia.

O primeiro pilar (repleção nutricional) consiste na suplementação com enzimas pancreáticas e na suplementação de vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, devido à insuficiência pancreática exócrina e má absorção de gordura. As enzimas suplementadas são a protease, a lipase e a amilase, sendo a dosagem recomendada inferior a 2.500 unidades de lipase/kg/refeição ou inferior a 4.000 unidades de lipase/gramas de gordura por dosagem enzimática baseada no peso diário (BOROWITZ *et al.*, 2002; SINAASAPPEL *et al.*, 2002). No caso dos pacientes com mais de quatro anos a suplementação deve começar com 500 unidades de lipase/kg/refeição (BOROWITZ *et al.*, 1995; BOROWITZ *et al.*, 2002). A suplementação de vitaminas lipossolúveis segue o Consenso Americano de Fibrose Cística, o qual se baseia na normalização das concentrações séricas, devendo ser reavaliado após alguns meses de suplementação e/ou antes, da mudança no tratamento de reposição enzimática (BOROWITZ *et al.*, 2002; SINAASAPPEL *et al.*, 2002; KEREM *et al.*, 2005). Os pacientes com FC também apresentam aumento da demanda calórica e anorexia devido à doença pulmonar, sendo que cerca de 20% das crianças e 40% dos adultos apresentam baixo peso. Como forma de restabelecer o estado nutricional alguns pacientes passam a completar a alimentação com suplemento enteral, pois baixo peso é um indicador de mau prognóstico (DAVIS, 2006).

O objetivo do segundo pilar (alívio da obstrução das vias aéreas) é desobstruir as vias aéreas as quais se encontram obstruídas por muco e pus. A drenagem postural e a percussão são métodos eficazes que são utilizados em pacientes mais jovens com o objetivo de expelir o muco (MURRAY, 1979). As vias aéreas dos pacientes com FC geralmente também apresentam edema, hipertrofia do músculo liso e broncoconstrição. Os broncodilatadores (agonistas  $\beta$ -adrenérgicos e teofilina) são administrados com o objetivo de relaxar o músculo liso

das vias aéreas (KONSTAN *et al.*, 1994). Nem todos os pacientes respondem bem ao tratamento e alguns apresentam uma diminuição da função pulmonar como consequência do dano na parede das vias aéreas (DAVIS, 2006).

O terceiro pilar é baseado no tratamento de infecções das vias aéreas principalmente com antibióticos. Os benefícios da terapia supressiva vêm sendo observada com relação ao uso da tobramicina por aerossol, que após ser usada durante seis meses pode levar a melhora da função pulmonar e menor número de exacerbações pulmonares (DAVIS, 2006). Além disso, a terapia com azitromicina oral contínua também tem mostrado bons resultados em pacientes mais velhos infectados com *Pseudomonas*. Entretanto não se sabe ao certo se isso se deve a atividade antimicrobiana da azitromicina ou as suas propriedades antiinflamatórias (ROSENFELD *et al.*, 2003). A duração deste tipo de tratamento ainda não está bem estabelecida, contudo tem se preconizado a terapia supressiva na infância, antes do estabelecimento da infecção crônica, com o intuito de beneficiar os pacientes por meio do atraso da colonização (ROSENFELD *et al.*, 2003).

Um quarto pilar foi posteriormente estabelecido visando a supressão da inflamação. A princípio acreditava-se que a inflamação era uma resposta a infecção, contudo foi observado que pacientes com FC não contaminados apresentavam concentrações muito baixas de imunoglobulina G (IgG). Além disso foi observado que crianças com FC apresentavam maior número de neutrófilos e maiores concentrações de IL-8 no lavado broncoalveolar em relação as crianças sem FC (MATTHEWS *et al.*, 1980; NOAH *et al.*, 1997; MUHLEBACH *et al.*, 1999). O uso de esteróides em dias alternados ou de doses elevadas de ibuprofeno estão relacionados com a diminuição na taxa de declínio pulmonar em pacientes com FC (EIGEN *et al.*, 1995). Entretanto o uso de esteróides tem sido associado ao retardo do crescimento, a ocorrência de cataratas e diabetes. Enquanto que o ibuprofeno tem sido relacionado ao aumento da incidência de hemorragia gastrointestinal (ROSENSTEIN e EIGEN, 1991; OERMANN *et al.*, 1999).

De uma forma geral a terapia para a FC inclui a manutenção do estado nutricional por meio da suplementação com enzimas, vitaminas e minerais e a recomendação de uma dieta hipercalórica e hiperproteica. Além de cuidados com a presença de infecções do trato pulmonar, a utilização de medicamentos, principalmente antibióticos e o monitoramento das alterações gastrointestinais, pancreáticas e hepatobiliares (ROSA *et al.*, 2008; FLUME e VAN DEVANTER, 2012).

O diagnóstico precoce da FC, o monitoramento e o tratamento das complicações do trato respiratório e gastrointestinal juntamente com a manutenção do estado nutricional o qual está diretamente ligado com a função pulmonar, podem melhorar a taxa de sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes (O'DONNELL *et al.*, 2009).

## 2.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA FIBROSE CÍSTICA E SUA RELAÇÃO COM O ESTADO NUTRICIONAL

A inflamação é um mecanismo de defesa que tem como função proteger o organismo contra infecções e insultos. De uma forma geral esse mecanismo é responsável pela identificação do corpo estranho (fase aferente), morte do patógeno (fase eferente), pela reparação dos tecidos e auxílio na restauração da homeostase em locais infectados ou danificados. Quando a inflamação ocorre de forma excessiva pode lesionar os tecidos e em situações mais graves pode causar alterações fisiológicas como descompensação e disfunção orgânica, assim como pode levar à morte. Os sinais e os sintomas característicos são vermelhidão, edema, rubor, dor e perda da função, além de envolver a interação entre os vários tipos de células e a produção e a resposta a mediadores químicos (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; CALDER *et al.*, 2009).

O organismo, normalmente, é tolerante a microrganismos e outros componentes ambientais que não representam uma ameaça, sendo esta resposta limitada e controlada. Para que não haja danos ao organismo, a resposta inflamatória é bem regulada e auto-limitada. Esta resposta envolve a ativação de mecanismos de *feedback* negativos caracterizados pela secreção de citocinas anti-inflamatórias, pela inibição da cascata de sinalização pró-inflamatória, pela perda de receptores para mediadores inflamatórios e pela ativação das células regulatórias. A inflamação está relacionada com a perda da tolerância e/ou da regulação dos processos que quando ocorre pode causar danos irreparáveis aos tecidos (CALDER *et al.*, 2009). A inflamação pode ser dividida em aguda e crônica (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inflamação aguda normalmente é de curta duração, podendo durar de horas a dias, sendo caracterizada por vasodilatação, exsudação do plasma e migração celular principalmente de neutrófilos para o local da lesão e em alguns casos pode levar à ativação da cascata de

coagulação (CARRAWAY *et al.*, 2003; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inflamação crônica ocorre quando o sistema imunológico não é capaz de resolver o processo inflamatório consequente de uma infecção ou de outro insulto. É caracterizado por apresentar longa duração, podendo essa ser de meses a anos, ocorrendo destruição e reparação tecidual simultaneamente (DAVIES *et al.*, 2003; LIEW, 2003). Durante o processo inflamatório as células do sistema imunitário migram, por meio do sistema circulatório, para os tecidos. Para isso necessitam ultrapassar as barreiras endoteliais e epiteliais. Ao ultrapassarem a barreira, outras proteínas e componentes sanguíneos também podem passar. Além disso, o recrutamento contínuo de células inflamatórias pode resultar em necrose e liberação de enzimas proteolíticas no tecido, resultando em dano e formação de cicatriz (MACHEN, 2006; HERALD, 2010).

A inflamação é também mediada pelo sistema imunitário que pode ser dividido em dois subsistemas que interagem, sendo eles a imunidade inata, a qual é caracterizada por uma resposta rápida, primitiva e inespecífica, e a imunidade adaptativa a qual envolve resposta específica de antígenos de defesa e de longa duração (GARCIA *et al.*, 1999; JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; CALDER *et al.*, 2009).

O sistema imunitário inato é responsável pela resposta inicial quando ocorre uma invasão do tecido, sendo que os componentes celulares primários são os macrófagos, as células dendríticas, os neutrófilos e as células assassinas (*natural killer* - NK). A magnitude da resposta inata é determinada pela atividade das citocinas e dos mediadores. As citocinas são definidas como polipeptídeos produzidos por células do sistema imunológico em resposta à infecção ou lesão tecidual (LIEW, 2003). A síntese de citocinas é auto-limitante, apesar de algumas citocinas permanecerem na circulação por um longo período de tempo e, além disso, são pleiotrópicas por apresentarem inúmeras funções e redundantes pois mais de uma citocina apresenta a mesma função (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Devido a isso, o bloqueio da atividade de uma citocina tem efeito limitado sobre a resposta inflamatória (PARRILLO *et al.*, 1990).

As principais células responsáveis pela secreção de citocinas são os macrófagos, contudo as células dendríticas também são reconhecidas como células efetoras no reconhecimento microbiano e produção de citocinas, devido à sua capacidade de responder a produtos microbianos por meio de receptores de reconhecimento padrão, presentes em sua superfície (GRANUCCI, FEAU, ANGELI, *et al.*, 2003; GRANUCCI,

FEAU, ZANONI, *et al.*, 2003; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os receptores semelhantes a *Toll* (*Toll-like receptor* – TLR) são proteínas presentes na superfície celular que se ligam a outras moléculas formando receptores complexos e relativamente específicos para certos ligantes, como por exemplo para os lipopolissacarídeos das bactérias gram-negativas, lipoproteínas das bactérias gram-positivas e DNA bacteriano, ou seja estão relacionadas com o reconhecimento de patógenos (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A ligação ao complexo TLR dá início ao recrutamento de proteínas de sinalização citoplasmáticas como a proteína Fator 88 de Diferenciação Mieloide (MyD88) e a IL-1 associada ao receptor quinase (IRAK). A autofosforilação e a dissociação da IRAK do MyD88 ocorre devido ao recrutamento da IRAK. Quando fosforilada a IRAK induz a ativação do fator-6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF-6), que em seguida ativa a quinase inibidora do fator nuclear kB (IKkB), resultando na degradação da proteína inibitória IKkB e na liberação citoplasmática do NF-kB. Em seguida o NF-kB é transportado para o núcleo para se ligar as regiões promotoras de genes, as quais codificam mediadores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , IL-1 beta, IL-6 e óxido nítrico-sintase induzida (iNOS). A ativação do TRAF-6 também resulta na indução da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP) com a ativação final da proteína de ativação-1 (AP-1) dos fatores de transcrição. A NF-kB, assim como a AP-1, ligam-se à região promotora dos genes que codificam os mediadores pró-inflamatórios e promovem a produção dos mesmos (GUHA e MACKMAN, 2001; WARD e LENTSCH, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; DOLL *et al.*, 2014).

O mediador pró-inflamatório TNF- $\alpha$  é liberado pelos macrófagos logo após ocorrer à lesão, iniciando uma resposta imunológica que ativa os mecanismos de defesa anti-microbioma, que após a erradicação da infecção inicia a reparação do tecido. O TNF- $\alpha$  tem a capacidade de ativar neutrófilos e fagócitos mononucleares (DINARELLO, 2000; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Contudo, a liberação sistêmica de TNF- $\alpha$  pode dar início a uma cascata destrutiva a qual pode resultar em lesão tecidual, disfunção nos órgãos e consequentemente a morte. Alguns dos efeitos sistêmicos do TNF- $\alpha$  são: indução de febre; hipoglicemia; catabolismo; estimulação da secreção de proteína de fase aguda no fígado; ativação da cascata de coagulação; supressão do miocárdio; indução da vasodilatação sistêmica resultando em hipotensão (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; DOLL *et al.*, 2014).



A família das proteínas IL-1 inclui a IL-18, mas tem funções diferentes. A IL-1 apresenta funções semelhantes ao TNF- $\alpha$ , contudo não induz injúria ou morte celular, mas potencializa os efeitos do TNF- $\alpha$ . Enquanto que a IL-18 atua em conjunto com a IL-12 na estimulação de células NK e células T auxiliares (*T helper* -Th) para produzir interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (PRUITT *et al.*, 1995; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A IL-8 é produzida por macrófagos e atua como um potente quimioatrativo no recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação. Atua na mediação da lesão tecidual causada por traumas e queimaduras especialmente no pulmão (LUSTER, 1998; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A citocina IFN- $\gamma$  está envolvida na amplificação da resposta inflamatória, estando principalmente relacionada com a estimulação da secreção de citocinas, fagocitose e a produção de oxidantes por macrófagos. O IFN- $\gamma$  em conjunto com a IL-12 atua na amplificação tanto da resposta imunológica inata quanto da adaptativa, onde a IL-12 estimula as células NK a produzirem IFN- $\gamma$  que por sua vez, potencializa a atividade dos macrófagos inclusive a produção de mais IL-12, ou seja, a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  resulta em um *feedback* positivo que potencializa a resposta inflamatória (VARMA *et al.*, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A IL-10 é uma citocina antiinflamatória com a capacidade de bloquear a produção de citocinas pró-inflamatórias e a secreção de quimiocinas além de inibir a apresentação de antígenos pelos macrófagos e a atividade das células dendríticas atuando como um importante regulador da resposta inflamatória (OOBOSHI *et al.*, 2005). A citocina inibe a produção da IL-12 por macrófagos ativados e células dendríticas, e consequentemente atuam na supressão da produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK e células T ativadas (OBERHOLZER *et al.*, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; DOLL *et al.*, 2014).

A resposta imunitária inata também atua na ativação e na amplificação da imunidade adquirida, sendo este efeito mediado pela IL-12 que ativa as células T e estimula a diferenciação das células T virgens (*naïve*) no fenótipo Th1 (O'SULLIVAN *et al.*, 1995; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A resposta imunitária é principalmente induzida por meio da apresentação de antígenos estranhos as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. A ativação das células CD4<sup>+</sup> estimula a produção de citocinas e amplifica a resposta imunitária inata e adquirida. A principal citocina produzida pelas células Th1 é o IFN- $\gamma$ , o qual por meio da ativação dos macrófagos e estimulação da função

citotóxica de células TCD8<sup>+</sup> amplifica a resposta pró-inflamatória. Macrófagos e células dendríticas induzem a resposta Th1 por meio da produção de IL-12. A função primária das células Th1 é a promoção da imunidade antimicrobiana por meio da mediação da fagocitose (WOLK *et al.*, 2000; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A diferenciação das células Th2 é induzida pela IL-4, cuja produção é estimulada por helmintos e alérgenos. As células Th2 diferenciadas produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Em conjunto a IL-4, IL-10 e a IL-13 estimulam a supressão dos macrófagos assim como, a produção dos anticorpos IgG<sub>1</sub> e imunoglobulina E (IgE), os quais intermediam tanto as reações alérgicas, como a resposta imunitária anti-parasitária, enquanto que a IL-5 induz a ativação de eosinófilos. Portanto, a principal função das células Th2 é a defesa do hospedeiro contra infecções por helmintos, além do papel patológico na facilitação da asma e reações alérgicas (ROBINSON, 2000; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

As células Th3 e as células T reguladoras (Tr1) são um subgrupo de células. A célula Th3 além de produzir o fator de transformação do crescimento beta (*transforming growth factor* beta - TGF- $\beta$ ) também desempenha um importante papel no desenvolvimento da tolerância imunitária, principalmente após a exposição a antígenos por meio do trato gastrointestinal. A célula Tr1 produz TGF- $\beta$  e IL-10. O TGF- $\beta$  tem a capacidade de suprimir a função das células Th1 e Th2, macrófagos, células NK e células B, além de estimular o aumento da infiltração de leucócitos. Em conjunto com outras citocinas o TGF- $\beta$  estimula a diferenciação de células Th17 (WEINER, 2001; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; LAFYATIS, 2014). O TGF- $\beta$  atua na regulação da fibrose e da inflamação (LAFYATIS, 2014).

As células Th17, subpopulação das células T CD4<sup>+</sup>, são capazes de desencadear uma resposta inflamatória aguda contra bactérias extracelulares e fungos, por meio do recrutamento de neutrófilos. Além disso, podem ser relacionadas ao desenvolvimento de doenças auto-imunes (MIOSSEC e KOLLS, 2012; SHABGAH *et al.*, 2014). Entre as citocinas secretadas pela célula Th17 esta a IL-17A, que é uma citocina pró-inflamatória relacionada com o recrutamento, a ativação e migração de neutrófilos (FUJIMURA *et al.*, 2013; SHABGAH *et al.*, 2014). A IL-17A induz a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) para o recrutamento de granulócitos, IL-1 e TNF em macrófagos iNOS, e ciclo-oxigenase-2 em condrócitos (DE JONG *et al.*, 2010). A IL-17A também pode ser secretada por células tanto da resposta inata quanto da

adaptativa como as células T CD8+, células NK, monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (YAMADA, 2010).

Na FC a inflamação ocorre precocemente e de forma intensa. Na doença pulmonar, que é caracterizada por um ciclo de auto-perpetuação da obstrução das vias respiratórias, ocorre infecção bacteriana crônica e inflamação intensa. O que pode resultar no desenvolvimento da doença obstrutiva pulmonar progressiva e consequente diminuição na expectativa de vida (DAVIS *et al.*, 1996; CHMIEL, BERGER, *et al.*, 2002).

Quando, pessoas sem doença são infectadas por vírus ou bactérias inicia-se um recrutamento contínuo de neutrófilos para as vias aéreas. Contudo na FC a resposta inflamatória aumenta consideravelmente, e torna-se independente da infecção bacteriana (CHMIEL, BERGER, *et al.*, 2002). Tem sido observado que as vias aéreas dos pacientes com FC apresentam grandes concentrações de mediadores inflamatórios e neutrófilos e seus produtos. Estes estão relacionados com a diminuição das defesas locais e consequente contribuição com a lesão pulmonar. Na secreção pulmonar de pacientes com FC tem-se observado concentrações elevadas de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8. A síntese dessas citocinas são sintetizadas pelo NF-kB, e este pode ser ativado por bactérias e citocinas pró-inflamatórias (VENKATAKRISHNAN *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2003; BARNES, 2006; STAROSTA *et al.*, 2006).

As células epiteliais, assim como os macrófagos, linfócitos T e B, células dendríticas e mastócitos expressam a proteína CFTR, e estão presentes em grandes quantidades nas vias respiratórias de pacientes com FC (HUBEAU *et al.*, 2001; MCALLISTER *et al.*, 2005). Entretanto, a ligação entre a disfunção na proteína CFTR e a resposta inflamatória ainda não está bem estabelecida. O que se sabe é que a disfunção na proteína CFTR resulta em um aumento na ativação de NF-kB e na secreção de IL-8 após estímulos pró-inflamatórios (KUBE *et al.*, 2001; SABA *et al.*, 2002; KUBE *et al.*, 2005).

A ocorrência de resposta inflamatória na FC tem sido observada na ausência de agentes patógenos. O que pode sugerir que a resposta inflamatória em pacientes com FC ocorre independente de um estímulo infeccioso. Porém, a presença da inflamação pode ter sido devido a um não encerramento da resposta inflamatória após o estímulo infeccioso ter sido erradicado. Caracterizando então, uma persistência anormal da resposta inflamatória após uma infecção transitória. Alguns estudos observaram que as vias aéreas dos pacientes com FC são deficientes no mediador antiinflamatório IL-10, o qual está relacionado com o aumento da concentração da IKk $\beta$ , a qual atua como inibidora da NF-kB. A

deficiência de IL-10 e/ou de óxido nítrico (NO) resulta em um desequilíbrio no epitélio das vias aéreas, ou seja, a presença aumentada de NF- $\kappa$ B resultaria na produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios e consequente dano pulmonar (STEAGALL *et al.*, 2000; CHMIEL, KONSTAN, *et al.*, 2002; KRAYNACK *et al.*, 2002; SAGEL *et al.*, 2007).

A imunodeficiência está diretamente ligada à deficiência nutricional, por a mesma estar associada com a função de fagócitos, produção de citocinas, resposta de anticorpos e do sistema complemento (CHANDRA, 1996). Entre os fatores que contribuem para a desnutrição na FC estão a insuficiência pancreática exócrina, a qual está relacionada com a má digestão e absorção principalmente das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e dos minerais cálcio, magnésio e zinco (O'SULLIVAN e FREEDMAN, 2009; ROLIM *et al.*, 2010; WERLIN *et al.*, 2010). O metabolismo dos nutrientes e a imunidade inata atuam em conjunto com o intuito de manter a homeostase do organismo. As células efectoras do sistema imunitário utilizam-se dos nutrientes essenciais tanto como fonte de energia, quanto como precursores metabólicos para a biossíntese de macromoléculas. Em síntese, o comprometimento do estado nutricional está relacionado com o aumento da susceptibilidade a infecções e ou inflamações crônicas (AFACAN *et al.*, 2012).

As infecções de repetição, o processo inflamatório e o esforço respiratório aumentado são os principais responsáveis pelo comprometimento do estado nutricional dos pacientes com FC (GROENEWEG *et al.*, 2002; SALVATORE *et al.*, 2010). O estado nutricional de pacientes com FC está relacionado com a morbidade e mortalidade em longo prazo, sendo que o comprometimento do estado nutricional nesses pacientes pode ser devido a três fatores principais: ingestão de energia insuficiente; aumento da perda energética; aumento do gasto energético (SINAASAPPEL *et al.*, 2002; PANAGOPOULOU *et al.*, 2014). Entre as causas relacionadas com a ingestão insuficiente de energia estão às doenças pulmonares, o refluxo gastroesofágico, a tosse e a presença das citocinas pró-inflamatórias com efeito anorexígeno como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (DODGE e TURCK, 2006; PINTO *et al.*, 2009; PANAGOPOULOU *et al.*, 2014). A insuficiência pancreática a qual resulta em má digestão e absorção de nutrientes é um dos principais fatores responsáveis pela perda energética (SINAASAPPEL *et al.*, 2002; MATEL e MILLA, 2009). Com relação ao gasto energético aumentado as principais causas são as infecções de repetição, a inflamação

persistente e o aumento do esforço respiratório (ADDE *et al.*, 2004; SALVATORE *et al.*, 2010).

A avaliação do estado nutricional de crianças e adolescentes com idade entre cinco e 19 anos com FC normalmente é feita por meio das curvas de crescimento publicadas em 2007 pelo *World Health Organization* (WHO) (WHO, 2007). Sendo esta avaliação feita por meio dos indicadores estatura-para-idade (E/I), peso-para-idade (P/I) e índice de massa corporal-para-idade (IMC/I) (WHO, 2006). Para a classificação do estado nutricional há os parâmetros estabelecidos pelo Consenso Americano de Fibrose Cística específicos para esta população (BOROWITZ *et al.*, 2002). A avaliação nutricional também pode ser feita por meio das medidas de circunferência do braço (CB), a dobra cutânea tricípital (DCT), a dobra cutânea bicípital (DCB), a dobra cutânea subescapular (DCSE), a dobra cutânea supra-íliaca (DCSI). E por medidas calculadas a partir da CB e DCT como a circunferência muscular do braço (CMB), área muscular do braço (AMB) e área gordurosa do braço (AGB) e a composição corporal por meio da DCT, DCB, DCSE e DCSI.

O estado nutricional em pacientes com FC também pode ser agravado pelo catabolismo proteico, o que resulta em uma importante diminuição na massa magra e consequente diminuição da força muscular (ADDE *et al.*, 2004; HAACK e NOVAES, 2013). Fatores como a presença de doença aguda ou crônica, severidade da doença, desequilíbrio hidroeletrólítico, inflamação, infecções recorrentes e estresse oxidativo podem resultar em uma maior debilidade muscular (WAGENMAKERS, 2001).

### 2.3 SIMBIÓTICO (PREBIÓTICO – PROBIÓTICO)

Os estudos assim como o interesse com relação aos benefícios dos prebióticos e probióticos têm aumentado devido às evidências do seu benefício tanto para os indivíduos sem doença, quanto para aqueles que são doentes. A Organização Mundial de Gastroenterologia no ano de 2011 publicou as diretrizes para o consumo dos prebióticos e probióticos. Esclarecendo que não há ainda provas sobre a eficácia da ingestão dos mesmos. As diretrizes recomendam a ingestão de prebióticos e probióticos para o tratamento de diarreias associadas ao uso de antibióticos, no tratamento de enterocolite necrotizante e na dermatite atópica (WHO, 2011; SANDERS *et al.*, 2014).

A definição dos prebióticos a princípio era “ingrediente alimentar não digerido que afeta benéficamente o hospedeiro ao estimular

seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon, melhorando a saúde do hospedeiro” (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Essa definição foi posteriormente revista, sendo os prebióticos definidos como “ingredientes alimentares seletivamente fermentados, não digeríveis que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade na microflora gastrointestinal conferindo benefícios a saúde do hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2004).

Um ingrediente alimentar só pode ser classificado como prebiótico quando o mesmo apresenta as seguintes características: resistência a acidez gástrica, a hidrólise por enzimas e que a sua absorção ocorra no trato gastrointestinal superior; capacidade de ser fermentado pela microflora intestinal; capacidade de estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade das bactérias benéficas (ROBERFROID *et al.*, 2010; SLAVIN, 2013). O crescimento seletivo está relacionado com a capacidade do prebiótico em estimular a proliferação principalmente das bifidobactérias e dos lactobacilos, os quais são considerados benéficos para a saúde (SLAVIN, 2013).

Os principais prebióticos e mais comumente utilizados são os frutanos do tipo inulina, oligofrutose, FOS e galacto-oligossacidos (GOS), do tipo estaquiose e rafinose (SLAVIN, 2013; WHELAN, 2013). Os prebióticos são encontrados em alimentos como: alho-poró; aspargo; chicória, alcachofra, alho, cebola, trigo, aveia e soja (van LOO *et al.*, 1995).

Um dos mecanismos de ação dos prebióticos é sua capacidade de fermentação no cólon e de alterar a flora intestinal a qual obtem energia por meio da fermentação de carboidratos não digeridos na porção superior do intestino. A via de fermentação principal produz piruvato a partir de hexoses provenientes de carboidratos não digeríveis. E as bactérias presentes no cólon, por meio de enzimas hidrolíticas produzem hidrogênio, metano, dióxido de carbono, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e lactato (SLAVIN, 2013).

A fermentação em conjunto com a produção de AGCC são capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, devido a diminuição do pH luminal e fecal. Além disso, auxilia na regulação da absorção de água e sódio, melhora a absorção de minerais como o cálcio e promove o crescimento de bactérias benéficas como as bifidobactérias e os lactobacilos. Em meios onde o pH está mais baixo há uma diminuição na degradação de peptídeos e consequentemente a formação de compostos tóxicos como a amônia, aminas e compostos fenólicos, além de diminuir a atividade das enzimas bacterianas indesejáveis. A quantidade de AGCC produzido pelos prebióticos varia de acordo com o

peso molecular, comprimento da cadeia e estrutura do probiótico, ou seja, moléculas de cadeia curta como as do FOS são rapidamente fermentados (LUPTON, 2004; BROWNAWELL *et al.*, 2012; SLAVIN, 2013).

Em um estudo com pacientes com doença inflamatória intestinal suplementados com uma mistura de FOS e inulina, foi observado diminuição significativa nos índices de severidade da doença, nos marcadores pró-inflamatórios e na calprotectina (KONIKOFF e DENSON, 2006).

O efeito dos prebióticos tem sido mostrado na função do trato gastrointestinal, na função imunitária, na absorção de minerais, na gestão de transtornos pediátricos e na obesidade. De uma forma geral, os benefícios da ingestão dos prebióticos estão relacionados com a melhora na função da barreira intestinal, diminuição da ocorrência e duração de diarreia infecciosa associada a antibióticos, diminuição da ocorrência de inflamação e dos sintomas associados com doenças inflamatórias do intestino. Além da diminuição de subpopulações de bactérias patogênicas e aumento na produção de AGCC, assim como a melhora da biodisponibilidade e absorção de minerais como o cálcio, o magnésio e o ferro (SLAVIN, 2013; WHISNER *et al.*, 2013).

Os probióticos, dos quais fazem parte as bactérias e leveduras produtoras de ácido láctico, são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro (SANDERS *et al.*, 2014).

Há um número significativo de estudos que avalia a ingestão de probióticos em diferentes condições, o que dificulta a interpretação devido à heterogeneidade dos métodos utilizados e consequentemente os resultados encontrados. O que se deve considerar ainda é que os resultados encontrados, nos diferentes estudos, são decorrentes da ingestão de uma determinada cepa probiótica ou mix de cepas, o que impede que os mesmos sejam extrapolados para outras espécies (CEAPA *et al.*, 2013). Os possíveis mecanismos de ação dos probióticos são: reforço da função da barreira da mucosa intestinal normal; modulação do sistema imunitário; ação antagônica aos agentes patogênicos; estimulação da atividade enzimática e/ou produção de metabólitos benéficos ao hospedeiro (MCFARLAND, 2009).

Os principais benefícios da ingestão de probióticos relatados com base em revisões sistemáticas são: prevenção e tratamento de enterocolite necrotizante (ALFALEH *et al.*, 2011); diminuição da incidência de diarreia associada ao uso de antibióticos (GOLDENBERG *et al.*, 2013); diminuição da duração de doenças infecciosas (APONTE

*et al.*, 2013); regulação do trânsito intestinal (MILLER e OUWEHAND, 2013); alívio dos sintomas da síndrome do intestino irritável (MOAYYEDI *et al.*, 2010); diminuição na incidência de doenças do trato respiratório superior (HAO *et al.*, 2011).

Os principais gêneros de probióticos são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, sendo as principais espécies *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *E. faecalis* e *E. faecium* (FULLER, 1991; FAO/WHO, 2002). Os microrganismos probióticos são fermentativos, e tem como um dos produtos o ácido láctico, além de ser anaeróbico facultativo ou obrigatório. Essas características permitem que os mesmos prevaleçam sobre os microrganismos patogênicos como as gram-negativas, e não produtoras de ácido láctico como a *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, e *Proteus* presentes no trato gastrointestinal (COMMANE *et al.*, 2005; FALONY *et al.*, 2006; THOMAS e GREER, 2010).

A utilização de probióticos com o intuito de melhorar a barreira intestinal tem se mostrado uma estratégia, uma vez que a barreira intestinal desempenha um importante papel na patogênese de doenças do trato gastrointestinal. Além disso, as células epiteliais, por estarem no lúmen do intestino trocam sinais com as moléculas imunitárias subjacentes e com as demais partes do organismo por meio da circulação de moléculas sinalizadoras (IANNITTI e PALMIERI, 2010; SONG *et al.*, 2012; CEAPA *et al.*, 2013).

A bactéria *L. rhamnosus* GG ou um mix de bactérias produtoras de ácido láctico e as Bifidobacterias tem sido relacionada com a melhora da integridade da barreira epitelial, além de interagirem diretamente com as células epiteliais do intestino. As *L. rhamnosus* GG também estão relacionadas com a prevenção de apoptose de células epiteliais *in vitro*, sendo esse efeito devido a ativação do anti-apoptótico Akt e supressão de NF-kB, e com o aumento da secreção de mucina pelas células epiteliais. Como resultado pode-se observar uma diminuição de microrganismos patogênicos e conseqüente manutenção da homeostase (YAN e POLK, 2002; LEBEER *et al.*, 2012; REUNANEN *et al.*, 2012). Um estudo mostrou a relação entre *L. rhamnosus* GG e a estimulação diferencial na expressão de genes envolvidos na reparação tecidual, com a angiogênese, com a resposta da IFN e com a homeostase iônica. Fatores esses importantes para a vascularização e nutrição das células epiteliais (van BAARLEN *et al.*, 2011).

A ingestão de *L. plantarum* tem sido relacionada com alterações nas junções das células epiteliais do intestino delgado, ou seja, há um



aumento na junção da proteína ocludina e das junções de oclusão. Entretanto, a diminuição da integridade dessas junções das células epiteliais pode resultar no aumento da permeabilidade intestinal para macromoléculas e consequente desenvolvimento de doenças como a doença inflamatória intestinal e a síndrome do intestino irritável. Diferentes cepas de probióticos são capazes de induzirem diferentes genes regulatórios e locais da mucosa intestinal (SAWADA *et al.*, 2003; KARCZEWSKI *et al.*, 2010; CEAPA *et al.*, 2013).

A bactéria *L. acidophilus* tem sido relacionada com o aumento da regulação da IL-1 $\beta$  e ativação da cascata de sinalização do NF- $\kappa$ B, a qual pode induzir a transcrição de genes envolvidos na lipogênese e na maturação de células B, com consequente contribuição para a melhora da função da barreira intestinal (van BAARLEN *et al.*, 2011).

A microbiota intestinal esta relacionada com a integridade da barreira intestinal e com o sistema imunológico. Tendo assim, papel central na indução da síntese de imunoglobulina A (IgA) e na manutenção da homeostase das células T regulatórias (Treg), TH1 e TH17 (IVANOV *et al.*, 2009; ROUND e MAZMANIAN, 2010; HOLSCHER *et al.*, 2012; KELLY *et al.*, 2012).

A cepa *L. rhamnosus* HN001, tem se mostrado capaz de modular a imunidade intestinal *in vivo*, por meio do aumento das concentrações de imunoglobulina A secretora (SIgA), contudo, não se sabe ao certo quais são os mecanismos responsáveis por esse aumento. As estirpes *L. casei* Shirota e *L. rhamnosus* Lr23 aparentemente estão relacionadas com a estimulação da produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos (MATSUGUCHI *et al.*, 2003; WICKENS *et al.*, 2012).

A bactéria comensal *Bacteroides fragilis* uma das responsáveis pela produção do polissacarídeo A (PSA), a qual é apresentada as células T CD4+ pelas células dendríticas, induzindo a diferenciação das células T virgens em células TH1 e Treg as quais são responsáveis pela produção apropriada de citocinas nos tecidos de animais livres de germes. Além disso, acredita-se que as alterações nas proteínas das paredes celulares bacteriana podem influenciar na ação dos probióticos. A presença de ácido teicóide nas paredes das bactérias pode auxiliar na proteção de moléculas relevantes e modular a resposta imunitária do meio pela alteração da secreção de citocinas inflamatórias pelas células dendríticas. A família dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) é responsável pela detecção dos padrões moleculares associados aos patógenos (PMAPs) e/ou pela detecção dos padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) do hospedeiro o qual induz a sinalização da imunidade inata. O organismo detecta a presença de danos, devido à

sobrecarga bacteriana, por meio do DAMPs. A resposta desencadeada pode ser manipulada por bactérias como, por exemplo, as do gênero *Bifidobacterium* e do gênero *Lactobacillus*. Isto foi observado em estudos *in vitro* onde se verificou que estes são capazes de influenciar a resposta das células imunitárias circulantes (células mononucleares do sangue periférico - PBMCs) (MAZMANIAN *et al.*, 2005; BRON *et al.*, 2012; ISMAIL *et al.*, 2012).

A heterogeneidade da microbiota entre os sujeitos tem sido mostrada como uma possível causa das diferentes respostas encontradas no tratamento com microrganismos probióticos. Contudo, a influência dos probióticos sobre o sistema imunitário tem sido documentada e confirmada com base em ensaios clínicos (van BOYLE *et al.*, 2008; GIANOTTI *et al.*, 2010; SCHUNTER *et al.*, 2012; BAARLEN *et al.*, 2013).

Além dos prebióticos e probióticos existem os simbióticos, os quais são definidos como um produto que contém tanto os prebióticos quanto os probióticos (THOMAS e GREER, 2010). A combinação de prebiótico com probiótico se justifica pelo fato de que o prebiótico auxiliará na sobrevivência das bactérias probióticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Assim como na estimulação da colonização e no crescimento endógeno de microrganismos no intestino grosso e na regulação da resposta imunitária diminuindo o risco de ocorrência de doença (BENGMARK e MARTINDALE, 2005; SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2007; VITETTA *et al.*, 2012).

O Quadro 2 contém revisões sistemáticas com meta-análise que abordam a suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico em diversas doenças.

Algumas evidências sobre a ocorrência de inflamação intestinal em pacientes com FC são a presença de albumina, IgG, imunoglobulina M (IgM), proteína catiônica eosinofílica, elastase neutrofílica, IL-1 $\beta$  e IL-8 no lavado intestinal de crianças, além de ter sido encontrado um aumento na infiltração de células mononucleares em amostra da mucosa do duodeno e um aumento na expressão de IL-2, IFN- $\gamma$  e nos receptores de transferrina (RAIA *et al.*, 2000; SMYTH *et al.*, 2000).

A suplementação com prebióticos, probióticos e simbióticos tem se mostrado efetiva em casos de doenças inflamatórias intestinais e alguns estudos com pacientes com FC (Quadro 3). Os estudos estão sendo realizados não só em casos de doenças a nível intestinal, mas também a nível respiratório.



**Quadro 2** – Estudos de revisões sistemáticas com meta-análise que abordam a suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico em diversas doenças (Continua).

Referência	População	Intervenção	Duração	Resultados
Lohner <i>et al.</i> (2014)	Lactentes e crianças menores de 2 anos de idade saudáveis. n = 1.404	Prebiótico - GOS; FOS; polidextrose; oligofrutose.	6 a 12 meses	O número de episódios de infecções que necessitam de antibioticoterapia diminuiu (razão de taxa: 0,68; IC95% 0,61 - 0,77).
Srinivasjois <i>et al.</i> (2013)	Prematuros ≤ 37 semanas de gestação. n = 417	Prebiótico - oligossacarídeo	14 a 30 dias	Com relação à suplementação de prebiótico e a incidência de enterocolite necrotizante não foi encontrada diferença.
Dang <i>et al.</i> (2013)	Gestantes e/ou recém-nascidos. n = 2.550	Prebiótico e probiótico – oligossacarídeos; FOS; polidextrose; GOS; lactulose; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Bifidobacterium</i> ; <i>Propionibacterium</i> .	2 a 24 meses	O uso de prebiótico não resultou em alteração, porém houve uma diminuição de 31% no risco de desenvolver eczema após uso de probiótico. Quando suplementado com um mix de cepas probióticas a diminuição do risco foi de 42%.
Hempel <i>et al.</i> (2012)	Adultos em uso de antibióticos. n = 11.811	Probióticos – <i>Lactobacillus</i> ; <i>Saccharomyces</i> ; <i>Bacillus</i> ; <i>Bifidobacterium</i> ; <i>Streptococcus</i> ; <i>Enterococcus</i> .	Cerca de 6 a 20 dias	A incidência de diarreia associada ao uso de antibióticos diminuiu em 42%.

GOS: Galacto-oligossacarídeos; FOS: fructo-oligossacarídeos.

**Quadro 2** – Estudos de revisões sistemáticas com meta-análise que abordam a suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico em diversas doenças (Conclusão).

Referência	População	Intervenção	Duração	Resultados
Johnston <i>et al.</i> (2012)	Pacientes adultos ou pediátricos tratados com antibióticos. n = 3.818	Probióticos - <i>Lactobacillus</i> ; <i>Saccharomyces</i> ; <i>Bifidobacterium</i> .	3 a 14 dias	O risco de ocorrência de diarreia associada à <i>Clostridium difficile</i> diminuiu em 66%.
Pelucchi <i>et al.</i> (2012)	Gestantes e/ou recém-nascidos. n = 179	Probióticos - <i>Lactobacillus</i> ; <i>Bifidobacterium</i> ; <i>Propionibacterium</i> .	3 meses a 24 meses	A incidência de dermatite atópica diminuiu em 21%.
Shukla <i>et al.</i> (2011)	Adultos com cirrose. n = 349	Prebiótico, probiótico e simbiótico - Fibra bio-ativa e fermentável (beta glucano; inulina; pectina; amido resistente); Lactulose; <i>Pediococcus</i> ; <i>Leuconostoc</i> ; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Bifidobacterium</i> ; <i>Saccharomyces</i> ; <i>Escherichia</i> .	2 a 24 meses	A utilização de prebiótico foi associada com uma diminuição do risco de desenvolver encefalopatia hepática em 67%. Uso de probióticos e simbióticos foram associados com uma diminuição de 60% e 50% no risco de nenhuma melhoria da encefalopatia hepática respectivamente.
Hao <i>et al.</i> (2011)	Todas as idades. n = 3.451	Probióticos - <i>Lactobacillus</i> ; <i>Bifidobacterium</i> ; <i>Saccharomyces</i> ; <i>Propionibacterium</i> .	2 a 8 meses	Episódio de infecções agudas do trato respiratório superior diminuiu em 42% e 33% na prescrição de antibióticos.
Alfaleh <i>et al.</i> (2011)	Recém-nascidos prematuros. n = 2.842	Probióticos - <i>Lactobacillus</i> ; <i>Bifidobacterium</i> ; <i>Saccharomyces</i> .	2 a 6 semanas	A incidência de enterocolite necrosante grave diminuiu em 65% e em 60% na mortalidade infantil.

**Quadro 3** – Estudos que avaliam a suplementação com prebiótico, probiótico ou simbiótico em pacientes com FC (Continua).

Autor(es)/ Ano	Delineamento	Amostra	Suplemento	Resultados
Bruzzese <i>et al.</i> (2004)	Estudo prospectivo controlado.	Crianças e adolescentes (1 a 16 anos idade). 1ª fase: n = 30 pacientes com FC; n = 30 controles sem doença; n = 15 com DII. 2ª fase: n = 20 pacientes com FC; n = 20 controles sem doença; n = 15 pacientes com DII.	L. GG	Calprotectina fecal foi maior no grupo FC (p < 0,01) e no grupo com DII (p < 0,05) em relação ao GC. A produção média de NO está aumentada nos grupos FC (p < 0,01) e DII (p < 0,05). As concentrações de calprotectina e de NO fecal diminuíram após a administração do L.GG.
Bruzzese <i>et al.</i> (2007)	Estudo prospectivo, controlado por placebo, cruzado e randomizado.	n = 38 crianças e adolescentes com FC (5 e 18 anos de idade).	L.GG Controle: SRO	Grupo L.GG teve menos exacerbações pulmonares (p = 0,003) e internações hospitalares (p = 0,001) em comparação com o grupo SRO. L.GG resultou em um aumento no VEF1 (p = 0,020) e peso (p = 0,020).
Infante Pina <i>et al.</i> (2008)	-	n = 20 pacientes com FC (5 a 17 anos de idade).	L. GG	5 pacientes apresentaram crescimento excessivo de bactérias. Foi observada uma correlação positiva entre o teste do hidrogênio e a esteatorréia (r = 0,57) e a presença de açúcar nas fezes (r = 0,52).
Weiss <i>et al.</i> (2010)	Estudo piloto prospectivo.	n = 10 pacientes com FC (média de idade 26,2 ± 12,9 anos) e doença pulmonar leve a moderada e colonização por <i>P. aeruginosa</i> .	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>S. thermophiles</i> .	A taxa de exacerbação foi menor em comparação com os últimos 2 anos e 6 meses pós-tratamento (p = 0,002). Os testes de função pulmonar não mudaram no final do tratamento e 6 meses pós-tratamento.

FC: Fibrose cística; GC: Grupo controle; FC: Fibrose cística; DII: Doença inflamatória intestinal; L.GG: *Lactobacillus rhamnosus*; NO: Óxido nítrico; SRO: Solução de reidratação oral; VEF1: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; *Pseudomonas aeruginosa*: *P. aeruginosa*; *Lactobacillus acidophilus*: *L. acidophilus*; *Lactobacillus bulgaricus*: *L. bulgaricus*; *Bifidobacterium bifidum*: *B. bifidum*; *Streptococcus thermophiles*: *S. thermophiles*.

**Quadro 3** - Estudos que avaliam a suplementação com prebiótico, probiótico ou simbiótico em pacientes com FC (Conclusão).

Autor(es)/Ano	Delineamento	Amostra	Suplemento	Resultados
Fallahi <i>et al.</i> (2013)	Estudo controlado, duplo-cego e randomizado.	GSFC, n = 47 pacientes (idade média de 8,56 ± 4,19 anos); GPFC = 23 pacientes (idade média de 8,65 ± 3,29 anos).	FOS, <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. breve</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. infantis</i> e <i>L. bulgaricus</i> .	31 dos 47 pacientes com FC (65,9%) apresentaram níveis de calprotectina fecal anormal (> 50 µg/g). Após a intervenção, as concentrações de calprotectina fecais diminuíram em 21 pacientes do GSFC e em 8 pacientes do GPFC ( $p < 0,001$ ).
Jafari <i>et al.</i> (2013)	Ensaio clínico, controlado, randomizado.	GFC, n = 37 pacientes (2 a 12 anos de idade). GSFC, n = 20. GPFC, n = 17.	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i>	Melhora significativa no escore total médio na qualidade de vida entre os pacientes do GSFC em comparação com o GPFC no 3º mês ( $p = 0,01$ ), não sendo significativo no 6º mês de tratamento com probiótico. A taxa de exacerbação pulmonar foi menor no GSFC ( $p < 0,01$ ).
Del Campo <i>et al.</i> (2014)	Estudo prospectivo, duplo cego, cruzado, com placebo.	GFC, n = 30 pacientes (idade média de 17,7 anos).	L.R	Melhora na saúde gastrointestinal e diminuição das concentrações de anticalprotectina e da densidade bacteriana total, e um aumento da diversidade microbiana após a ingestão do probiótico, em comparação com o GPFC.
Di Nardo <i>et al.</i> (2014)	Estudo prospectivo, duplo-cego, com placebo.	GFC, n = 61 pacientes (6 a 29 anos de idade) com doença pulmonar leve a moderada.	L.R	Diminuição das exacerbações pulmonares ( $p < 0,01$ ), e do número de infecções do trato respiratório superior ( $p < 0,05$ ) no GSFC em comparação com o GPFC.

FC: Fibrose cística; GSFC: Grupo suplemento fibrose cística; GPFC: Grupo placebo fibrose cística; FOS: Frutooligossacarídeo; Lactobacillus casei: L. casei; L.R: L. reuteri; DII: Doença inflamatória intestinal; L.GG: Lactobacillus rhamnosus; NO: Óxido nítrico; SRO: Solução de reidratação oral; VEF1: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; Lactobacillus acidophilus: L. acidophilus; Lactobacillus bulgaricus: L. bulgaricus; Bifidobacterium breve: B. breve; Bifidobacterium bifidum: B. bifidum; Bifidobacterium infantis: B. infantis; Streptococcus thermophilus: S. thermophilus.





### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com simbiótico nos marcadores da resposta inflamatória sistêmica e a composição da microbiota intestinal de crianças e adolescentes com fibrose cística.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nas crianças e adolescentes com fibrose cística:

- O efeito do simbiótico sobre os marcadores da função pulmonar e estado nutricional.
- O efeito do simbiótico sobre os marcadores inflamatórios (IL-12, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , MPO e NOx).
- A composição da microbiota intestinal e a inflamação intestinal pela calprotectina
- .
- A associação da composição da microbiota intestinal e a antibioticoterapia.
- A associação do tipo de parto, do tipo de aleitamento materno, introdução de alimentação complementar e do índice de massa corporal com a composição da microbiota intestinal e a inflamação intestinal.



#### 4 JUSTIFICATIVA, RELEVÂNCIA, ORIGINALIDADE E CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO

Considerando que a principal causa da lesão pulmonar na FC é a inflamação persistente, é essencial o entendimento da resposta inflamatória nesta doença. A presença de inflamação promove o catabolismo proteico e consequente perda de peso, portanto, estes dados poderão auxiliar na análise da relação com o estado nutricional. A desnutrição pode tanto ser decorrente de um processo inflamatório intenso, como de uma diminuição do consumo alimentar, devido à supressão do apetite, ocasionada por alterações de alguns marcadores inflamatórios.

Alguns estudos têm mostrado efeitos da utilização de probióticos em pacientes com FC, como a diminuição da concentração de marcadores pró-inflamatórios, e de episódios de exacerbação pulmonar e melhora da função intestinal (BRUZZESE *et al.*, 2004; BRUZZESE *et al.*, 2007; PINA *et al.*, 2008; WEISS *et al.*, 2010). Contudo, estudos que avaliam a suplementação com simbiótico nessa população são escassos. Além disso, conhecer a composição da microbiota intestinal assim como a presença de inflamação intestinal nessa população é necessário de forma a auxiliar na tomada da decisão com relação a suplementação com simbiótico. Acredita-se que a suplementação possa desempenhar ação adjuvante no processo terapêutico, considerando que a mesma pode estimular seletivamente o crescimento e/ou actividade das bactérias intestinais, diminuir a gravidade da gastroenterite aguda, melhorar a função intestinal, atenuar a inflamação, reduzir a exacerbação pulmonar e consequentemente atuar na melhora dos indicadores clínicos e nutricionais em pacientes com FC.

Este estudo irá avaliar o efeito da suplementação com simbiótico (FOS, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *B. lactis*) sobre os marcadores da resposta inflamatória sistêmica (IL-12, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , MPO e NOx) e a composição da microbiota intestinal de crianças e adolescentes com fibrose cística.

Na maioria dos estudos, os marcadores pró-inflamatórios são analisados no local da resposta inflamatória, tal como na lavagem broncoalveolar, na expectoração, no condensado do ar exalado, e na biópsia endobrônquica. A combinação avaliada dos marcadores imunológicos (IL-12, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , MPO e NOx) neste estudo, poderá mostrar a amplitude da resposta inflamatória sistêmica, além de permitir que esta avaliação, por ser no soro, possa ser

realizada em pacientes com FC, em diferentes idades e estágios da doença pulmonar.

Espera-se com este estudo que a suplementação com o simbiótico (FOS, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *B. lactis*) possa melhorar o balanço entre os marcadores pró e antiinflamatórios em nível sistêmico, além de avaliar a composição da microbiota intestinal e a presença ou não de inflamação intestinal nos pacientes com FC.

## 5 MÉTODOS

### 5.1 ETAPAS DA PESQUISA

O estudo incluiu duas etapas distintas, sendo que na ETAPA 1 foi avaliado o efeito da suplementação com simbiótico sobre os marcadores da resposta inflamatória e na ETAPA 2 foi avaliado a composição da microbiota intestinal e a inflamação intestinal ambos em crianças e adolescentes com fibrose cística. O estudo recebeu financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 471197/2013-0.

#### **5.1.1 ETAPA 1: Avaliação da suplementação com simbiótico sobre os marcadores da resposta inflamatória**

##### 5.1.1.1 Desenho do estudo

Ensaio clínico, randomizado, duplo cego, controlado por placebo com crianças e adolescentes com fibrose cística (FC) em seguimento clínico no Ambulatório de FC do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), Florianópolis/SC, Brasil.

##### 5.1.1.2 Aspectos éticos do estudo e financiamento

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Santa Catarina (#48959715.2.1001.0121) e do HIJG/SC (#029/2012) e está registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (RBR-5BYRSC). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelos responsáveis das crianças e adolescentes, que também concordaram em participar do estudo (APÊNDICE A). O pesquisador manteve contato com os sujeitos e responsáveis durante o estudo por meio de ligações telefônicas.

##### 5.1.1.3 Sujeitos

O HIJG é referência no estado de Santa Catarina no tratamento de crianças e adolescentes com até 15 anos de idade com FC, sendo que no ano de 2013 foram atendidos periodicamente 92 pacientes com FC de todo o estado de Santa Catarina. Desta forma, a amostra foi não probabilística, de conveniência composta por todos os pacientes atendidos no hospital que atendiam aos critérios de inclusão. Com base

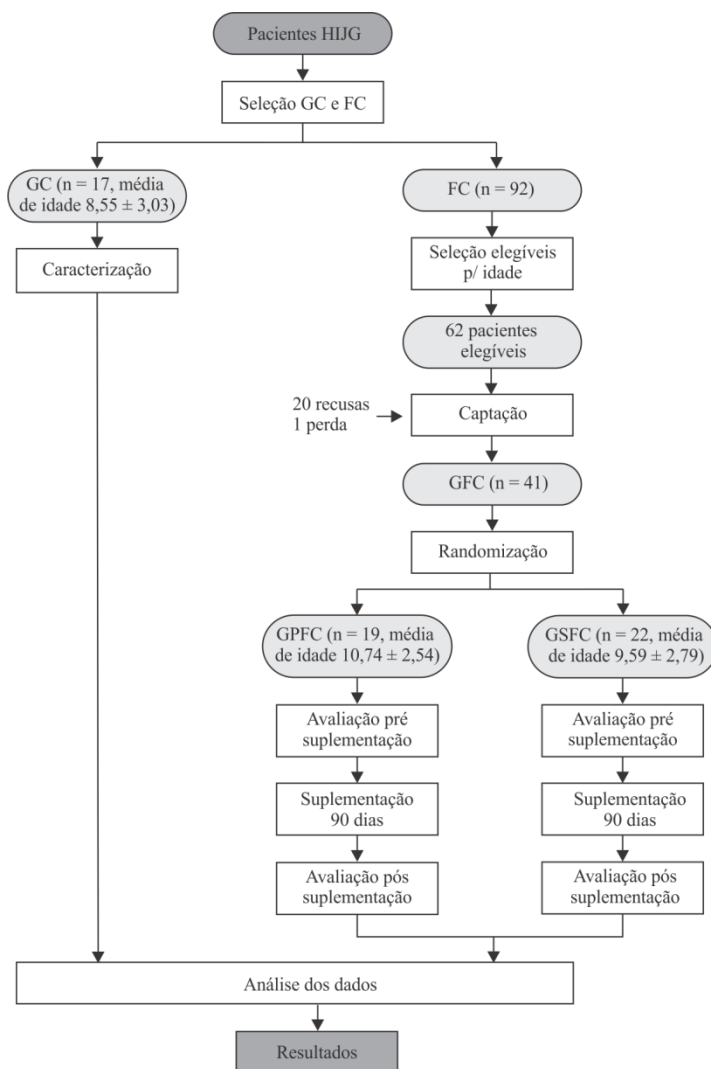
nos critérios de inclusão 62 pacientes eram elegíveis, sendo que desse total, 20 se recusaram a participar do estudo e um veio a óbito. Os 41 pacientes que participaram do estudo foram acompanhados por um período de 90 dias (Figura 2). Para fins de comparação participaram do estudo crianças e adolescentes sem fibrose cística com idade  $\geq 6$  e  $\leq 15$  anos totalizando 17 sujeitos atendidos no ambulatório de puericultura do HIJG (Figura 2).

A amostra foi constituída por crianças e adolescentes ( $\geq 6$  anos e  $\leq 15$  anos de idade), de ambos os sexos e randomizada em dois grupos: grupo placebo fibrose cística (GPFC) e o grupo simbiótico fibrose cística (GSFC). Na sequência os grupos foram subdivididos em bacteriologia negativa (ausência de microrganismos patogênicos para FC) e bacteriologia positiva (presença de um ou mais microrganismos patogênicos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Burkholderia cepacia*).

Os critérios de inclusão para o GC foram: crianças e adolescentes  $\geq 6$  anos e  $\leq 15$  anos de idade; sem diagnóstico de FC e estáveis clinicamente pelo menos 30 dias antes da coleta dos dados. Enquanto que para o GPFC e o GSFC foram: crianças e adolescentes  $\geq 6$  anos e  $\leq 15$  anos de idade; ter diagnóstico de FC, inclusive baseado no teste do suor (cloreto no suor  $\geq 60$  mmol/L); estáveis clinicamente pelo menos 30 dias antes da coleta dos dados.

Os critérios de exclusão para todos os grupos (GC, GPFC e GSFC): sujeitos com febre, trauma, doenças inflamatórias (asma, doença inflamatória intestinal, doença reumática), psiquiátricas, degenerativas, cardiovasculares, diabetes, intolerância à glicose, insuficiência renal, imunodeficiência primária ou secundária. Sujeitos em uso de antibióticos no início do estudo, hormônios, fármacos antiinflamatórios não hormonais, imunossupressores, anti-histamínicos, prebióticos, probióticos e simbióticos, até 30 dias antes da coleta de dados, em exacerbação pulmonar, definida como a presença de pelo menos três dos seguintes sintomas: 1) tosse aumentada; 2) produção de esputo aumentada e/ou alteração na aparência do esputo; 3) febre  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  na semana anterior/mais de uma vez, por pelo menos 4 horas durante 24 horas; 4) frequência respiratória aumentada e/ou dificuldade de respirar (identificada por chiados, crepitação ou respiração ofegante); 5) tolerância reduzida aos exercícios; 6) redução no  $\text{VEF}_1 \geq 10\%$  do valor anterior dentro dos últimos 3 meses; 7) absenteísmo da escola devido à doença; 8) perda de peso  $\geq 1$  kg ou 5% do peso corporal, associada à anorexia e ingestão reduzida da dieta.

**Figura 2** – Seleção e randomização do grupo controle (GC), do grupo placebo fibrose cística (GPFC) e do grupo simbiótico fibrose cística (GSFC).



HIJG: Hospital Infantil Joana de Gusmão; GC: Grupo controle; GFC: Grupo fibrose cística; GPFC: Grupo placebo fibrose cística; GSFC: Grupo simbiótico fibrose cística.

Os grupos GPFC e GSFC foram avaliados em dois momentos: basal e final, conforme detalhamento a seguir enquanto que o GC foi avaliado em apenas um momento.

**Basal: Pré-suplementação:** Caracterizado pela identificação dos indivíduos, coleta das amostras sanguíneas para avaliação das concentrações dos marcadores séricos, avaliação antropométrica, de composição corporal, funcional e de consumo alimentar. Neste momento, os indivíduos foram orientados a comparecer ao Laboratório do HIJG, Ciência Laboratório Médico Ltda<sup>®</sup> para coleta de sangue e realização das análises clínicas.

**Final: Pós-suplementação:** Após 90 dias de suplementação foram repetidos os exames referentes à avaliação das concentrações dos marcadores séricos, avaliação antropométrica, de composição corporal e funcional realizados no período de pré-suplementação. Os indivíduos foram orientados a comparecer ao Laboratório do HIJG para a coleta de sangue e realização das análises clínicas. Neste momento, ambos os grupos (GPFC e GSFC) cessaram a ingestão dos suplementos.

A suplementação diária como parte do protocolo foi levada em consideração e a ingestão do suplemento foi determinada com base no relato dos pacientes. O protocolo médico hospitalar prescreve os seguintes suplementos: suplemento vitamínico Source CF<sup>®</sup> (Eurand Pharmaceuticals, Huntsville, Alabama, EUA) para pessoas com  $\geq 1$  ano até  $< 4$  anos, 2 mL/dia; Dose de ADEK<sup>®</sup> (Axcan Pharma/Birmingham/Alabama/EUA) de um comprimido por dia para aqueles com  $\geq 4$  a  $< 10$  anos e dois comprimidos por dia para aqueles com idade  $\geq 10$  anos (BOROWITZ *et al.*, 2002); CREON<sup>®</sup>-Solvay/Pharmaceuticals/GmbH/Alemanha) para crianças e adolescentes, que necessitam de 500-4.000 unidades de lipase por grama de gordura ingerida (média = 1.800 unidades de lipase/g de gordura) (LAHIRI *et al.*, 2016).

Um formulário para a coleta dos dados foi criado e preenchido tanto no momento pré-suplementação quanto no pós-suplementação (APÊNDICE B).

#### 5.1.1.4 Suplementação alimentar

Os dois grupos (GPFC e GSFC) receberam suplementação, sendo que o GPFC recebeu a maltodextrina e o GSFC o simbiótico. Como forma de assegurar uma distribuição igual do número de participantes nos grupos FC e garantir que os grupos fossem similares foi realizada uma randomização por blocos e estratificada por sexo e idade. O



programa utilizado para gerar números aleatórios foi o Research Randomizer Form v4.0 (URBANIÁK. e PLOUS, 2013). As embalagens de ambos os suplementos eram idênticas exceto pela cor, a qual distinguia o placebo (maltodextrina) do simbiótico. Os suplementos foram, entregues por um colaborador da pesquisa como forma de garantir o cegamento.

Ofertou-se 6 g de maltodextrina obtida comercialmente (Maison de La Santé, Farmácia de Manipulação, Florianópolis, SC, Brasil). O simbiótico oferecido foi obtido comercialmente (Lactofos<sup>®</sup>, SKL Functional Nutrition, São Paulo, Brasil) e era uma associação de FOS e quatro cepas probióticas: *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *B. lactis*.

A maltodextrina e o simbiótico fornecidos aos participantes foi denominado suplemento alimentar e entregue em embalagem lacrada no início da pesquisa. Os participantes foram orientados que os suplementos, oferecidos na forma de pó, deveriam ser diluídos em água e ingeridos uma vez ao dia, no período da manhã de preferência em jejum ou duas horas depois da refeição, tomando o cuidado de diluir em líquidos frios. As instruções detalhadas sobre a ingestão dos produtos foram entregues junto com os suplementos (APÊNDICE C).

A quantidade de FOS e as concentrações das cepas probióticas oferecidas diariamente encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1** – Caracterização do suplemento simbiótico.

	<b>Quantidade em 6g (1 sachê)</b>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	10 <sup>8</sup> a 10 <sup>9</sup> UFC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	10 <sup>8</sup> a 10 <sup>9</sup> UFC
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10 <sup>8</sup> a 10 <sup>9</sup> UFC
<i>Bifidobacterium lactis</i>	10 <sup>8</sup> a 10 <sup>9</sup> UFC
Frutooligossacarídeos (FOS)	5,5g

Fonte: Rótulo do suplemento simbiótico (Lactofos<sup>®</sup>, SKL Functional Nutrition, São Paulo, Brasil)

Os participantes e os responsáveis foram questionados pelos pesquisadores quanto ao consumo dos mesmos por meio de ligações telefônicas feitas a cada 15 dias. Foi solicitado que os participantes mantivessem a sua dieta habitual durante o período de intervenção e, que evitassem o consumo de alimentos que contenham prebiótico e probióticos, durante a realização do estudo, sendo fornecida uma lista com exemplo destes alimentos (APÊNDICE C).

### 5.1.1.5 Avaliação clínica

A avaliação dos indivíduos foi realizada por meio da coleta dos seguintes dados: número de exacerbações pulmonares, avaliação do apetite do indivíduo, efeitos adversos (borborigmo, diarreia, constipação, vômito, regurgitação, náuseas e flatulência), incidência de infecções (avaliação por meio de informações clínicas e de exames laboratoriais de rotina), necessidade e duração da antibioticoterapia (tipo de antibiótico) utilizado durante a participação no estudo. Também foi avaliada a aceitação e a tolerância aos suplementos (adequação do uso segundo as recomendações, sensação agradável, desagradável ou indiferente durante o uso) no momento da coleta final (APÊNDICE D).

### 5.1.1.6 Determinação bacteriológica

As amostras de escarro expectorado foram obtidas pela manhã com os pacientes em jejum de 10 horas, tendo o paciente sido orientado para higiene oral apenas com água. O material foi processado logo após a coleta, segundo metodologia de Gilligan, Kiska e Appleman (2006) e em seguida, avaliado microscopicamente (NIKON E200, Chiyoda, Tóquio, Japão) pelo método de Gram (GILLIGAN *et al.*, 2006). Os homogeneizados formados a partir de 0,5 ml da porção purulenta do escarro adicionado a 1 mL de solução salina estéril foram inoculados em placas individuais contendo ágar sangue de carneiro (Oxoid, São Paulo, Brasil), ágar chocolate suplementado com 0,1% de extrato de levedo (Oxoid, São Paulo, Brasil) e com 20 µg/mL de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA), ágar Mack Conkey (Oxoid, São Paulo, Brasil), meio seletivo para "*B. cepacia*" (Oxoid, São Paulo, Brasil) e ágar Manitol (Oxoid, São Paulo, Brasil). A placa de ágar chocolate foi incubada em sistema de microaerofilia. As placas restantes foram incubadas em aerobiose, em estufa, a 37°C. As placas foram examinadas, por meio da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), após 48 horas, mantidas à temperatura ambiente e reexaminadas (nova contagem das UFC) após 96 horas do tempo inicial. A indicação de presença de infecção para FC foi realizada a partir da contagem das UFC ( $\geq 10^5$  UFC/mL de um patógeno) (GILLIGAN *et al.*, 2006). Este exame foi realizado pelo Laboratório prestador de serviços ao HIJG Ciência Laboratório Médico Ltda®, Florianópolis, SC.

### 5.1.1.7 Avaliação do hábito intestinal

Com a finalidade de verificar a tolerância aos suplementos foram perguntadas questões referentes à frequência e consistência das fezes, avaliadas por meio da escala de Bristol adaptada e validada para crianças (LANE *et al.*, 2011) (ANEXO A) (Formulário – APÊNDICE E) (1: pedaços separados, 2: forma de salsicha segmentada, 3: forma de salsicha com fendas, 4: forma de salsicha lisa e mole, 5: pedaços moles, 6: pedaços aerados, 7: aquosa) (LANE *et al.*, 2011). Os sintomas gastrointestinais (excesso de flatulência no reto, distensão abdominal, borborismos e dores abdominais), foram avaliados por meio de uma escala de quatro pontos (1: nenhum, 2: leve, 3: moderado, 4: grave) (BOUHNİK *et al.*, 1997) (APÊNDICE F).

### 5.1.1.8 Avaliação do estado nutricional

#### 5.1.1.8.1 Atropometria

As medidas antropométricas foram realizadas de acordo com a metodologia proposta pela *World Health Organization* (WHO, 1995) por um nutricionista treinado. Para aferição do peso foi utilizada balança digital BK 50 F (Balmak®, Santa Bárbara d'Oeste, São Paulo, Brasil), com capacidade máxima de 150 kg e resolução de 0,1 kg. O paciente foi pesado em jejum, com a bexiga vazia, sem sapatos e com roupas leves (WHO, 1995). A estatura foi verificada por meio de um antropômetro (Alturaexata®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), com escala de precisão de 0,1 cm. O paciente foi posicionado sobre a base do antropômetro, estando descalço, ereto, com o peso do corpo distribuído igualmente sobre ambos os pés, colocando as superfícies posteriores dos calcanhares, as nádegas e a região occipital em contato com a escala de medida e com a cabeça orientada de modo que a linha de visão fique perpendicular ao corpo, ou seja, paralela ao solo. O avaliado foi orientado a inspirar profundamente e, em apnéia respiratória, foi mensurada a estatura em metro e com uma aproximação de 0,1 cm. A referência para a mensuração foi o ponto mais alto da cabeça com pressão suficiente para comprimir o cabelo (WHO, 1995).

O estado nutricional foi classificado com base nos critérios WHO (WHO, 2006), usando escores z de altura para idade (z-E/I), peso-para-idade (z-P/I) e o índice de massa corporal para a idade (z-IMC/I).

#### 5.1.1.8.2 Composição corporal

As medidas das dobras cutâneas foram realizadas segundo a metodologia da WHO (1995), no lado direito do corpo, com o sujeito disposto em posição ereta. As dobras cutâneas foram aferidas utilizando o Compasso de Dobras Cutâneas *Lange skinfold caliper*<sup>®</sup> (Beta Technology Corporated - Santa Cruz, Califórnia, EUA), com aproximação de 0,5 mm. A dobra cutânea triceptal (DCT) e a dobra cutânea bicipital (DCB) foram pinçadas no ponto médio do braço, sendo a DCB na face anterior e a DCT na posterior. A dobra cutânea sub-escapular (DCSE) foi pinçada abaixo do ângulo inferior da escápula direita, aproximadamente a 45° do plano horizontal, e a dobra cutânea supra-íliaca (DCSI) foi obtida obliquamente em relação ao eixo longitudinal, na metade da distância entre o último arco costal e a crista íliaca, sobre a linha axilar medial. A circunferência do braço (CB) foi obtida no ponto médio lateral entre o ponto acromial da escápula e o olécrano da ulna com uma fita métrica inelástica, com aproximação de 0,1 centímetros. O sujeito foi orientado a permanecer de pé, com os braços estendidos livremente próximos ao corpo e com as palmas voltadas para as coxas. Para todas as medidas foram realizadas três aferições, sendo utilizada a média para as análises.

Para a estimativa do percentual de gordura corporal (%GC) foram utilizadas as fórmulas propostas por Weststrate e Deurenberg (1989) de acordo com o sexo e faixa etária (zero à 16 anos), a partir da somatória das quatro dobras cutâneas (DCB, DCT, DCSE e DCSI), que reflete uma relação entre o percentual de gordura e a densidade corporal. As fórmulas utilizadas para o cálculo da densidade corporal e do %GC estão descritas no Quadro 4.

A área muscular do braço (AMB) e a área gordurosa do braço (AGB) foram calculadas de acordo com as fórmulas propostas por Frisancho (1981) em z-escore, por meio do programa Siscred Crescimento e Desenvolvimento (Campinas, São Paulo, Brasil).

**Quadro 4** – Equações para o cálculo da Densidade Corporal e Percentual de Gordura Corporal.

<b>Densidade Corporal (D)</b>
<b>Meninos e meninas de 0 até menores de 2 anos</b>
$D = \{0,0016 (\text{idade em meses})^{0,5}\} - [0,0719 \times \log (\Sigma 4 \text{ dobras})]$
<b>Meninos de 2 até 16 anos</b>
$D = [1,1315 + 0,0018 (\text{idade em anos} - 2)] - [0,0719 - 0,0006 (\text{idade em anos} - 2)] \times \log (\Sigma 4 \text{ dobras})$
<b>Meninas de 2 até menores de 11 anos</b>
$D = [1,1315 + 0,0004 (\text{idade em anos} - 2)] - [0,0719 - 0,0003 (\text{idade em anos} - 2)] \times \log (\Sigma 4 \text{ dobras})$
<b>Meninas de 11 até 16 anos</b>
$D = [1,1315 + 0,0031 (\text{idade em anos} - 10)] - [0,0719 - 0,0003 (\text{idade em anos} - 2)] \times \log (\Sigma 4 \text{ dobras})$
<b>Percentual de Gordura Corporal (%GC)</b>
<b>Meninos e meninas de 0 até menores de 2 anos</b>
$\%GC = \{[585 - 4,7 (\text{idade em meses})^{0,5}] / D\} - [550 - 5,1 (\text{idade em meses})^{0,5}]$
<b>Meninos de 2 até 16 anos</b>
$\%GC = \{[562 - 4,2 (\text{idade em anos} - 2)] / D\} - [525 - 4,7 (\text{idade em anos} - 2)]$
<b>Meninas de 2 até menores de 10 anos</b>
$\%GC = \{[562 - 1,1 (\text{idade em anos} - 2)] / D\} - [525 - 1,4 (\text{idade em anos} - 2)]$
<b>Meninas de 10 até 16 anos</b>
$\%GC = \{[553 - 7,3 (\text{idade em anos} - 10)] / D\} - [514 - 8,0 (\text{idade em anos} - 10)]$

$\Sigma 4$  dobras = somatório das dobras cutâneas bicipital, tricípital, subescapular e supra-iliaca.

Fonte: Weststrate e Deurenberg (1989).

### 5.1.1.8.3 Triagem nutricional

Neste estudo foi aplicada a ferramenta de triagem de risco nutricional a qual contém informações referentes a três categorias: ganho de peso, velocidade de crescimento e IMC (MCDONALD, 2008). Em seguida são dadas pontuações conforme as recomendações propostas pela Fundação Americana de Fibrose Cística. Pontuações de 0 a 1 equivalem a baixo ou nenhum risco; escores de 2 a 3 refletem risco

moderado; e escore igual ou superior a 4, alto risco (ANEXO B). Em casos de crianças com idade igual ou superior a 10 anos, o instrumento requer a avaliação de maturação sexual. Para tal, foi utilizado, de acordo com o recomendado pela própria triagem, a avaliação auto administrada (TANNER, 1975), validada previamente, por meio da utilização de figuras ilustrativas em que o próprio paciente aponta seu grau de maturação (MORRIS e UDRY, 1980) (ANEXO B).

#### 5.1.1.9 Avaliação do consumo alimentar

O consumo alimentar foi avaliado com o intuito de conhecer o hábito alimentar das crianças e adolescentes com relação ao consumo de alimentos que contenham prebiótico, probiótico ou simbiótico. Este foi avaliado por meio do questionário de frequência de consumo alimentar (QFA) de acordo com a faixa etária dos pacientes. Para as crianças com idade entre 6 a 10 anos foi utilizado o QFA adaptado e validado para essa faixa etária (PINTO, 2009) (ANEXO C), assim como QFA para avaliar o consumo alimentar em adolescentes com a faixa etária de 11 a 15 anos de idade (VOCI, 2006) (ANEXO D).

O QFA foi conduzido por um nutricionista treinado, o qual questionou os responsáveis pelas crianças e/ou adolescentes com relação ao consumo alimentar nos últimos 3 meses. O QFA foi realizado apenas no momento basal para avaliar o consumo anterior dos participantes e utilizar o valor referente ao consumo energético nas análises estatísticas.

#### 5.1.1.10 Escore de Shwachman-Kulczycki

O escore de Schwachman-Kulczycki foi utilizado para classificar a gravidade da doença. O escore pontua as atividades gerais, exame clínico, estados nutricionais e achados radiológicos. Cada item apresenta o mesmo peso (vinte e cinco pontos) e o total de cem pontos representa o escore perfeito. O estado do paciente foi considerado “excelente” quando o escore foi igual ou acima de 86, “bom” quando o escore estiver entre 71 e 85, “médio” entre 56 e 70, “moderado” entre 41 e 55, e “grave” quando foi igual ou inferior a 40 (SHWACHMAN e KULCZYCKI, 1958) (ANEXO C).

#### 5.1.1.11 Avaliação da função pulmonar

O exame de capacidade da função pulmonar, espirometria, foi realizado pela equipe de enfermagem do HIJG. O equipamento utilizado

foi o espirômetro (Puritan-Bennett Corporation®), modelo *Renaissance Spirometry System* (Wilmington, Carolina do Norte, Estados Unidos da América). A metodologia para a realização do exame e classificação da função pulmonar foi realizado conforme PELLEGRINO *et al.* (2005). O estudo utilizou os valores do VEF<sub>1</sub> para classificar a obstrução pulmonar. O resultado foi considerado na média quando maior ou igual a 70%, moderado entre 60-69%, moderadamente grave entre 50-59%, grave entre 35-49% e muito grave quando menor que 35%.

#### 5.1.1.12 Amostras biológicas

A coleta de sangue foi realizada pelo laboratório prestador de serviços ao HIJG, Ciência Laboratório Médico Ltda®, com os indivíduos em jejum de 10 horas. O sangue foi coletado na veia cubital com seringas e agulhas descartáveis em tubos adequados por um profissional capacitado.

##### 5.1.1.8.12.1 Hemograma

O hemograma foi analisado no sangue total pelo método semi-automatizado. Os valores de referência utilizados para as hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, neutrófilos segmentados e linfócitos foram com base na literatura (WALLACH *et al.*, 2013). Todas as análises foram realizadas com o equipamento Cobas Mira (Roche®, Rio de Janeiro, Brasil). Este exame foi realizado no Laboratório Ciência Laboratório Médico Ltda®, Florianópolis, SC.

##### 5.1.1.8.12.2 Análise dos marcadores inflamatórios

As amostras de sangue foram centrifugadas à 2.500 rpm por 10 minutos para obtenção do soro. Após a centrifugação, as amostras de soro foram transferidas para frascos do tipo *eppendorfs*, devidamente identificados e congeladas a -80°C para posterior análise de cada marcador inflamatório.

As concentrações séricas de IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 e IL-8 foram determinadas por meio da citometria de fluxo usando o kit de citocinas inflamatórias Cytometric Bead Array comerciais em um citômetro de fluxo FACS Canto II da BD-Biosciences®-San Diego/CA/USA, com a ajuda do programa de software Cell Quest-Pro. As curvas padrão para cada citocina foram plotadas e as concentrações de cada amostra de teste foram calculadas usando o programa FCAP

array v.1.0.2 (BD-Biosciences®-Osasco/SP/Brasil). A atividade de MPO foi avaliada usando o método colorimétrico ELISA (Organon-Tecknica®-Roseland/New-Jersey/USA)(RAO *et al.*, 1993) e os metabólitos de óxido nítrico (NOx) foram determinados usando a reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Determinou-se a concentração de proteína C-reativa de alta sensibilidade com base na nefelometria usando o reagente CardioPhase®-hs-CRP e o equipamento BN® II (Siemens-Healthcare-Diagnostics-Tarrytown/New-York/USA). A contagem de glóbulos brancos foi analisada usando um método semi-automatizado com o auxílio do equipamento Heco 5 Plus (Radim-Company®-Pomezia/Roma/Itália). (WALLACH, 2013)

#### 5.1.1.13 Ponderação riscos/ benefícios das avaliações

A coleta de sangue para as análises bioquímicas causa rápido desconforto ou dor, dependendo da sensibilidade do paciente, no momento da coleta, quando se introduz a agulha. Estes exames são necessários para o diagnóstico do estado nutricional e verificar as condições de inflamação antes e após a suplementação com o simbiótico e o placebo.

#### 5.1.1.14 Análise estatística

Os dados foram organizados e registrados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2007® com dupla entrada. As variáveis quantitativas foram descritas e apresentadas em médias e desvios padrão da média quando a distribuição era simétrica ou em mediana e intervalo interquartil quando for assimétrica. As variáveis nominais foram descritas em categorias de frequência a partir do aparecimento nos grupos descritos. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar a normalidade dos dados. As diferenças entre GC, GPFC e GSFC foram analisadas usando análise de variância ou o teste de Kruskal-Wallis seguido de testes *post-hoc* de Bonferroni e Mann-Whitney, respectivamente. Os dados com distribuição não gaussiana foram submetidos à normalização logarítmica. A esfericidade e a homogeneidade dos dados foram avaliadas utilizando o teste de Mauchly e o teste de Levene, respectivamente. As alterações nos marcadores da função pulmonar, estado nutricional e inflamação após suplementação (placebo ou simbiótico) e ao longo do tempo (final e basal) foram analisadas usando um modelo linear generalizado de medidas repetidas para determinar o possível efeito de uma interação



intra-sujeito e inter-sujeito na variável dependente. As análises foram ajustadas para sexo, idade e consumo de energia. Devido à falta de dados, a análise de intenção de tratar incluiu uma análise principal usando múltiplas imputações. Foram criados cinco conjuntos de dados imputados utilizando as seguintes variáveis de predição: sexo, idade, VEF<sub>1</sub>, E/I, IMC/I, %GC, AMB, AGB, MPO, NO<sub>x</sub>, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8. O tamanho do efeito foi calculado usando Cohen's d (d) ajustado para uso em medidas repetidas e para a remoção de viés de pequenas amostras nas estimativas de efeitos padronizados (COHEN, 1992). Os tamanhos de efeitos foram considerados triviais (< 0,20), pequenos (entre 0,20 e 0,49), médio (entre 0,50 e 0,79) ou grande (> 0,80) (COHEN, 1992). O Cohen's d foi calculado usando uma calculadora de tamanho de efeito (<http://www.sportsci.org/index.html>). Análise estatística: SPSS v16.0 para Windows<sup>TM</sup> e p < 0.05 foi considerado indicativo de significância estatística.

### **5.1.2 ETAPA 2: Composição da microbiota intestinal e inflamação intestinal**

Com a parceria estabelecida durante o Doutorado Sanduíche objetivou-se ampliar este estudo com a análise da microbiota intestinal de um novo grupo de pacientes com FC comparados com um grupo controle. Estas análises foram realizadas durante o Doutorado Sanduíche no *Laboratorio di Infettivologia, Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università Degli Studi di Napoli – Federico II*, em Nápoles, Itália, no período de 01/03/2016 a 31/03/2017.

#### **5.1.2.1 Desenho do estudo**

Estudo clínico transversal realizado no HIJG/SC, no período de Março/Dezembro de 2016, com pacientes portadores de FC, atendidos para tratamento no ambulatório do HIJG/SC e cadastrados na Associação Catarinense de Assistência ao Mucoviscidótico (ACAM) e pacientes atendidos no ambulatório de puericultura do HIJG/SC.

#### **5.1.2.2 Aspectos éticos do estudo**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Santa Catarina (#48959715.2.1001.0121) e do HIJG/SC (#029/2012) e está registrado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (RBR-5BYRSC). O Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido foi assinado pelos responsáveis das crianças e adolescentes, que também concordaram em participar do estudo (APÊNDICE G).

### 5.1.2.3 Sujeitos

O tamanho requerido de amostra calculado por diferença de média foi de 18 para cada grupo (programa OpenEpi<sup>®</sup>, proporção de expostos a não expostos de 1,0, poder de 80% e nível de confiança de 95%). A amostra foi composta por 36 crianças e adolescentes alocados em grupo controle [GC, n = 17, mediana da idade: 3,00; intervalo intercuartil (IQR): 0,60 - 7,00 anos] e grupo fibrose cística [GFC, n = 19; mediana da idade: 4,00; IQR: 1,10 - 9,50 anos]. Os pacientes com FC foram distribuídos em antibioticoterapia (FCAB) e não faz uso de antibioticoterapia (FCnAB). Os critérios de inclusão para o GFC foram ter diagnóstico de FC (teste de suor de cloreto  $\geq 60$  mmol/L) e ser clinicamente estável pelo menos 30 dias antes do processo de coleta de dados (PEREIRA *et al.*, 2014). Os indivíduos no GC eram pareados por idade e sexo com GFC, ausência de FC e IMC normal (WHO, 2006; WHO, 2007). Os critérios de exclusão para todos os grupos foram a presença de febre, trauma e doenças: doenças celíaca, respiratória, inflamatória, intestinal, reumática, psiquiátrica, degenerativa, cardiovascular, diabetes, imunodeficiência renal, primária ou secundária e intolerâncias (glicose, lactose); drogas em uso, como hormônios, anti-inflamatórios não hormonais, inibidores da bomba de prótons, corticosteróides orais, inalatórios e intravenosos, cloridrato de ranitidina, imunossupressores, anti-histamínicos, prebióticos, probióticos e simbióticos, até 30 dias antes da coleta de dados. A suplementação diária vitaminas e minerais e de enzimas como parte do protocolo foi levada em consideração conforme relatado na ETAPA 1.

### 5.1.2.4 Avaliação clínica, índice de massa corporal, função pulmonar e gravidade da doença

A idade, sexo, data de nascimento, data do diagnóstico de FC, colonização, tratamento antibiótico e mutação foram coletados nos prontuários médicos do paciente. As informações sobre aleitamento materno, uso de fórmulas infantis, tipo de parto e introdução de nutrição sólida foram coletadas diretamente com os pais durante o estudo.

Os dados antropométricos (altura e peso) foram coletados de acordo com a metodologia relatada na ETAPA 1. O IMC foi classificado

com base nos critérios da WHO (1995) e utilizado os softwares Anthro e AnthroPlus (WHO, Genebra/Suíça) (WHO, 2009; WHO., 2011).

A determinação bacteriológica e a função pulmonar (avaliada pelo FEV<sub>1</sub>) foram descritas na ETAPA 1, assim como a gravidade da doença que foi determinada com base no Shwachman-Kulczycki (score S-K) também descrito na ETAPA 1.

#### 5.1.2.5 Análise da inflamação intestinal

Os pacientes coletaram as fezes no HIJG no dia da consulta. Para análise da calprotectina fecal, as fezes foram coletadas em recipientes de plástico e entregues diretamente no Ciência Laboratório Médico Ltda<sup>®</sup>. A calprotectina fecal, foi medida pelo teste imunoenzimático RIDASCREEN<sup>®</sup> Calprotectina (R-biopharm-AG). As amostras com uma concentração de calprotectina fecal de 0 - 50 µg/g de fezes foram consideradas normais, valores entre 50 - 100 µg/g de fezes são intermediários e valores superiores a 100 µg/g de fezes indicam inflamação intestinal (FAGERBERG *et al.*, 2003).

#### 5.1.2.6 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

Os pacientes foram orientados a coletar as fezes no hospital no dia da consulta conforme rotina pré-estabelecida. As fezes foram coletadas com um canudo de plástico de 4 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro; o canudo foi introduzida nas fezes de 4 - 10 mm e colocada dentro do tubo Falcon de 50 mL, fixada com 30 mL de solução de Carnoy composta por etanol, ácido acético glacial e clorofórmio (6/6/1, respectivamente) (Dinâmica Química Contemporânea Ltda<sup>®</sup>) durante 24 horas à temperatura ambiente e depois mantidos refrigerados a 4°C até a análise (SWIDSINSKI *et al.*, 2008).

As amostras de fezes fixadas na solução de Carnoy foram incorporadas em parafina, cortadas longitudinalmente em secções de 4 µm, colocadas em lâminas SuperFrost (Thermo Scientific, Itália) e desparafinadas com xileno e etanol (VWR Chemicals, Reino Unido). Em seguida, incubou-se com solução de hibridação (Tris-HCL 20 M, NaCl 0,9 M, SDS a 0,1% e formamida a 1%, pH 7,4) com 100 ng de sondas oligonucleotídicas de controle positivo de EUB (EUB I, EUB II e EUB III) (SWIDSINSKI *et al.*, 2008). As lâminas foram incubadas a 50°C durante 45 min com tampão de hibridação com 25 ng das respectivas sondas para *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *L. paracasei*, *Escherichia (E.) coli*, *Clostridium (C.) difficile*, Firmicutes,

*P. aeuroginosa*, *Eubacterium (E.) rectale* e *Faecalibacterium (F.) prausnitzii*, e visualizadas e quantificadas por contagem usando um microscópio de epifluorescência Nikon 80i Eclipse com uma Nikon DS-U2 e um software de imagem NIS-Element (Nikon/Tóquio/Japão) (SWIDSINSKI *et al.*, 2008). Bactérias com distribuição desigual ou concentração global baixa foram enumeradas dentro de áreas maiores de 100 x 100 µm, em campos microscópicos inteiros, ou na superfície total do cilindro fecal. Todas as contagens foram realizadas com uma ampliação de 1.000 vezes. A conversão dos números dentro de áreas microscópicas definidos para concentrações de bactérias por mililitro foi baseada no cálculo de que uma amostra de 10 µL com uma concentração celular de 10<sup>7</sup> células/mL tem em média 40 células por campo (SWIDSINSKI *et al.*, 2008).

As amostras foram analisadas com a sonda de mistura Eub338 conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC, sinal verde) na extremidade 5' (controle positivo) (DAIMS *et al.*, 1999), e uma sonda específica da espécie foi conjugada com uma única molécula de carbocianina fluorescente (Cy3, vermelho sinal). Todas as sondas foram adquiridas na MWG Eurofins Operon Ebersberg, Alemanha.

#### 5.1.2.7 Análise estatística

A distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk e quando necessário, os dados foram submetidos à normalização logarítmica.

Para a caracterização da população e avaliação da diferença entre os grupos controle e FC com relação à calprotectina fecal e composição da microbiota intestinal foi utilizados o teste “t” de Student, o teste de Mann Whitney quando as variáveis eram assimétricas e o qui-quadrado quando categóricas.

O GFC foi subdividido em antibioticoterapia (FCAB) e não faz uso de antibioticoterapia (FCnAB) para a realização do teste de Kruskal Wallis com o teste de Mann Whitney como *post hoc* com correção de Bonferroni.

A calprotectina fecal foi utilizada de forma contínua e agrupada em ausência de inflamação (0 - 50 µg/g) e inflamação intermediária e/ou grave (> 50 µg/g).

A correlação de Spearman foi calculada separadamente considerando o GC e GFC para avaliar a correlação entre IMC, microrganismos intestinais e inflamação intestinal.

Foram utilizadas análises de regressão linear múltipla para

investigar a relação entre o tipo de alimentação e o tipo de parto com a calprotectina fecal e os microrganismos intestinais. Análise estatística: SPSS versão 16.0 para Windows™ e  $p < 0,05$  foi considerado indicativo de significância estatística.

#### 5.1.2.8 Realização do doutorado sanduíche no exterior

Durante 13 meses (março de 2016 a março de 2017), foi realizado o estágio de Doutorado Sanduíche no Exterior no *Laboratorio di Infettivologia, Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università Degli Studi di Napoli – Federico II* (Nápoles, Itália). Este estágio foi supervisionado pelo médico pediatra, Dr. Alfredo Guarino. A proposta foi relacionada ao aprendizado da técnica hibridação fluorescente *in situ* e posteriormente a realização das análises das amostras dos participantes do presente estudo. Por outro lado, a proposta incluiu o conhecimento das técnicas realizadas pela equipe e auxílio na discussão dos dados. Foi organizado o seguinte plano de trabalho entre a orientadora no Brasil e o supervisor no exterior:

- Aprendizagem e realização da técnica de hibridização fluorescente *in situ*, (FISH, do inglês: fluorescence *in situ* hybridization).
- Discussão dos dados e estruturação e redação dos manuscritos.
- A participação em projetos do grupo de pesquisa que ocorreram de forma paralela às demais atividades e de acordo com a demanda do laboratório e do supervisor.



## 6 RESULTADOS

### 6.1 ETAPA 1: AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SIMBIÓTICO

#### 6.1.1 Caracterização da amostra

Durante o estudo, todos os participantes estavam clinicamente estáveis, não apresentavam esteatorreia e/ou má digestão, e utilizavam enzimas de acordo com as recomendações das Diretrizes de Prática Clínica (LAHIRI *et al.*, 2016). Em relação às bactérias patogênicas, 57,9% dos pacientes no GPFC e 45,5% no GSFC estavam colonizados por uma ou mais bactérias. As bactérias mais prevalentes foram *S. aureus* (47,7%) e *B. cepacea* (21,1%) no GPFC, bem como *S. aureus* (18,2%) e *P. aeruginosa* (22,7%) no GSFC.

O sexo masculino predominou no GPFC e GSFC e o sexo feminino predominou no GC (64,7%). Ambos os grupos de pacientes apresentaram pontuação média alta do escore S-K (GPFC:  $81,88 \pm 16,02\%$ ; GSFC:  $82,78 \pm 8,70\%$ ). O estado físico geral foi classificado como “excelente” ou “bom” em 75% do GPFC e 88,9% do GSFC e não houve pacientes com FC classificados como estado físico geral “severo”. GPFC e GSFC apresentaram valores médios de  $VEF1 \geq 70\%$  na classificação de obstrução pulmonar ( $p = 0,885$ ) (Tabela 2).

O consumo de energia entre GPFC e GSFC foi semelhante, sem diferença significativa ( $p = 0,214$ ) antes da suplementação (Tabela 2).

Em relação aos marcadores do estado nutricional, z-IMC/I, z-E/I, z-P/I, z-AGB, z-AMB e %GC diferiram significativamente entre o GC e os grupos de pacientes com FC ( $p < 0,05$ ), sem diferença significativa entre o GPFC e o GSFC. Os grupos de pacientes diferiram significativamente um do outro apenas em relação a z-P/I ( $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

Diferenças significativas nos marcadores de resposta inflamatória PCR e monócitos foram encontrados quando o GPFC e GSFC foram comparados ao GC ( $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Dados de identificação e marcadores clínicos, nutricionais e inflamatórios séricos do grupo controle (GC), grupo fibrose cística (GFC): Grupo placebo FC e Grupo simbiótico FC (Continua).

Variáveis	GC (n = 17)	GFC (n = 41)		p-valor
		Grupo placebo FC (n = 19)	Grupo simbiótico FC (n = 22)	
<b>Demográficas/Clinicas</b>				
Idade (anos)* <sup>£</sup>	8,55 ± 3,03	10,74 ± 2,54	9,59 ± 2,79	0,071
Sexo (n,% Masculino)	6 (35,3)	10 (52,6)	12 (54,5)	-
S-K escore (pontos)* <sup>£</sup>	NA	81,88 ± 16,02	82,78 ± 8,70	0,885
VEF <sub>1</sub> (%)* <sup>Φ</sup>	NA	74,44 (51,20 - 97,01)	88,86 (58,55 - 97,00)	0,855
<b>Ingestão energética #Φ</b>				
Energia (kcal)	NA	2.727,09 (2.336,47 - 3.476,16)	2.586,46 (1.844,21 - 3.094,71)	0,214
<b>Estado Nutricional<sup>£</sup></b>				
z-IMC/I*	0,22 ± 1,36 <sup>a</sup>	-1,21 ± 1,12 <sup>b</sup>	-0,58 ± 1,22 <sup>a,b</sup>	<0,001
z-E/I*	-0,32 ± 1,14 <sup>a</sup>	-1,03 ± 1,23 <sup>b</sup>	-0,78 ± 1,34 <sup>b,c</sup>	0,005
z-P/I*	-0,03 ± 1,24 <sup>a</sup>	-1,89 ± 0,92 <sup>b</sup>	-0,67 ± 1,09 <sup>a,c</sup>	0,003
z-AGB*	-0,33 ± 1,12 <sup>a</sup>	-0,73 ± 0,89 <sup>b</sup>	-0,51 ± 1,02 <sup>b,c</sup>	0,007
z-AMB*	-0,32 ± 1,63 <sup>a</sup>	-1,69 ± 1,14 <sup>b</sup>	-1,25 ± 0,87 <sup>a,b</sup>	0,004
GC (%)*	23,50 ± 7,05 <sup>a</sup>	14,26 ± 4,88 <sup>b</sup>	15,98 ± 5,87 <sup>b,c</sup>	<0,001

S-K Escore: *Shwachman-Kulczycki* escore. NA: Não se aplica. VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado no primeiro segundo. Estado nutricional em z - escore: IMC/I: Índice de massa corporal para idade. E/I: Estatura para a idade. P/I: Peso para a idade. AGB: Área gordurosa do braço. AMB: Área muscular do braço e %GC: Percentual de gordura corporal. NOx: Metabólitos do óxido nítrico. hs-CRP: Proteína C-reativa de alta sensibilidade. TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa. \*Valores expressos como média ± desvio padrão. #Valores expressos como mediana (intervalo intercuartil 25° - 75° percentil). Mesma letra não tem diferença estatística. <sup>£</sup> Teste 't' Student. <sup>Φ</sup> Teste de Mann-Whitney. <sup>£</sup> Teste ANOVA e *post-hoc* de Bonferroni. <sup>¥</sup> Teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Mann-Whitney (p < 0,05).



**Tabela 2** – Dados de identificação e marcadores clínicos, nutricionais e inflamatórios séricos do grupo controle (GC), grupo fibrose cística (GFC): Grupo placebo FC e Grupo simbiótico FC (Conclusão).

Variáveis	GC (n = 17)	GFC (n = 41)		p-valor
		Grupo placebo FC (n = 19)	Grupo simbiótico FC (n = 22)	
<b>Marcadores Inflamatórios</b>				
NOx (µmol/L)* <sup>‡</sup>	34,16 ± 8,84	39,37 ± 17,26	43,64 ± 17,38	0,178
hs-CRP (mg/L) <sup>#</sup> <sup>¥</sup>	0,27 (0,18 - 0,39) <sup>a</sup>	2,15 (1,80 - 24,70) <sup>b</sup>	1,30 (1,00 - 3,55) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
TNF-α (pg/mL) <sup>#</sup> <sup>¥</sup>	0,53 (0,47 - 0,73) <sup>a</sup>	0,47 (0,29 - 1,37) <sup>b</sup>	0,41 (0,00 - 1,16) <sup>b</sup>	0,505
Linfócitos (celulas/mm <sup>3</sup> x 10 <sup>3</sup> )* <sup>‡</sup>	2,934 ± 1,646	3,041 ± 0,955	3,267 ± 0,981	0,708
Monócitos (celulas/mm <sup>3</sup> )* <sup>‡</sup>	381,00 (297,50 - 475,25) <sup>a</sup>	724,00 (553,00 - 1175,00) <sup>b</sup>	733,00 (576,50 - 855,00) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>

S-K Escore: *Shwachman-Kulczycki* escore. NA: Não se aplica. VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado no primeiro segundo. Estado nutricional em z-escore: IMC/I: Índice de massa corporal para idade. E/I: Estatura para a idade. P/I: Peso para a idade. AGB: Área gordurosa do braço. AMB: Área muscular do braço e %GC: Percentual de gordura corporal. NOx: Metabólitos do óxido nítrico. hs-CRP: Proteína C-reativa de alta sensibilidade. TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa. \*Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>#</sup>Valores expressos como mediana (intervalo intercuartil 25° - 75° percentil). Mesma letra não tem diferença estatística. <sup>‡</sup> Teste 't' Student. <sup>§</sup> Teste de Mann-Whitney. <sup>¥</sup> Teste ANOVA e *post-hoc* de Bonferroni. <sup>¶</sup> Teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Mann-Whitney (p < 0,05).

### 6.1.2 Efeito do simbiótico sobre os marcadores da função pulmonar e do estado nutricional

Não houve diferença significativa e interações entre os grupos (GPFC e GSFC) e o tempo (final e basal) do VEF<sub>1</sub> (Tabela 3). Da mesma forma, quando os grupos foram subdivididos em bacteriologia negativa e positiva (Tabelas 4 e 5).

Em relação ao estado nutricional, os aumentos foram encontrados no %GC (GSFC:  $15,98 \pm 5,87\%$  vs  $16,05 \pm 4,97\%$ ; GSFC com bacteriologia positiva:  $14,66 \pm 5,87\%$  vs  $15,35 \pm 4,58\%$ ), AMB (GSFC:  $-1,25 \pm 0,86$  z-escore vs  $-1,21 \pm 1,28$  z-escore; GSFC com bacteriologia negativa:  $-1,18 \pm 0,77$  z-escore vs  $-1,07 \pm 1,49$  z-escore) e z-IMC/I (GSFC com bacteriologia positiva:  $-0,85 \pm 1,27$  z-escore vs  $-0,76 \pm 1,25$  z-escore), mas a diferença não atingiu significância estatística (Tabela 5).

### 6.1.3 Efeito do simbiótico sobre os marcadores inflamatórios

Ao avaliar o tipo de suplemento e o tempo de suplementação, foi encontrada uma interação estatisticamente significativa em relação aos marcadores inflamatórios IL-12 ( $p = 0,010$ ) e MPO ( $p = 0,036$ ). Ao analisar o efeito de cada suplemento individualmente, não foram encontradas diferenças significativas e um tamanho de efeito importante. O NOx diminuiu significativamente após a suplementação com o simbiótico no GSFC ( $p = 0,030$ ,  $d = 0,79$ ) (Tabela 3).

As citocinas pró-inflamatórias IL-6 ( $d = 0,42$ ), IL-1 $\beta$  ( $d = 0,39$ ) e IL-8 ( $d = 0,35$ ) diminuíram após suplementação no GSFC, mas as diferenças não alcançaram significância estatística (Tabela 3). Na análise individual do efeito do simbiótico no GSFC com bacteriologia positiva, foram encontradas diminuições significativas para IL-6 ( $0,91 \pm 0,52$  pg/mL vs  $0,45 \pm 0,49$  pg/mL,  $d = 0,72$ ) e IL-8 ( $1,47 \pm 0,23$  pg/mL vs  $1,35 \pm 0,18$  pg/mL,  $d = 0,58$ ) (Tabela 5).

No GSFC bacteriologia negativa e positiva, a diminuição de NOx não foi significativa, no entanto, teve um tamanho de efeito médio ( $p = 0,070$ ,  $d = 0,74$ ;  $p = 0,542$ ,  $d = 0,75$ , respectivamente) (Tabela 5).

**Tabela 3** – Função pulmonar, estado nutricional e marcadores inflamatórios séricos em pacientes com fibrose cística suplementados com placebo ou simbiótico.

Variáveis	Grupo placebo FC (n = 19)			Grupo simbiótico FC (n = 22)			ITvsG <sup>#</sup> (p-valor)
	Basal	Final	p-valor	Basal	Final	p-valor	
<b>Função pulmonar</b> *							
VEF <sub>1</sub> (%)	73,58 ± 22,28	77,39 ± 21,76	0,427	80,25 ± 23,87	75,99 ± 20,78	0,306	0,696
<b>Estado nutricional</b> *							
z-IMC/I*	-1,21 ± 1,12	-1,20 ± 1,29	0,943	-0,58 ± 1,22	-0,68 ± 1,13	0,120	0,589
z-E/I*	-1,03 ± 1,23	-0,87 ± 1,43	0,449	-0,78 ± 1,34	-0,66 ± 1,24	0,497	0,380
z-P/I*	-1,98 ± 1,29	-1,79 ± 1,31	0,515	-0,67 ± 1,10	-0,88 ± 1,22	0,276	0,443
z-AGB*	-0,73 ± 0,89	-0,74 ± 0,99	0,980	-0,51 ± 1,02	-0,59 ± 0,90	0,374	0,544
z-AMB*	-1,70 ± 1,11	-1,34 ± 1,12	0,073	-1,25 ± 0,86	-1,21 ± 1,28	0,813	0,425
GC (%)*	14,41 ± 4,79	14,78 ± 4,18	0,624	15,98 ± 5,87	16,05 ± 4,97	0,419	0,644
<b>Marcadores inflamatórios</b> <sup>‡*</sup>							
IL-12 (pg/mL)	0,68 ± 0,83	-0,04 ± 0,45	0,842	0,32 ± 0,54	0,49 ± 0,90	0,250	<b>0,010</b>
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	-0,03 ± 0,70	-0,22 ± 0,91	0,916	-0,02 ± 0,78	-0,40 ± 1,33	0,125	0,759
IL-10 (pg/mL)	0,32 ± 0,50	0,18 ± 0,50	0,495	0,35 ± 0,56	0,13 ± 0,74	0,056	0,561
IL-6 (pg/mL)	1,04 ± 0,55	0,77 ± 0,77	0,158	0,71 ± 0,49	0,48 ± 0,45	0,074	0,540
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	0,43 ± 0,65	-0,28 ± 1,02	0,446	0,23 ± 0,59	0,02 ± 0,84	0,321	0,486
IL-8 (pg/mL)	1,57 ± 0,38	1,46 ± 0,52	0,187	1,54 ± 0,25	1,41 ± 0,37	0,053	0,583
MPO (mU/mL)	6,65 ± 0,29	6,47 ± 0,40	0,321	6,56 ± 0,19	6,52 ± 0,17	0,532	<b>0,036</b>
NOx ( $\mu$ mol/L)	3,68 ± 0,40	3,36 ± 0,67	0,319	3,71 ± 0,38	3,44 ± 0,38	<b>0,030</b>	0,400

VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado no primeiro segundo. Estado nutricional em z-escore: IMC/I: Índice de massa corporal para idade. E/I: Estatura para a idade. P/I: Peso para a idade. AGB: Área gordurosa do braço. AMB: Área muscular do braço e %GC: Percentual de gordura corporal. IL-12: interleucina 12. TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa. IL-10: interleucina 10. IL-6: interleucina 6. IL-1 $\beta$ : interleucina-1beta. IL-8: interleucina 8. MPO: mieloperoxidase. NOx: Metabólitos do óxido nítrico. ITvsG: Interação tempo versus grupo. Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>‡</sup> Valores normalizados pela transformação em logaritmo na base 10. \* Modelo linear generalizado para medidas repetidas com ajuste para idade e sexo. <sup>#</sup> Modelo linear generalizado para medidas repetidas com ajuste para idade, sexo e consumo de energia com avaliação da interação entre o tipo de suplemento (placebo ou simbiótico) e o tempo de suplementação (Final - Basal) (p < 0,05).

**Tabela 4** – Função pulmonar, estado nutricional e marcadores inflamatórios séricos em pacientes com fibrose cística suplementados com placebo (Grupo placebo FC) de acordo com a ausência ou presença de microrganismos patogênicos.

Variáveis	Grupo placebo FC bacteriologia negativa (n = 8)			Grupo placebo FC bacteriologia positiva (n = 11)		
	Basal	Final	p-valor	Basal	Final	p-valor
<b>Função pulmonar *</b>						
VEF <sub>1</sub> (%)	87,78 ± 36,89	90,00 ± 27,73	0,709	77,96 ± 23,83	68,75 ± 29,75	0,296
<b>Estado nutricional *</b>						
z-IMC/I*	-1,36 ± 0,97	-1,02 ± 0,93	0,565	-1,05 ± 1,58	-1,26 ± 1,55	0,425
z-E/I*	-1,32 ± 1,42	-1,27 ± 1,41	0,132	-0,51 ± 1,28	-0,44 ± 1,31	0,416
z-P/I*	-2,20 ± 1,30	-1,82 ± 1,19	0,073	-1,97 ± 1,23	-1,74 ± 1,44	0,643
z-AGB*	-0,87 ± 0,86	-0,81 ± 0,88	0,852	-0,28 ± 0,86	-0,61 ± 0,82	0,071
z-AMB*	-1,79 ± 1,22	-1,47 ± 1,16	0,278	-1,36 ± 1,26	-1,29 ± 1,17	0,843
GC (%)*	13,54 ± 4,63	14,42 ± 4,35	0,995	15,86 ± 5,25	15,36 ± 4,88	0,616
<b>Marcadores inflamatórios ‡*</b>						
IL-12 (pg/mL)	0,28 ± 0,78	0,14 ± 0,33	0,781	0,82 ± 1,05	0,01 ± 0,38	0,765
TNF-α (pg/mL)	-0,84 ± 0,78	-0,38 ± 0,39	0,466	0,89 ± 0,04	0,01 ± 0,93	0,677
IL-10 (pg/mL)	0,31 ± 0,26	0,12 ± 0,33	0,892	0,36 ± 0,55	0,25 ± 0,48	0,828
IL-6 (pg/mL)	1,04 ± 0,74	0,62 ± 0,65	0,133	1,05 ± 0,33	0,91 ± 0,74	0,357
IL-1β (pg/mL)	0,06 ± 0,65	-0,38 ± 0,86	0,940	0,92 ± 0,04	-0,13 ± 1,40	0,904
IL-8 (pg/mL)	1,57 ± 0,43	1,55 ± 0,50	0,999	1,57 ± 0,26	1,38 ± 0,39	0,188
MPO (mU/mL)	6,62 ± 0,27	6,49 ± 0,27	0,466	6,69 ± 0,23	6,45 ± 0,29	0,730
NOx (μmol/L)	3,64 ± 0,41	3,40 ± 0,29	0,279	3,71 ± 0,42	3,32 ± 0,79	0,462

VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado no primeiro segundo. Estado nutricional em z-escore: IMC/I: Índice de massa corporal para idade. E/I: Estatura para a idade. P/I: Peso para a idade. AGB: Área gordurosa do braço. AMB: Área muscular do braço e %GC: Percentual de gordura corporal. IL-12: interleucina 12. TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa. IL-10: interleucina 10. IL-6: interleucina 6. IL-1β: interleucina-1beta. IL-8: interleucina 8. MPO: mieloperoxidase. NOx: Metabólito do óxido nítrico. Valores expressos como média ± desvio padrão. ‡ Valores normalizados pela transformação em logaritmo na base 10.

\*Modelo linear generalizado para medidas repetidas com ajuste para idade, sexo e consumo de energia (p < 0,05).

**Tabela 5** – Função pulmonar, estado nutricional e marcadores inflamatórios séricos em pacientes com fibrose cística suplementados com simbiótico (Grupo simbiótico FC) de acordo com a ausência ou presença de microrganismos patogênicos.

Variáveis	Grupo simbiótico FC bacteriologia negativa (n = 12)			Grupo simbiótico FC bacteriologia positiva (n = 10)		
	Basal	Final	p-valor	Basal	Final	p-valor
<b>Função pulmonar *</b>						
VEF <sub>1</sub> (%)	83,36 ± 16,70	77,18 ± 19,93	0,618	75,60 ± 33,25	74,21 ± 23,83	0,303
<b>Estado nutricional *</b>						
z-IMC/I*	-0,19 ± 1,25	-0,49 ± 1,15	0,102	-0,85 ± 1,27	-0,76 ± 1,25	0,427
z-E/I*	-1,02 ± 1,24	-0,91 ± 1,18	0,316	-0,44 ± 1,36	-0,49 ± 1,31	0,189
z-P/I*	-0,95 ± 1,04	-1,09 ± 1,05	0,237	-0,15 ± 1,11	-0,52 ± 1,47	0,484
z-AGB*	-0,28 ± 1,00	-0,48 ± 0,72	0,683	-0,80 ± 0,01	-0,80 ± 0,89	0,616
z-AMB*	-1,18 ± 0,77	-1,07 ± 1,49	0,942	-1,33 ± 1,00	-1,37 ± 1,01	0,889
GC (%)*	17,09 ± 5,89	16,63 ± 5,43	0,450	14,66 ± 5,87	15,35 ± 4,58	0,729
<b>Marcadores inflamatórios ‡*</b>						
IL-12 (pg/mL)	0,19 ± 0,14	0,71 ± 1,09	0,192	0,49 ± 0,70	0,22 ± 0,55	0,909
TNF-α (pg/mL)	-0,41 ± 0,34	-0,80 ± 1,05	0,266	-0,19 ± 0,92	-0,22 ± 1,06	0,847
IL-10 (pg/mL)	0,34 ± 0,30	-0,00 ± 0,37	0,085	0,50 ± 0,53	0,37 ± 0,57	0,458
IL-6 (pg/mL)	0,51 ± 0,40	0,52 ± 0,45	0,473	0,91 ± 0,52	0,45 ± 0,49	<b>0,033</b>
IL-1β (pg/mL)	0,04 ± 0,17	0,00 ± 0,46	0,985	0,13 ± 0,86	0,79 ± 0,56	0,200
IL-8 (pg/mL)	1,59 ± 0,28	1,50 ± 0,40	0,925	1,47 ± 0,23	1,35 ± 0,18	<b>0,009</b>
MPO (mU/mL)	6,50 ± 0,17	6,54 ± 0,12	0,756	6,56 ± 0,18	6,52 ± 0,18	0,314
NOx (μmol/L)	3,74 ± 0,38	3,47 ± 0,53	0,070	3,86 ± 0,46	3,54 ± 0,42	0,542

VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado no primeiro segundo. Estado nutricional em z-escore: IMC/I: Índice de massa corporal para idade. E/I: Estatura para a idade. P/I: Peso para a idade. AGB: Área gordurosa do braço. AMB: Área muscular do braço e %GC: Percentual de gordura corporal. IL-12: interleucina 12. TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa. IL-10: interleucina 10. IL-6: interleucina 6. IL-1β: interleucina-1beta. IL-8: interleucina 8. MPO: mieloperoxidase. NOx: Metabólitos do óxido nítrico. Valores expressos como média ± desvio padrão. ‡ Valores normalizados pela transformação em logaritmo na base 10. \*Modelo linear generalizado para medidas repetidas com ajuste para idade, sexo e consumo de energia (p < 0,05).

## 6.2 ETAPA 2: COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E INFLAMAÇÃO INTESTINAL

### 6.2.1 Marcadores demográficos, clínicos, inflamação intestinal e microbiota intestinal

Os participantes do estudo foram pareados para sexo e idade, sem diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6). O tipo de parto no GFC foi na maioria por cesariana (73,7%) enquanto que no GC a maioria era vaginal (52,9%). Com base no protocolo de suplementação, apenas um paciente de GFC não suplementou com enzimas pancreáticas durante o estudo. Em relação à amamentação exclusiva em ambos os grupos (GC: 76,5%, GFC: 73,7%;  $p = 0,003$ ), a maioria dos pacientes amamentou por menos de seis meses, o que justifica o aumento do uso de fórmulas para lactentes (cerca de 70% em ambos os grupos) e a introdução de alimentos sólidos antes de terem seis meses de idade (Tabela 6). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao IMC, mostrando que o GFC não apresenta comprometimento nutricional ( $p = 0,186$ ) (Tabela 6). A maioria dos pacientes com FC apresentou a mutação Phe508del ( $\Delta F508$ ) (68,4%) e apenas um paciente não apresentou essa mutação, enquanto que os demais não apresentavam diagnóstico da mutação durante o estudo (Tabela 6). O escore de gravidade da doença e a função pulmonar do GFC são classificados como excelentes (88,57 pontos) e bons (80,67%), respectivamente. Cerca de 40% dos pacientes com GFC foram colonizados e, destes, apenas 15,8% foram colonizados por *P. aeruginosa*. Estes resultados estão de acordo com o fato de que cerca de 50% utilizavam antibióticos durante o estudo (Tabela 6).

A inflamação intestinal avaliada por calprotectina fecal foi maior no GFC em relação ao GC (GFC, mediana: 40,80  $\mu\text{g/g}$ , IQR: 19,80 - 87,10; GC, mediana: 20,15  $\mu\text{g/g}$ , IQR: 16,20 - 31,00,  $p = 0,040$ ) (Tabela 6). Cerca de 50% de GFC e 100% de GC apresentaram valores normais de calprotectina. O que pode estar relacionado ao fato de que os *Bacteroides*, Firmicutes, *E. rectale* e *F. prausnitzii* foram significativamente diminuídos ( $p < 0,05$ ) em GFC em comparação com GC, enquanto que as bactérias *C. difficile*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram significativamente aumentados no GFC ( $p < 0,05$ ) (Tabela 7).

**Tabela 6** – Dados de identificação e marcadores clínicos dos grupos controle e fibrose cística.

Variáveis		Grupo controle (n = 17)	Grupo fibrose cística (n = 19)	p-valor
Idade <sup>1,€</sup>		3,00 (0,600 – 7,000)	4,00 (1,100 – 9,500)	0,552
Sexo, n (%) <sup>2,£</sup>	Masculino	11 (64,7)	10 (52,6)	0,317
	Feminino	06 (35,3)	09 (47,4)	
Tipo de parto, n (%) <sup>2,£</sup>	Vaginal	09 (52,9)	05 (26,3)	0,237
	Cesariana	07 (41,2)	14 (73,7)	
Aleitamento materno, n (%) <sup>2,£</sup>	< 6 meses	13 (76,5)	14 (73,7)	<b>0,003</b>
	≥ 6 meses	04 (23,5)	05 (26,3)	
Fórmula infantil, n (%) <sup>2,£</sup>	Não	05 (29,4)	04 (21,1)	<b>0,004</b>
	Sim	12 (70,6)	14 (73,7)	
Início alimentos sólidos, n (%) <sup>2,£</sup>	< 6 meses	06 (35,3)	11 (57,9)	0,866
	≥ 6 meses	11 (64,7)	07 (36,8)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>3,¥</sup>		17,07 ± 1,38	16,17 ± 2,01	0,186
Mutação, n (%) <sup>2</sup>	Homozigoto Phe508del	-	06 (31,6)	-
	Heterozigoto Phe508del	-	07 (36,8)	-
	Outras	-	01 (5,3)	-
Shwachman-Kulczychi score (pontos)		-	88,57 ± 10,88	-
VEF <sub>1</sub> (%) <sup>2</sup>		-	80,67 ± 22,00	-
Colonization, n (%) <sup>2</sup>	Negativo	-	07 (36,8)	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	03 (15,8)	-
	Outras	-	05 (26,3)	-
Antibioticoterapia, n (%) <sup>2</sup>	Não	17 (100)	09 (47,4)	-
	Sim	-	10 (52,6)	-

IMC: índice de massa corporal; VEF<sub>1</sub>: Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo.

<sup>1</sup> Valores em mediana e intervalo interquartil. <sup>2</sup> Valores em frequência e porcentagem. <sup>3</sup> Valores em média e desvio padrão.

<sup>€</sup> Teste de Mann Whitney. <sup>£</sup> Teste de qui-quadrado. <sup>¥</sup> Teste ‘t’ de Student. Significância p < 0,05.

**Tabela 7** – Inflamação intestinal e microbiota intestinal dos grupos controle e fibrose cística.

Variáveis	Grupo controle (n = 17)	Grupo fibrose cística (n = 19)	p-valor
<b>Marcador inflamatório intestinal #</b>			
Fecal calprotectin ( $\mu\text{g/g}$ fezes)	20,15 (16,20 – 31,00)	40,80 (19,80 – 87,10)	<b>0,040</b>
<b>Microbiota Intestinal #</b>			
<i>Bacteroides</i> ( $\times 10^9/\text{mL}$ fezes)	28,30 (19,30 – 38,00)	15,70 (1,10 – 24,65)	<b>0,034</b>
<i>Bifidobacterium</i> ( $\times 10^9/\text{mL}$ fezes)	20,30 (14,65 – 23,15)	13,00 (5,52 – 21,20)	0,120
<i>Veillonella</i> ( $\times 10^9/\text{mL}$ fezes)	0,70 (0,00 – 11,35)	1,00 (0,00 – 4,39)	0,821
Firmicutes ( $\times 10^9/\text{mL}$ fezes)	9,33 (1,55 – 12,17)	0,97 (0,77 – 1,57)	<b>&lt;0,001</b>
<i>Eubacterium rectale</i> ( $\times 10^9/\text{mL}$ fezes)	21,00 (16,00 – 23,00)	10,70 (3,74 – 15,15)	<b>0,002</b>
<i>Clostridium difficile</i> ( $\times 10^9/\text{mL}$ fezes)	0,20 (0,13 – 0,44)	0,50 (0,34 – 1,02)	<b>0,024</b>
<i>Lactobacillus paracasei</i> ( $\times 10^9/\text{mL}$ fezes)	3,17 (2,02 – 8,47)	2,37 (1,79 – 5,74)	0,506
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ( $\times 10^9/\text{mL}$ fezes)	14,00 (3,92 – 27,65)	1,00 (0,17 – 11,50)	<b>0,035</b>
<i>Escherichia coli</i> ( $\times 10^9/\text{mL}$ fezes)	0,67 (0,40 – 1,60)	1,47 (1,02 – 2,67)	<b>0,007</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( $\times 10^9/\text{mL}$ fezes)	0,23 (0,15 – 0,53)	1,13 (0,87 – 3,92)	<b>&lt;0,001</b>

#Valores apresentados em mediana e intervalo interquartil e realizado teste de Mann Whitney. p < 0,05.



### 6.2.2 Avaliação do tipo de alimentação, tipo de parto, calprotectina fecal e microrganismos intestinais

A análise entre o uso de antibióticos pelo GF (FCAB e GC) com calprotectina fecal mostrou que a mediana do FCAB é significativamente maior em relação ao GC (FCAB, mediana: de 62,95 µg/g de fezes, IQR: 21,80 - 136,63, GC, mediana: 19,80 µg/g de fezes, IQR: 15,15 - 30,15; FCAB *vs* GC  $p = 0,015$ ;  $p = 0,021$ ). Embora a mediana do grupo FCnAB tenha sido maior do que GC e menor que no FCAB não foi significativa (FCnAB, mediana: 29,70 µg/g de fezes, IQR: 7,25 - 54,35; FCnAB *vs* CG  $p = 0,357$ ; FCAB *vs* FCnAB;  $p = 0,156$ ).

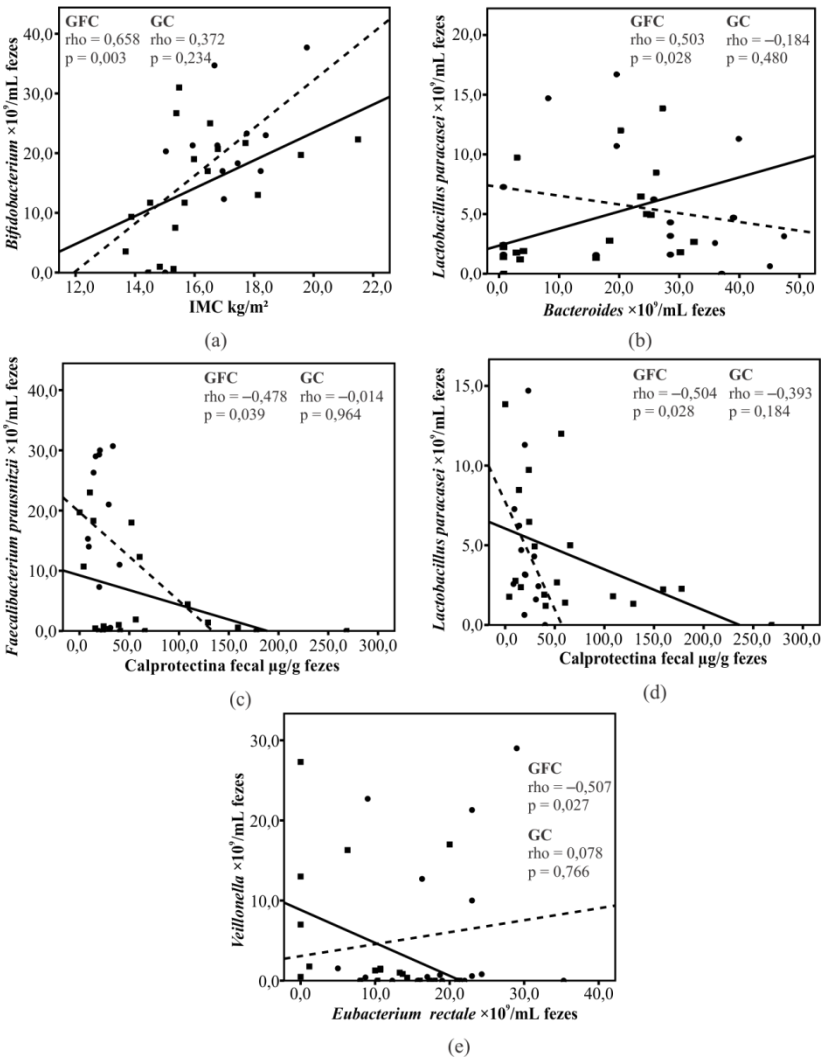
Ao avaliar a relação (estratificada por GC e GFC) entre o tipo de alimentação (aleitamento materno e fórmula infantil) e o tipo de parto com calprotectina fecal e microrganismos intestinais ajustados para sexo e idade, a mesma foi significativa somente para a bactéria Firmicutes e amamentação (< 6 meses, média: -0,7; ≥ 6 meses, média: 0,30,  $p = 0,006$ ) no GFC.

### 6.2.3 Avaliação do índice de massa corporal, calprotectina fecal, microrganismos intestinais e antibioticoterapia

Observou-se uma correlação positiva entre IMC e *Bifidobacterium* ( $p = 0,003$ ) (Figura 3a) e entre *Bacteroides* e *L. paracasei* ( $p = 0,028$ ) (Figura 4b) no GFC. Uma correlação negativa foi encontrada entre a calprotectina com *F. prausnitzii* ( $p = 0,039$ ) (Figura 4c) e com *L. paracasei* ( $p = 0,028$ ) (Figura 3d) e entre *Veillonella* e *E. rectale* ( $p = 0,027$ ) (Figura 3e) no GFC.

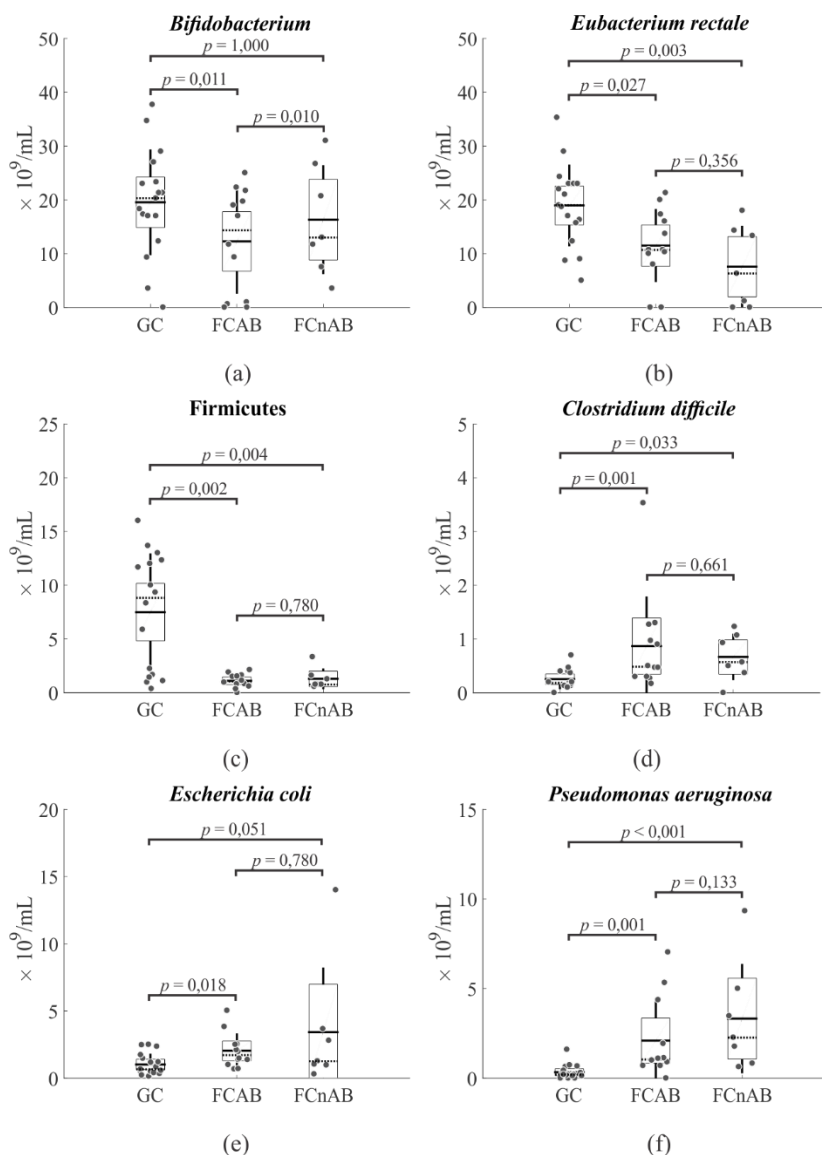
A comparação da antibioticoterapia e microrganismo foram feitas por análise de variância e valores significativos foram encontrados entre a terapia com antibióticos e os microrganismos *Bifidobacterium* ( $p = 0,017$ ) (Figura 4a), *E. rectale* ( $p = 0,006$ ) (Figura 4b), Firmicutes ( $p = 0,002$ ) (Figura 4c), *C. difficile* ( $p = 0,006$ ) (Figura 4d), *E. coli* ( $p = 0,030$ ) (Figura 4e) e *P. aeruginosa* ( $p < 0,001$ ) (Figura 4f). Foi aplicado um teste *post hoc* e observou-se diferença significativa entre GC e FCAB (Figura 4).

**Figura 3** – Correlação entre o índice de massa corporal, a calprotectina fecal e os microrganismos intestinais.



IMC: Índice de massa corporal. Grupo fibrose cística (GFC) (—●—). Grupo controle (GC) (-■-). Correlação de Spearman. p < 0,05.

**Figura 4** – Comparação entre antibioticoterapia e microrganismos intestinais.



GC: Grupo controle; FCAB: Fibrose cística com antibioticoterapia; FCnAB: Fibrose cística sem antibioticoterapia. Teste de Kruskal Wallis com Mann whitney posthoc.  $p < 0,05$  e  $p < 0,017$  para *post hoc* (correção de Bonferroni).



## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 ETAPA 1: AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SIMBIÓTICO

Os resultados relativos à caracterização da amostra corroboram com estudos prévios que avaliaram a função pulmonar, o estado nutricional e os marcadores inflamatórios de pacientes com FC em relação aos controles não FC. Em geral, essa população apresenta comprometimento da função pulmonar e conseqüentemente do estado nutricional, já tendo mostrado uma relação entre ambos os fatores. (SHEPHERD *et al.*, 2001; DODGE e TURCK, 2006; PANAGOPOULOU *et al.*, 2014; REGISTRY, 2014) No que diz respeito ao processo inflamatório, no presente estudo, pacientes com FC também mostraram um aumento na concentração de marcadores pró-inflamatórios (PEREIRA *et al.*, 2014).

Estudos que abordam o uso de suplementação com simbiótico ou probióticos em FC são escassos, oferecem resultados conflitantes e empregam diferentes metodologias, com diferenças na idade dos participantes, marcadores avaliados e técnicas de análise. No entanto, o uso desses suplementos na prevenção ou tratamento de exacerbação pulmonar e diminuição da frequência de admissões hospitalares de pacientes com FC foi observado (TURCK *et al.*, 2016). No presente estudo, não foi encontrada diferença significativa entre o GPFC eo GSFC com bacteriologia positiva ou negativa na função pulmonar medida pelo VEF<sub>1</sub>. Do mesmo modo, em um estudo envolvendo 61 adolescentes e adultos com FC (idade média: 17,5 anos, intervalo interquartil: 6 a 29 anos), suplementados com o probiótico *L. reuteri* ( $\times 10^{10}$  UFC) por seis meses. Apesar disso, os autores encontraram redução significativa no número de exacerbações pulmonares e infecções respiratórias das vias aéreas superiores entre pacientes com doença pulmonar leve a moderada. (DI NARDO *et al.*, 2014) Mesmo quando em um estudo envolvendo 10 adultos com FC (idade média:  $26,2 \pm 12,9$  anos) suplementados com probióticos [*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum*, *Streptococcus* (*S.*) *thermophilus*] por seis meses, os autores também encontraram uma redução significativa no número de exacerbações pulmonares ( $1,3 \pm 1,0$  a  $0,6 \pm 0,7$ ,  $p = 0,002$ ) (WEISS *et al.*, 2010). Em contraste, em um estudo envolvendo 38 adolescentes com FC (idade média:  $13,2 \pm 4,2$  anos) suplementados com *L. GG* por seis meses, um aumento significativo no VEF<sub>1</sub> foi encontrado ( $3,6 \pm 5,2\%$  vs  $0,9 \pm 5\%$ ,  $p = 0,020$ ). Os autores hipotetizam essa melhora no VEF<sub>1</sub>

como consequência do aumento de peso e redução no número de exacerbações pulmonares encontradas durante o estudo (BRUZZESE *et al.*, 2007).

O simbiótico e/ou a duração da suplementação não foram suficientes para afetar o estado nutricional dos participantes no presente estudo, independentemente de serem bacteriologia positiva ou negativa. Um achado semelhante é relatado em um estudo anterior que analisa o efeito da suplementação com probióticos (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum* e *S. thermophilus*) durante seis meses no IMC (WEISS *et al.*, 2010). No entanto, em outro estudo avaliando a suplementação com o probiótico *L. GG* durante seis meses, um aumento significativo de peso foi encontrado em pacientes com FC em comparação com aqueles que apenas receberam uma solução de hidratação oral ( $1,5 \pm 1,8$  kg e  $0,7 \pm 1,8$  kg, respectivamente,  $p = 0,020$ ) e os autores sugerem que o aumento de peso pode ter sido associado à redução do número de exacerbações pulmonares (BRUZZESE *et al.*, 2007).

No presente estudo, não houve melhora no estado nutricional e na função pulmonar, o que pode estar relacionado ao menor tempo de suplementação, considerando que algumas das cepas utilizadas, bem como a quantidade delas, se assemelham a estudos anteriores (BRUZZESE *et al.*, 2007; WEISS *et al.*, 2010) que encontraram melhora significativa.

Em relação aos marcadores inflamatórios IL-12 e MPO no GSFC, foi encontrada uma interação significativa, quando avaliada individualmente, não foi mantida, pode ser devido a alterações biológicas não relacionadas à suplementação que ocorreu durante o estudo com os participantes, porque no momento inicial não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos placebo e simbiótico.

O simbiótico avaliada neste estudo levou a uma redução significativa nos níveis séricos de NOx ( $p < 0,030$ ,  $d = 0,79$ ) no GSFC. Além disso, o simbiótico teve um efeito médio sobre o NOx na bacteriologia negativa e positiva do GSFC, que era "provável que fosse percebido" de acordo com as estatísticas de Cohen (COHEN, 1992). Medir o NO é difícil devido à meia-vida curta, no entanto, medir os níveis séricos do NOx é aceito, porque tem uma alta correlação com a produção endógena de NO (MIRANDA *et al.*, 2001; CALVERT, 2011). Como observado anteriormente, os níveis de NOx são elevados na circulação de indivíduos com FC (PEREIRA *et al.*, 2014), o que pode ser consequência de um aumento na produção de NO por meio da óxido nítrico sintase induzido (iNOS) (JEAN-BAPTISTE, 2007). Sua

produção é desencadeada por macrófagos ativados, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e, em excesso, podem causar danos nos tecidos (JEAN-BAPTISTE, 2007).

Após a suplementação com o simbiótico no presente estudo, a citocina IL-1 $\beta$  sofreu uma redução que, embora não significativa, pode estar relacionada à redução dos níveis de NOx e consequente atenuação do processo inflamatório.

A redução, embora não significativa, nas concentrações dos marcadores inflamatórios IL-6 e IL-8 no GSFC também pode ser uma indicação da eficácia do simbiótico na atenuação da resposta pró-inflamatória. Este efeito foi evidente quando o GPFC e GSFC foram estratificados com base na bacteriologia (negativa e positiva), uma vez que indivíduos no GSFC com bacteriologia positiva apresentaram uma redução significativa nesses marcadores (IL-6:  $p = 0,033$ ,  $d = 0,72$ ; IL-8:  $p = 0,009$ ,  $d = 0,58$ ). Os autores de um estudo que avaliam o efeito da suplementação com o probiótico *L. GG* por seis meses não encontraram diferença significativa no nível de IL-8 no escarro de pacientes com FC (WEISS *et al.*, 2010). Igualmente, os autores de um estudo que avaliaram o efeito da suplementação com *L. reuteri* não encontrou diferença nos níveis de IL-6 ou IL-8 nas fezes dos pacientes (DEL CAMPO, GARRIGA, PEREZ-ARAGON, *et al.*, 2014).

A comparação dos estudos é dificultada pelo uso de diferentes métodos para avaliação da IL-6 e IL-8. As investigações relatam um aumento desses marcadores pró-inflamatórios em pacientes com FC, especialmente em grupos com bacteriologia positiva, bem como aqueles com resultados positivos para *P. aeruginosa* no sangue e células epiteliais brônquicas (STECENKO *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2014). Como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , as citocinas IL-6 e IL-8, são mediadores da fase aguda. Em um processo inflamatório, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  podem induzir a síntese destas citocinas por macrófagos e células epiteliais (CHMIEL, KONSTAN, *et al.*, 2002). A síntese de IL-8 por células epiteliais das vias aéreas de forma endógena ou em resposta a agentes patogênicos através da ativação do fator nuclear kappa B desempenha um papel central na fisiopatologia da inflamação na FC (KIENINGER e REGAMEY, 2010).

Os efeitos do simbiótico nos biomarcadores avaliados neste estudo podem ter sido limitados devido ao tempo de suplementação, bem como devido aos métodos de avaliação utilizados. A avaliação dos marcadores inflamatórios no soro, ao contrário de alguns estudos avaliados no trato gastrointestinal, foi realizada com o objetivo de avaliar o efeito do simbiótico de forma sistêmica. Embora as alterações encontradas sejam pequenas, o efeito a longo prazo que o simbiótico

pode ter deve ser considerado. Uma limitação deste estudo, foi que não avaliamos os marcadores inflamatórios no trato gastrointestinal.

## 7.2 ETAPA 2: COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E INFLAMAÇÃO INTESTINAL

As anormalidades intestinais na microbiota de pacientes com FC foram relatadas na literatura (BRUZZESE *et al.*, 2014; BURKE, FOUHY, *et al.*, 2017; MIRAGOLI *et al.*, 2017), mas essas alterações não são inteiramente claras, bem como suas causas. O presente estudo mostra um padrão diferente de espécies bacterianas, bem como uma associação dele com calprotectina fecal, IMC, tipo de parto, tipo de alimentação e antibioticoterapia.

O GFC em geral apresentou bons resultados quando o IMC, a gravidade da doença e a função pulmonar foram avaliados, embora a maioria apresentou a mutação  $\Delta F508$ , que está associada ao comprometimento da função pulmonar e ao consequente piora no estado nutricional do paciente com FC (SCHIPPA *et al.*, 2013). A colonização pulmonar por bactéria atraiu a atenção não só porque cerca de 40% do GFC foi colonizado, mas também porque um dos pacientes que no momento da coleta não apresentou colonização pulmonar por *P. aeruginosa* (Figura 5), mas estava presente em grande quantidade na microbiota intestinal. Cerca de três meses após o estudo, o paciente já tinha colonização pulmonar por *P. aeruginosa*, confirmando que a colonização intestinal pode preceder a colonização pulmonar (MADAN, 2016).

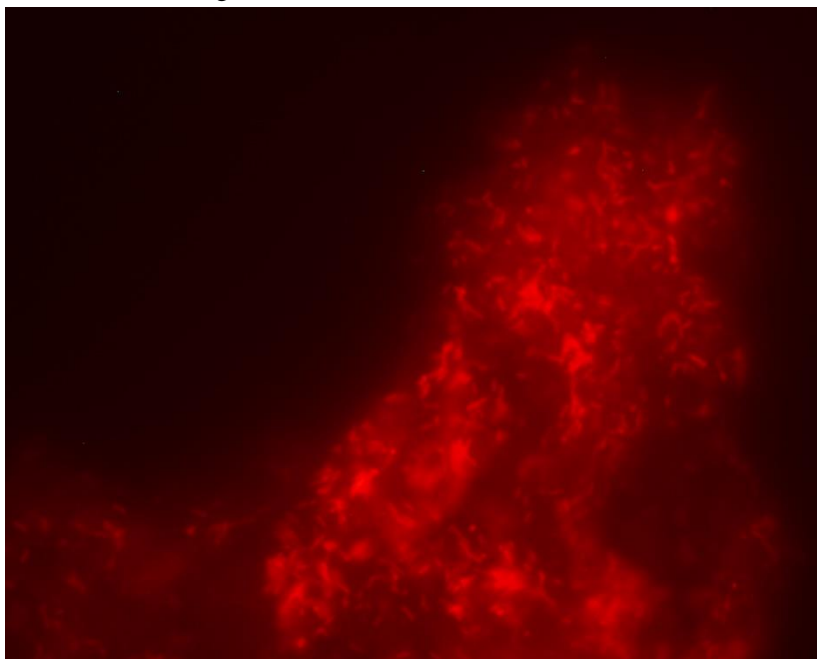
A correlação positiva encontrada entre o IMC e *Bifidobacterium* em GFC mostra que a melhoria do estado nutricional está relacionada ao aumento da *Bifidobacterium* que junto com *Faecalibacterium* são considerados como marcadores para uma microbiota intestinal saudável (RUSSELL *et al.*, 2011; DUYTSCHAEVER *et al.*, 2013a). Após o desmame, *Bifidobacterium* diminui gradualmente e *Bacteroides* e *Eubacterium* tornaram-se predominantes, mas ainda é considerado um determinante da saúde intestinal do adulto (RUSSELL *et al.*, 2011).

A associação encontrada entre o tipo de aleitamento materno e o filo Firmicutes mostrou que, embora aproximadamente 70% dos dois grupos (GC e GFC) tenham sido amamentados exclusivamente por menos de seis meses, o GFC apresentou valores significante menores. As bactérias produtoras de lactato, como o *Lactobacillus* e aqueles que utilizam lactato, como os pertencentes ao gênero *Veillonella* e *Faecalibacterium* e o filo Firmicutes, fornecem ao hospedeiro



importantes metabolitos de ácidos graxos de cadeia curta, que estão relacionados à proteção contra inflamação intestinal (BRUZZESE *et al.*, 2014; YASMIN *et al.*, 2017). Este resultado pode ser devido ao fato de que cerca de 50% da GFC estava em antibioticoterapia no momento da coleta. O microbioma intestinal é montado durante a infância, e esta montagem é caracterizada por aumento da colonização por *Bifidobacteria* e micróbios pertencentes ao filo Firmicutes e Bacteroidetes, e o esgotamento das *Enterobactérias* modificando a microbiota (AZAD *et al.*, 2016).

**Figura 5** – Microbiota intestinal de um paciente com FC colonizado por *Pseudomonas aeruginosa* ( $\times 10^9$ /mL de fezes).



Hibridação fluorescente *in situ*. Molécula de carbocianina fluorescente (Cy3, sinal vermelho) para *Pseudomonas aeruginosa* ( $\times 10^9$ /mL fezes).

Os valores de calprotectina fecal, que é considerado um bom marcador de inflamação intestinal (DHALIWAL *et al.*, 2015), estão aumentados no GFC e cerca de 47% dos pacientes apresentam valores acima de 50  $\mu\text{g/g}$  de fezes, sendo estes dados de acordo com a literatura (BRUZZESE *et al.*, 2014; MIRAGOLI *et al.*, 2017). A correlação

negativa entre a calprotectina fecal e as bactérias *F. prausnitzii* e *L. paracasei* mostram que a inflamação intestinal está diretamente relacionada à diminuição dessas bactérias. *F. prausnitzii* é uma bactéria produtora de butirato e a diminuição da produção pode influenciar a nutrição dos enterócitos e o pH luminal e conseqüentemente a manutenção da saúde intestinal (BRUZZESE *et al.*, 2014). *Lactobacillus* spp. são bactérias produtoras de ácido láctico e estudos mostram que está associada à prevenção de infecções respiratórias (WEISS *et al.*, 2010). Quando a associado a calprotectina fecal com o uso de antibióticos, a influência da antibioticoterapia no desenvolvimento de inflamação intestinal na FC foi evidente.

No presente estudo, observou-se uma menor quantidade dos microrganismos produtores de butirato (*E. rectale* e *F. prausnitzii*), produtores de ácido láctico (*L. paracasei* e *Bifidobacterium* spp.) e produtores de acetato (*Bacteroides*), estando de acordo com outros estudos (RUSSELL *et al.*, 2011; BRUZZESE *et al.*, 2014; MIRAGOLI *et al.*, 2017). Além de um aumento significativo de *E. coli*, *C. difficile* e *P. aeruginosa* no GFC (RUSSELL *et al.*, 2011; BRUZZESE *et al.*, 2014; MIRAGOLI *et al.*, 2017). Ao contrário de um estudo anterior, não foi observada uma menor quantidade da bactéria *Veillonella* no GFC (DUYTSCHAEVER *et al.*, 2013b).

A correlação negativa encontrada entre as bactérias *Veillonella* e *E. rectale* mostra que a diminuição de uma bactéria é condicionada pelo aumento de outra, por outro lado *Bacteroides* tem sido positivamente correlacionada com *L. paracasei*.

Quando subdividido o GFC em FCAB e FCnAB e comparado com os microrganismos foi observado uma alteração na microbiota intestinal. Os microrganismos *Bacteroides*, *E. rectale*, *F. prausnitzii*, *Bifidobacterium* e Firmicutes estão significativamente reduzidos principalmente quando comparado o grupo FCAB com GC. Enquanto os microrganismos *E. coli*, *C. difficile* e *P. aeruginosa* estão aumentados em FCAB em relação ao GC. Vale ressaltar que esta alteração na microbiota intestinal também está presente no FCnAB.

No estudo realizado por BURKE, FOUHY, *et al.* (2017) (BURKE, FOUHY, *et al.*) também foram encontradas alterações na microbiota intestinal de adultos com FC. Ao contrário do presente estudo, no estudo de Burk (2017) (BURKE, FOUHY, *et al.*) houve um aumento no filo Firmicutes e uma diminuição nos *Bacteriodes*. Por outro lado, os resultados encontrados por Bruzzese (2014) (BRUZZESE *et al.*) em um estudo com crianças com FC foram semelhantes ao presente estudo. Esta diferença pode ser decorrente não apenas da

metodologia utilizada, mas devido ao fato de a faixa etária das populações serem diferentes, o que consequentemente influencia a composição da microbiota intestinal.

*E. rectale*, *F. prausnitzii* e *Bifidobacterium* são considerados marcadores de uma microbiota saudável, uma vez que a redução deles pode afetar a nutrição dos enterócitos e consequentemente a manutenção da saúde intestinal (RUSSELL *et al.*, 2011; FLINT *et al.*, 2012).

No estudo de Hoffman (2014) (HOFFMAN *et al.*) com crianças com FC, houve um aumento significativo na *E. coli* neste grupo e no estudo realizado por Miragoli (2017) (MIRAGOLI *et al.*) (10 a 22 anos de idade), apesar de estar aumentando no GFC, a diferença não foi significativa em relação ao GC. O aumento da presença de *E. coli* tem sido relacionado à disbiose, e em pacientes com FC, sendo que a abundância da mesma pode ser devido à diminuição da motilidade e/ou acúmulo de muco (DE LISLE e BOROWITZ, 2013). Evidências sugerem que as alterações que ocorrem no lúmen intestinal durante a inflamação podem aumentar a capacidade da *E. coli* em colonizar a mucosa intestinal e induzir inflamação (HOFFMAN *et al.*, 2014). Hoffman (2017) (HOFFMAN *et al.*, 2014) sugere que *E. coli* pode servir como marcador e causa de disfunção e doença do trato gastrointestinal nesta população.

*C. difficile* é considerado a principal entero-patógeno da diarreia associada aos antibióticos e é responsável por casos de colite pseudomembranosa (LEFFLER e LAMONT, 2015; BURKE, HARRISON, *et al.*, 2017) e seu aumento no FCAB no presente estudo mostra a relação entre a antibioticoterapia e esta bactéria patogênica.

Os protocolos clínicos consideraram a *P. aeruginosa* como a mais agressiva em relação à função pulmonar entre as principais bactérias patogênicas para FC, porém a presença e a influência do mesmo na microbiota intestinal dessa população não foram estudadas. Um estudo observou que *P. aeruginosa* é a espécie mais frequentemente identificada nas fezes de pacientes com síndrome do intestino irritável e pode estar envolvida na fisiopatologia desta doença (KERCKHOFFS *et al.*, 2011), mostrando que também pode estar relacionada à disbiose intestinal.

Os microrganismos avaliados no presente estudo foram selecionados com base na literatura devido à sua influência na manutenção da saúde intestinal e à relação com a FC, sendo esta uma limitação considerando que a microbiota dessa população não foi avaliada globalmente.



## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da suplementação com simbiótico sobre os marcadores da resposta inflamatória sistêmica e a composição da microbiota intestinal de crianças e adolescentes com FC.

A suplementação com o simbiótico testada na presente investigação mostrou-se promissora ao diminuir os marcadores pró-inflamatórios IL-6, IL-8 e NOx em crianças e adolescentes com FC. No entanto, são necessários estudos com um tamanho de amostra maior e um período de avaliação superior a 90 dias para que se possa obter uma melhor compreensão dos efeitos do simbiótico nesta população.

Os efeitos do simbiótico nos biomarcadores avaliados neste estudo podem ter sido limitados devido ao tempo de suplementação (90 dias), bem como devido aos métodos de avaliação utilizados. A avaliação no soro de marcadores inflamatórios, ao contrário de alguns estudos avaliados no trato gastrointestinal, foi realizada com o objetivo de avaliar os efeitos do simbiótico de forma sistêmica. Embora as alterações encontradas sejam pequenas, o efeito a longo prazo que o simbiótico pode ter deve ser considerado. Outra limitação deste estudo, foi que ao se avaliar a microbiota intestinal, foram selecionados alguns microrganismos com base na literatura, não tendo sido avaliado a microbiota como um todo. Como pontos fortes, têm-se o design do estudo, o tamanho da amostra considerando a dificuldade de aderência à suplementação nesta população e a precisão dos métodos utilizados.

A segunda etapa do estudo reforça que a inflamação intestinal está presente em pacientes com FC e que a presença da doença juntamente com a antibióticoterapia está relacionada a alterações na microbiota intestinal. O aumento da presença de *P. aeruginosa* na microbiota intestinal, bem como o fato de ter precedido a colonização pulmonar, deve ser mais amplamente estudado para entender os mecanismos, bem como os danos que pode causar.

A presença de inflamação na FC está descrita na literatura e estratégias são necessárias para atenuar esse processo, a fim de diminuir o consequente dano pulmonar, as alterações gastrointestinais e a influência negativa sobre o estado nutricional dos pacientes.

A aprendizagem da técnica de FISH assim como a realização da mesma para a avaliação da microbiota intestinal da população estudada no *Laboratorio di Infettivologia, Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università Degli Studi di Napoli – Federico II* (Nápoles, Itália), durante o período do doutorado sanduíche, além de contribuir

para a formação acadêmica e profissional, promoveu a internacionalização do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da UFSC, proporcionando futuras oportunidades de intercâmbio estudantil.

## 9 CONCLUSÕES

- A suplementação não foi efetiva na melhora da função pulmonar e do estado nutricional dos pacientes com FC.
- A suplementação com o simbiótico testada na presente investigação diminuiu os marcadores pró-inflamatórios IL-6, IL-8 e NOx em crianças e adolescentes com FC.
- O presente estudo reforça que a inflamação intestinal está presente em pacientes com FC e que a presença da doença juntamente com a antibióticoterapia está relacionada a anormalidades na microbiota intestinal.
- Os microrganismos *Bacteroides*, Firmicutes, *E. rectale* e *F. prausnitzii* estavam significativamente diminuídos na FC, enquanto as bactérias *C. difficile*, *E. coli* e *P. aeruginosa* estavam significativamente aumentadas na FC.
- O efeito da terapia antibiótica foi evidente quando associado a microrganismos intestinais como *E. rectale*, *Bifidobacterium*, *E. coli*, Firmicutes, *P. aeruginosa* e *C. difficile*.
- A correlação encontrada entre o IMC e o microrganismo *Bifidobacterium*, mostra uma possível associação da composição da microbiota intestinal com o estado nutricional.
- O tipo de aleitamento materno também foi associado ao microrganismo Firmicutes, o que mostra uma possível influencia do mesmo sobre a composição da microbiota intestinal.





## REFERÊNCIA

ABREU, M. T.; FUKATA, M.; ARDITI, M. TLR signaling in the gut in health and disease. **J Immunol**, v. 174, p. 7, 2005.

ADDE, F. V.; RODRIGUES, J. C.; CARDOSO, A. L. Seguimento nutricional de pacientes com fibrose cística: papel do aconselhamento nutricional. **J Pediatr**, v. 80, p. 475-482, 2004.

AFACAN, N. J.; FJELL, C. D.; HANCOCK, R. E. A systems biology approach to nutritional immunology - focus on innate immunity. **Mol Aspects Med**, v. 33, n. 1, p. 14-25, 2012.

ALFALEH, K. et al. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, 2011.

ANDERSEN, D. H. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study. **American Journal of Diseases of Children** v. 56, n. 2, p. 344-399, 1938.

APONTE, G. B. et al. Probiotics for treating persistent diarrhoea in children. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 11, 2013.

ARMSTRONG, D. S. et al. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. **Pediatr Pulmonol**, v. 40, n. 6, p. 10, 2005.

ATHANAZIO, R. A. et al. Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. **J bras pneumol**, v. 43, p. 219-245, 2017.

AZAD, M. B. et al. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. **BJOG**, v. 123, n. 6, p. 983-93, 2016.

BAARLEN, P. et al. Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. **PNAS**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4562-4569, 2011.

BAARLEN, P.; WELLS, J. M.; KLEEREBEZEM, M. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. **Trends Immunol**, v. 34, n. 5, p. 208-15, 2013.

BALS, R. et al. Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid. **Am J Respir Cell Mol Biol** v. 25, n. 1, p. 21-5, 2001.

BARNES, P. J. Transcription factors in airway diseases. **Lab Invest**, v. 86, n. 9, p. 867-72, 2006.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **NEJM**, v. 336, n. 15, p. 1066-71, 1997.

BARRETT, P. M.; ALAGELY, A.; TOPOL, E. J. Cystic fibrosis in an era of genomically guided therapy. **Hum Mol Genet**, v. 21, n. R1, p. R66-71, 2012.

BENGMARK, S.; MARTINDALE, R. Prebiotics and synbiotics in clinical medicine. **Nutr Clin Pract**, v. 20, n. 2, p. 244-61, 2005.

BERGER, M. Y. Inflammatory mediators in cystic fibrosis lung disease. **Allergy Asthma Proc**, v. 23, n. 1, p. 19-25, 2002.

BERRINGTON, J. E. et al. Gut microbiota in preterm infants: assessment and relevance to health and disease. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 98, n. 4, p. F286-90, 2013.

BHATTACHARYA, K.; WOTTON, T.; WILEY, V. The evolution of blood-spot newborn screening. **Transl Pediatr**, v. 3, n. 2, p. 63-70, 2014.

BLACKMAN, S. M. et al. Relative contribution of genetic and nongenetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. **Gastroenterol**, v. 131, n. 4, p. 1030-9, 2006.

BOROWITZ, D.; BAKER, R. D.; STALLINGS, V. Consensus report on nutrition for pediatric patients with cystic fibrosis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 35, n. 3, p. 246-59, 2002.

BOROWITZ, D. S.; GRAND, R. J.; DURIE, P. R. Use of pancreatic enzyme supplements for patients with cystic fibrosis in the context of fibrosing colonopathy. Consensus Committee. **J Pediatr**, v. 127, n. 5, p. 681-4, 1995.

BOUHNİK, Y. et al. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. **J Nutr**, v. 127, n. 3, p. 444-8, 1997.

BOYLE, R. J. et al. Effects of Lactobacillus GG treatment during pregnancy on the development of fetal antigen-specific immune responses. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 12, p. 1882-90, 2008.

BRENNAN, A. L. et al. Clinical importance of cystic fibrosis-related diabetes. **J Cyst Fibros**, v. 3, n. 4, p. 209-22, 2004.

BRON, P. A. et al. Lactobacillus plantarum possesses the capability for wall teichoic acid backbone alditol switching. **Microb Cell Fact**, v. 11, p. 123, 2012.

BROWNAWELL, A. M. et al. Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research, and goals. **J Nutr**, v. 142, n. 5, p. 962-74, 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, n. 2, p. e87796, 2014.

BRUZZESE, E. et al. Intestinal inflammation is a frequent feature of cystic fibrosis and is reduced by probiotic administration. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 20, n. 7, p. 813-819, 2004.

BRUZZESE, E. et al. Effect of Lactobacillus GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: A pilot study. **Clin Nutr**, v. 26, n. 3, p. 322-328, 2007.

- BURKE, D. G. et al. The altered gut microbiota in adults with cystic fibrosis. **BMC microbiol**, v. 17, n. 1, p. 58, 2017.
- BURKE, D. G. et al. Clostridium difficile carriage in adult cystic fibrosis (CF); implications for patients with CF and the potential for transmission of nosocomial infection. **J Cyst Fibros**, v. 16, n. 2, p. 291-298, 2017.
- BUSCHER, R.; GRASEMANN, H. Disease modifying genes in cystic fibrosis: therapeutic option or one-way road? **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 374, n. 2, p. 65-77, 2006.
- CABALLERO-FRANCO, C. et al. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 292, p. 7, 2007.
- CALDER, P. C. et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. **Br J Nutr**, v. 101 Suppl 1, p. S1-45, 2009.
- CALVERT, J. W. Cardioprotective effects of nitrite during exercise. **Cardiovasc Res**, v. 89, n. 3, p. 499-506, 2011.
- CARLYLE, B. E.; BOROWITZ, D. S.; GLICK, P. L. A review of pathophysiology and management of fetuses and neonates with meconium ileus for the pediatric surgeon. **J Pediatr Surg**, v. 47, n. 4, p. 772-81, 2012.
- CARRAWAY, M. S. et al. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 167, n. 9, p. 1200-9, 2003.
- CEAPA, C. et al. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 27, n. 1, p. 139-55, 2013.
- CEBRA, J. J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. **Am J Clin Nutr**, v. 69, p. 5, 1999.
- CHANDRA, R. K. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical

application of ameliorating suffering and improving survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 25, p. 14304-7, 1996.

CHEN, E. Y. et al. A new role for bicarbonate in mucus formation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 299, n. 4, p. L542-9, 2010.

CHMIEL, J. F.; BERGER, M.; KONSTAN, M. W. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 23, n. 1, p. 5-27, 2002.

CHMIEL, J. F.; KONSTAN, M. W. Inflammation and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis. **Clin Chest Med**, v. 28, p. 15, 2007.

CHMIEL, J. F. et al. Prolonged inflammatory response to acute *Pseudomonas* challenge in interleukin-10 knockout mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, n. 8, p. 1176-81, 2002.

CIPOLLI, M. et al. Pancreatic phenotype in infants with cystic fibrosis identified by mutation screening. **Arch Dis Child**, v. 92, n. 10, p. 842-6, 2007.

CLAEYS, S. et al. Nasal polyps in patients with and without cystic fibrosis: a differentiation by innate markers and inflammatory mediators. **Clin Exp Allergy**, v. 35, n. 4, p. 5, 2005.

COHEN, J. A power primer. **Psychol Bull**, v. 112, n. 1, p. 155-9, 1992.

COLLIE, J. T. et al. Sixty-five years since the New York heat wave: advances in sweat testing for cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v. 49, n. 2, p. 106-17, 2014.

COLOMBO, C. et al. Guidelines for the diagnosis and management of distal intestinal obstruction syndrome in cystic fibrosis patients. **J Cyst Fibros**, v. 10 Suppl 2, p. S24-8, 2011.

COMMANE, D. M. et al. Effects of fermentation products of pro- and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an in vitro model of the colon. **Nutr Cancer**, v. 51, n. 1, p. 102-9, 2005.

CONESE, M. et al. Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. **J Cyst Fibros**, v. 2, n. 3, p. 6, 2003.

CORVOL, H. et al. Genetic variations in inflammatory mediators influence lung disease progression in cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v. 43, p. 8, 2008.

COURTNEY, J. M.; ENNIS, M.; ELBORN, J. S. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. **J Cyst Fibros**, v. 3, n. 4, p. 8, 2004.

COX, M. J. et al. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11044, 2010.

DAIMS, H. et al. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. **Syst Appl Microbiol**, v. 22, n. 3, p. 434-44, 1999.

DALCIN, P. D. T. R.; ABREU E SILVA, F. A. D. Fibrose cística no adulto: aspectos diagnósticos e terapêuticos. **J Bras Pneumol**, v. 34, p. 107-117, 2008.

DANG, D. et al. Meta-analysis of probiotics and/or prebiotics for the prevention of eczema. **J Int Med Res**, v. 41, n. 5, p. 1426-36, 2013.

DATABASE, C. F. M. **Cystic fibrosis mutation database statistics, 2013.**

DAVIES, D. E. et al. Airway remodeling in asthma: new insights. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 2, p. 215-25; quiz 226, 2003.

DAVIS, P. B. Cystic fibrosis since 1938. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 173, p. 7, 2006.

DAVIS, P. B.; DRUMM, M.; KONSTAN, M. W. Cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 154, n. 5, p. 1229-56, 1996.

DE BOECK, K. et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. **Thorax**, v. 61, n. 7, p. 627-35, 2006.

DE JONG, E.; SUDDASON, T.; LORD, G. M. Translational mini-review series on Th17 cells: development of mouse and human T helper 17 cells. **Clin Exp Immunol**, v. 159, n. 2, p. 148-58, 2010.

DE LISLE, R. C. Altered transit and bacterial overgrowth in the cystic fibrosis mouse small intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 293, n. 1, p. G104-11, 2007.

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

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, 2014.

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**, 2014.

DETHLEFSEN, L. et al. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **PLoS Biol**, v. 6, n. 11, p. e280, 2008.

DHALIWAL, J. et al. Intestinal inflammation and impact on growth in children with cystic fibrosis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 60, n. 4, p. 521-6, 2015.

DI NARDO, G. et al. *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 in cystic fibrosis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 58, n. 1, p. 81-86, 2014.

DI SANT'AGNESE, P. A. et al. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. **Pediatrics** v. 12, n. 5, p. 549-63, 1953.

DI SANT'AGNESE P. E.; ANDERSEN, D. H. Celiac syndrome; chemotherapy in infections of the respiratory tract associated with cystic fibrosis of the pancreas; observations with penicillin and drugs of the

- sulfonamide group, with special reference to penicillin aerosol. **Am J Dis Child**, v. 72, p. 17-61, 1946.
- DIMANGO, E. et al. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. **J Clin Invest**, v. 101, n. 11, p. 2598-605, 1998.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-8, 2000.
- DODGE, J. A.; TURCK, D. Cystic fibrosis: nutritional consequences and management. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 20, n. 3, p. 531-46, 2006.
- DOLL, D. N.; BARR, T. L.; SIMPKINS, J. W. Cytokines: their role in stroke and potential use as biomarkers and therapeutic targets. **Aging Dis**, v. 5, n. 5, p. 294-306, 2014.
- DOWNEY, D. G.; BELL, S. C.; ELBORN, J. S. Neutrophils in cystic fibrosis. **Thorax**, v. 64, n. 1, p. 81-88, 2009.
- DUYTSCHAEVER, G. et al. Dysbiosis of bifidobacteria and *Clostridium* cluster XIVa in the cystic fibrosis fecal microbiota. **J Cyst Fibros**, v. 12, n. 3, p. 206-215, 2013a.
- \_\_\_\_\_. Dysbiosis of bifidobacteria and *Clostridium* cluster XIVa in the cystic fibrosis fecal microbiota. **J Cyst Fibros**, v. 12, n. 3, p. 206-15, 2013b.
- EDLUND, C. et al. Comparative effects of moxifloxacin and clarithromycin on the normal intestinal microflora. **Scand J Infect Dis**, v. 32, n. 1, p. 81-5, 2000.
- EIGEN, H. et al. A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Prednisone Trial Group. **J Pediatr**, v. 126, n. 4, p. 515-23, 1995.
- ELIZUR, A.; CANNON, C. L.; FERKOL, T. W. Airway inflammation in cystic fibrosis. **Chest**, v. 133, n. 2, p. 489-95, 2008.



- EWASCHUK, J. B. et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 295, n. 5, p. G1025-34, 2008.
- FAGERBERG, U. L. et al. Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 37, n. 4, p. 468-72, 2003.
- FALLAHI, G. et al. The effect of probiotics on fecal calprotectin in patients with cystic fibrosis. **Turk J Pediatr**, v. 55, n. 5, p. 475-478, 2013.
- FALONY, G. et al. Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 12, p. 7835-41, 2006.
- FAO/WHO, W. G. R. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London Ontario, Canada. 2002.
- FARBER, S.; SHWACHMAN, H.; MADDOCK, C. L. Pancreatic function and disease in early life. I. Pancreatic enzyme activity and the celiac syndrome. **J Clin Invest**, v. 22, n. 6, p. 827-38, 1943.
- FARRELL, P. M. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. **J Cyst Fibros**, v. 7, n. 5, p. 450-3, 2008.
- FERANCHAK, A. P. et al. Prospective, long-term study of fat-soluble vitamin status in children with cystic fibrosis identified by newborn screen. **J Pediatr**, v. 135, n. 5, p. 601-10, 1999.
- FLINT, H. J. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 10, p. 577-89, 2012.
- FLUME, P. A.; VAN DEVANTER, D. R. State of progress in treating cystic fibrosis respiratory disease. **BMC Med**, v. 10, p. 88, 2012.
- FRIDGE, J. L. et al. Risk factors for small bowel bacterial overgrowth in cystic fibrosis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 44, n. 2, p. 212-8, 2007.

FRISANCHO, A. R. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. **Am J Clin Nutr**, v. 34, n. 11, p. 2540-5, 1981.

FUJIMURA, K. et al. CD4 T cell-intrinsic IL-2 signaling differentially affects Th1 and Th17 development. **J Leukoc Biol**, v. 94, n. 2, p. 271-9, 2013.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v. 32, n. 4, p. 439-42, 1991.

GARCIA, K. C.; TEYTON, L.; WILSON, I. A. Structural basis of T cell recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 369-97, 1999.

GBEFC. **Registro Brasileiro de Fibrose Cística**: Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística: 29 p. 2011.

GELFOND, D.; BOROWITZ, D. Gastrointestinal complications of cystic fibrosis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 4, p. 333-342, 2013.

GIANOTTI, L. et al. A randomized double-blind trial on perioperative administration of probiotics in colorectal cancer patients. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 2, p. 167-75, 2010.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutr Res Ver**, v. 17, n. 2, p. 259-75, 2004.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J Nutr**, v. 125, n. 6, p. 1401-12, 1995.

GIBSON, L. E.; COOKE, R. E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. **Pediatrics**, v. 23, n. 3, p. 545-9, 1959.

GIBSON, R. L.; BURNS, J. L.; RAMSEY, B. W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 168, n. 8, p. 918-51, 2003.

GILLIGAN, P. H.; KISKA, D. L.; APPLEMAN, M. D. **Cumitech 43: Cystic Fibrosis Microbiology**. Coordinating ed., M. D. Appleman. Washington, D.C: ASM Press, 2006. 72.

GOLDENBERG, J. Z. et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 5, 2013.

GOVAN, J. R.; DERETIC, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiol rev**, v. 60, n. 3, p. 539-74, 1996.

GRANUCCI, F. et al. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. **J Immunol**, v. 170, n. 10, p. 5075-81, 2003.

GRANUCCI, F. et al. The immune response is initiated by dendritic cells via interaction with microorganisms and interleukin-2 production. **J Infect Dis**, v. 187 Suppl 2, p. S346-50, 2003.

GRASSME, H. et al. CFTR-dependent susceptibility of the cystic fibrosis-host to *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Med Microbiol**, v. 300, n. 8, p. 578-83, 2010.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-8, 1982.

GROENEWEG, M. et al. Assessment of nutritional status in children with cystic fibrosis: conventional anthropometry and bioelectrical impedance analysis. A cross-sectional study in Dutch patients. **J Cyst Fibros**, v. 1, n. 4, p. 276-80, 2002.

GROSSMAN, S.; GROSSMAN, L. C. Pathophysiology of cystic fibrosis: implications for critical care nurses. **Crit care nurse**, v. 25, n. 4, p. 46-51, 2005.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512-9, 2003.

GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cell signal**, v. 13, n. 2, p. 85-94, 2001.

- HAACK, A.; ARAGÃO, G. G.; NOVAES, M. R. C. G. Pathophysiology of cystic fibrosis and drugs used in associated digestive tract diseases. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 46, p. 8552-8561, 2013.
- HAACK, A.; NOVAES, M. R. G. Clinical and nutritional aspects of cystic fibrosis patients assisted by a home enteral nutrition program in Brazil. **Rev chil nutr**, v. 40, p. 112-118, 2013.
- HANSEN, C. R. et al. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. **J Cyst Fibros**, v. 9, n. 1, p. 51-8, 2010.
- HAO, Q. et al. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 9, 2011.
- HAWRELAK, J. A.; MYERS, S. P. The causes of intestinal dysbiosis: a review. **Altern Med Rev**, v. 9, n. 2, p. 180-97, 2004.
- HEMPEL, S. et al. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. **Jama**, v. 307, n. 18, p. 1959-69, 2012.
- HERALD, M. C. General model of inflammation. **Bull Math Biol**, v. 72, n. 4, p. 765-79, 2010.
- HOARAU, C. et al. Supernatant from *bifidobacterium* differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. e2753, 2008.
- 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. 396-399, 2014.
- HOLSCHER, H. D. et al. *Bifidobacterium lactis* Bb12 enhances intestinal antibody response in formula-fed infants: a randomized, double-blind, controlled trial. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 36, n. 1 Suppl, p. 106s-17s, 2012.
- HOOPER, L. V. et al. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. **Nat immunol**, v. 4, n. 3, p. 269-73, 2003.

HUBEAU, C. et al. Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. **Clin Exp Immunol**, v. 124, n. 1, p. 69-76, 2001.

HUSSAIN, S. Z. et al. Clostridium difficile colitis in children with cystic fibrosis. **Dig Dis Sci**, v. 49, n. 1, p. 116-21, 2004.

HUTCHISON, M. L.; GOVAN, J. R. W. Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. **Microbes Infect**, v. 1, n. 12, p. 1005-1014, 1999.

IANNITTI, T.; PALMIERI, B. Therapeutic use of probiotic formulations in clinical practice. **Clin Nutr**, v. 29, n. 6, p. 701-25, 2010.

IAPICHINO, G. et al. Impact of antibiotics on the gut microbiota of critically ill patients. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 8, p. 1007-14, 2008.

INFANTE PINA, D. et al. Improvement of intestinal function in cystic fibrosis patients using probiotics. **Optimización de la función intestinal en pacientes con fibrosis quística mediante la administración de probióticos** v. 69, n. 6, p. 501-505, 2008.

ISMAIL, I. H. et al. Reduced gut microbial diversity in early life is associated with later development of eczema but not atopy in high-risk infants. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 23, n. 7, p. 674-81, 2012.

IVANOV, II et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485-98, 2009.

IVANOV, D. et al. A serpin from the gut bacterium Bifidobacterium longum inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. **J Biol Chem**, v. 281, n. 25, p. 17246-52, 2006.

JAFARI, S. A. et al. Effects of probiotics on quality of life in children with cystic fibrosis; A randomized controlled trial. **Iran J Pediatr**, v. 23, n. 6, p. 669-674, 2013.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JAT, K. R. Spirometry in children. **Primary care respiratory journal : journal of the General Practice Airways Group** v. 22, n. 2, p. 221-9, 2013.

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **J Intensive Care Med**, v. 22, n. 2, p. 63-72, 2007.

JERNBERG, C. et al. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. **ISME J**, v. 1, n. 1, p. 56-66, 2007.

JOHNSTON, B. C. et al. Probiotics for the Prevention of Clostridium difficile–Associated DiarrheaA Systematic Review and Meta-analysis. **Ann Intern Med**, v. 157, n. 12, p. 878-888, 2012.

KARCZEWSKI, J. et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 298, n. 6, p. G851-9, 2010.

KEILBAUGH, S. A. et al. Activation of RegIIIbeta/gamma and interferon gamma expression in the intestinal tract of SCID mice: an innate response to bacterial colonisation of the gut. **Gut**, v. 54, n. 5, p. 623-9, 2005.

KELLY, D.; DELDAY, M. I.; MULDER, I. Microbes and microbial effector molecules in treatment of inflammatory disorders. **Immunol Rev**, v. 245, n. 1, p. 27-44, 2012.

KERCKHOFFS, A. P. M. et al. Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of Pseudomonas aeruginosa in irritable bowel syndrome. **J Med Microbiol**, v. 60, n. 2, p. 236-245, 2011.

KEREM, B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1073-80, 1989.

KEREM, E. et al. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. **J Cyst Fibros**, v. 4, n. 1, p. 7-26, 2005.

KIENINGER, E.; REGAMEY, N. Targeting inflammation in cystic fibrosis. **Respiration** v. 79, n. 3, p. 189-90, 2010.

KONIKOFF, M. R.; DENSON, L. A. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, n. 6, p. 524-34, 2006.

KONSTAN, M. W. et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. **J Pediatr**, v. 151, n. 2, p. 134-9, 139.e1, 2007.

KONSTAN, M. W.; STERN, R. C.; DOERSHUK, C. F. Efficacy of the Flutter device for airway mucus clearance in patients with cystic fibrosis. **J Pediatr**, v. 124, n. 5 Pt 1, p. 689-93, 1994.

KONSTANTINOV, S. R. et al. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 49, p. 19474-9, 2008.

KRAYNACK, N. C. et al. Mechanisms of NOS2 regulation by Rho GTPase signaling in airway epithelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 283, n. 3, p. L604-11, 2002.

KUBE, D. et al. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 280, n. 3, p. L493-502, 2001.

KUBE, D. M.; FLETCHER, D.; DAVIS, P. B. Relation of exaggerated cytokine responses of CF airway epithelial cells to PAO1 adherence. **Respir Res**, v. 6, p. 69, 2005.

LAFYATIS, R. Transforming growth factor beta-at the centre of systemic sclerosis. **Nat Rev Rheumatol**, 2014.

LAHIRI, T. et al. Clinical Practice Guidelines From the Cystic Fibrosis Foundation for Preschoolers With Cystic Fibrosis. **Pediatrics**, v. 137, n. 4, 2016.

LANE, M. M. et al. Reliability and validity of a modified Bristol Stool Form Scale for children. **J Pediatr**, v. 159, n. 3, p. 437-441.e1, 2011.

LEBEER, S. et al. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 1, p. 185-93, 2012.

LEE, J. et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. **Nat cell biol**, v. 8, n. 12, p. 1327-36, 2006.

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

LEFFLER, D. A.; LAMONT, J. T. Clostridium difficile infection. **N Engl J Med**, v. 372, n. 16, p. 1539-1548, 2015.

LEWIN, L. O.; BYARD, P. J.; DAVIS, P. B. Effect of *Pseudomonas cepacia* colonization on survival and pulmonary function of cystic fibrosis patients. **J Clin Epidemiol**, v. 43, n. 2, p. 125-31, 1990.

LI, J. et al. Signaling intermediates required for NF-kappa B activation and IL-8 expression in CF bronchial epithelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 284, n. 2, p. L307-15, 2003.

LIEW, F. Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunol lett**, v. 85, n. 2, p. 131-4, 2003.

LIPUMA, J. J. et al. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. **Lancet**, v. 336, n. 8723, p. 1094-6, 1990.

LISOWSKA, A.; WÓJTOWICZ, J.; WALKOWIAK, J. Small intestine bacterial overgrowth is frequent in cystic fibrosis: Combined hydrogen and methane measurements are required for its detection. **Acta Biochim Pol**, v. 56, n. 4, p. 631-634, 2009.

LITTLEWOOD, J. M.; WOLFE, S. P.; CONWAY, S. P. Diagnosis and treatment of intestinal malabsorption in cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v. 41, n. 1, p. 35-49, 2006.



LLOYD-STILL, J. D. et al. The effect of intestinal permeability on pancreatic enzyme-induced enteropathy in the rat. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 26, n. 5, p. 489-95, 1998.

LOEVE, M. et al. Bronchiectasis and pulmonary exacerbations in children and young adults with cystic fibrosis. **Chest**, v. 140, n. 1, p. 178-85, 2011.

LOHNER, S. et al. Probiotics in healthy infants and children for prevention of acute infectious diseases: a systematic review and meta-analysis. **Nutr Rev**, v. 72, n. 8, p. 523-31, 2014.

LOMAX, A. R.; CALDER, P. C. Probiotics, immune function, infection and inflammation: A review of the evidence. **Br J Nutr**, v. 101, n. 5, p. 633-658, 2009.

LOO, J. et al. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 35, n. 6, p. 525-52, 1995.

LU, R. et al. Isolation, identification, and characterization of small bioactive peptides from *Lactobacillus GG* conditional media that exert both anti-Gram-negative and Gram-positive bactericidal activity. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 49, n. 1, p. 23-30, 2009.

LUBAMBA, B. et al. Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. **Clin Biochem**, v. 45, n. 15, p. 1132-1144, 2012.

LUPTON, J. R. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. **J Nutr**, v. 134, n. 2, p. 479-82, 2004.

LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med**, v. 338, n. 7, p. 436-45, 1998.

LYNCH, S. V.; BRUCE, K. D. The cystic fibrosis airway microbiome. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 3, p. a009738, 2013.

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

MACHEN, T. E. Innate immune response in CF airway epithelia: Hyperinflammatory? **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 291, n. 2, p. C218-C230, 2006.

MACPHERSON, A. J.; UHR, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. **Science**, v. 303, n. 5664, p. 1662-5, 2004.

MADAN, J. C. Neonatal Gastrointestinal and Respiratory Microbiome in Cystic Fibrosis: Potential Interactions and Implications for Systemic Health. **Clin Ther**, v. 38, n. 4, p. 740-6, 2016.

MADAN, J. C. et al. Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: Interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. **mBio**, v. 3, n. 4, 2012.

MATEL, J. L.; MILLA, C. E. Nutrition in cystic fibrosis. **Seminars in respiratory and critical care medicine** v. 30, n. 5, p. 579-86, 2009.

MATSUGUCHI, T. et al. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 10, n. 2, p. 259-66, 2003.

MATTHEWS, W. J., JR. et al. Hypogammaglobulinemia in patients with cystic fibrosis. **N Engl J Med**, v. 302, n. 5, p. 245-9, 1980.

MAZMANIAN, S. K. et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 107-18, 2005.

MCALLISTER, F. et al. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. **J Immunol**, v. 175, n. 1, p. 404-12, 2005.

MCDONALD, C. M. Validation of a nutrition risk screening tool for children and adolescents with cystic fibrosis ages 2-20 years. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 46, n. 4, p. 438-46, 2008.

MCFARLAND, L. V. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. **Anaerobe**, v. 15, n. 6, p. 274-80, 2009.

MILLER, L. E.; OUWEHAND, A. C. Probiotic supplementation decreases intestinal transit time: meta-analysis of randomized controlled trials. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 29, p. 4718-25, 2013.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 10, p. 763-76, 2012.

MIRAGOLI, F. et al. Impact of cystic fibrosis disease on archaea and bacteria composition of gut microbiota. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 93, n. 2, 2017.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

MITSUMA, T. et al. Enhancement of gene expression by a peptide p(CHWPR) produced by *Bifidobacterium lactis* BB-12. **Microbiol Immunol**, v. 52, n. 3, p. 144-55, 2008.

MOAYYEDI, P. et al. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. **Gut**, v. 59, n. 3, p. 325-32, 2010.

MORRIS, N.; UDRY, J. R. Validation of a self-administered instrument to assess stage of adolescent development. **J Youth Adolescence**, v. 9, n. 3, p. 271-280, 1980.

MUHLEBACH, M. S. et al. Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 1, p. 186-91, 1999.

MURRAY, J. F. The ketchup-bottle method. **N Engl J Med**, v. 300, n. 20, p. 1155-7, 1979.

NOAH, T. L. et al. Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. **J Infect Dis**, v. 175, n. 3, p. 638-47, 1997.

NORKINA, O.; BURNETT, T. G.; DE LISLE, R. C. Bacterial overgrowth in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator null mouse small intestine. **Infect Immun**, v. 72, n. 10, p. 6040-9, 2004.

NOVERR, M. C.; HUFFNAGLE, G. B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? **Trends Microbiol**, v. 12, n. 12, p. 562-8, 2004.

O'DONNELL, D. H. et al. Hepatocellular carcinoma complicating cystic fibrosis related liver disease. **J Cyst Fibros**, v. 8, n. 4, p. 288-90, 2009.

O'SULLIVAN, B. P.; FREEDMAN, S. D. Cystic fibrosis. **Lancet**, v. 373, n. 9678, p. 1891-904, 2009.

O'SULLIVAN, S. T. et al. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. **Ann Surg**, v. 222, n. 4, p. 482-90; discussion 490-2, 1995.

OBERHOLZER, A. et al. Increased survival in sepsis by in vivo adenovirus-induced expression of IL-10 in dendritic cells. **J Immunol**, v. 168, n. 7, p. 3412-8, 2002.

OERMANN, C. M.; SOCKRIDER, M. M.; KONSTAN, M. W. The use of anti-inflammatory medications in cystic fibrosis: trends and physician attitudes. **Chest**, v. 115, n. 4, p. 1053-8, 1999.

OOBOSHI, H. et al. Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. **Circulation**, v. 111, n. 7, p. 913-9, 2005.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biol**, v. 5, n. 7, p. e177, 2007.

PANAGOPOULOU, P. et al. Prevalence of malnutrition and obesity among cystic fibrosis patients. **Pediatr Int**, v. 56, n. 1, p. 89-94, 2014.

PARK, R. W.; GRAND, R. J. Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis: a review. **Gastroenterol**, v. 81, n. 6, p. 1143-61, 1981.

PARRILLO, J. E. et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann Intern Med**, v. 113, n. 3, p. 227-42, 1990.

PELLEGRINO, R. et al. Interpretative strategies for lung function tests. **Eur Respir J**, v. 26, n. 5, p. 948-68, 2005.

PELUCCHI, C. et al. Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis. **Epidemiology**, v. 23, n. 3, p. 402-14, 2012.

PENDERS, J. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. 511-21, 2006.

PEREIRA, L. C. et al. Influence of inflammatory response, infection, and pulmonary function in cystic fibrosis. **Life Sci**, v. 109, n. 1, p. 30-6, 2014.

PINTO, D. L. D. **Adaptação e validação de um questionário de frequência alimentar para crianças de 6 a 10 anos**. 2009. 71 (Mestre). Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia: Metabolismo e Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PINTO, I. C. D. S.; SILVA, C. P. D.; BRITTO, M. C. A. D. Perfil nutricional, clínico e socioeconômico de pacientes com fibrose cística atendidos em um centro de referência no nordeste do Brasil. **J Bras Pneumol**, v. 35, p. 137-143, 2009.

PREIDIS, G. A.; VERSALOVIC, J. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. **Gastroenterol**, v. 136, n. 6, p. 2015-31, 2009.

PRUITT, J. H.; COPELAND, E. M., 3RD; MOLDAWER, L. L. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock. **Shock**, v. 3, n. 4, p. 235-51, 1995.

QUINTON, P. M. The neglected ion:  $\text{HCO}_3^-$ . **Nat Med**, v. 7, n. 3, p. 292-3, 2001.

\_\_\_\_\_. Role of epithelial  $\text{HCO}_3^-$  transport in mucin secretion: lessons from cystic fibrosis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 299, n. 6, p. C1222-33, 2010.

RAFII, F.; SUTHERLAND, J. B.; CERNIGLIA, C. E. Effects of treatment with antimicrobial agents on the human colonic microflora. **Ther Clin Risk Manag**, v. 4, n. 6, p. 1343-58, 2008.

RAIA, V. et al. Evidence of chronic inflammation in morphologically normal small intestine of cystic fibrosis patients. **Pediatr Res**, v. 47, n. 3, p. 344-50, 2000.

RAMSEY, B. W. et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. **N Engl J Med**, v. 365, n. 18, p. 1663-72, 2011.

RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723-41, 1993.

RATJEN, F. Changes in strategies for optimal antibacterial therapy in cystic fibrosis. **Int J Antimicrob Agents**, v. 17, n. 2, p. 93-6, 2001.

RATJEN, F.; DÖRING, G. Cystic fibrosis. **Lancet**, v. 361, n. 9358, p. 681-689, 2003.

RAUTAVA, S. et al. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 10, p. 565-76, 2012.

REGISTRY, C. F. F. P. Annual Data Report **Cystic Fibrosis Foundation**, p. 90, 2014. Disponível em: < <https://www.cff.org/2014-Annual-Data-Report.pdf> >.

REIS, F. J.; DAMACENO, N. [Cystic fibrosis]. **J Pediatr**, v. 74 Suppl 1, p. S76-94, 1998.

REUNANEN, J. et al. Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 7, p. 2337-44, 2012.

RIORDAN, J. R. CFTR function and prospects for therapy. **Annu Rev Biochem**, v. 77, p. 701-26, 2008.

RIORDAN, J. R. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1066-73, 1989.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British J Nutr**, v. 104 Suppl 2, p. S1-63, 2010.

ROBINSON, D. S. The Th1 and Th2 concept in atopic allergic disease. **Chem immunol**, v. 78, p. 50-61, 2000.

ROGERS, G. B. et al. Comparing the microbiota of the cystic fibrosis lung and human gut. **Gut Microbes**, v. 1, n. 2, p. 85-93, 2010.

ROGERS, G. B. et al. characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16s ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 5176-83, 2004.

ROLIM, A. L. et al. Ion channelopathies in endocrinology: recent genetic findings and pathophysiological insights. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54, n. 8, p. 673-81, 2010.

ROMMENS, J. M. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1059-65, 1989.

ROSA, F. R. et al. Fibrose cística: uma abordagem clínica e nutricional. **Rev Nutr**, v. 21, p. 725-737, 2008.

ROSENFELD, M.; RAMSEY, B. W.; GIBSON, R. L. Pseudomonas acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. **Curr Opin Pulm Med**, v. 9, n. 6, p. 492-7, 2003.

ROSENSTEIN, B. J.; EIGEN, H. Risks of alternate-day prednisone in patients with cystic fibrosis. **Pediatrics**, v. 87, n. 2, p. 245-6, 1991.

ROSENTHAL, M. Annual assessment spirometry, plethysmography, and gas transfer in cystic fibrosis: do they predict death or transplantation. **Pediatr Pulmonol**, v. 43, n. 10, p. 945-52, 2008.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 27, p. 12204-9, 2010.

ROWE, S. M.; VERKMAN, A. S. Cystic fibrosis transmembrane regulator correctors and potentiators. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 7, 2013.

RUSSELL, D. A. et al. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. **Int J Food Microbiol**, v. 149, n. 1, p. 88-105, 2011.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SAAVEDRA, J. et al. Gastro-intestinal function in infants consuming a weaning food supplemented with oligofructose, a prebiotic. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 29, n. 4, p. 513, 1999.

SABA, S. et al. Bacterial stimulation of epithelial G-CSF and GM-CSF expression promotes PMN survival in CF airways. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 27, n. 5, p. 561-7, 2002.

SABATI, A. A. et al. Characteristics of gastroesophageal reflux in adults with cystic fibrosis. **J Cyst Fibros**, v. 9, n. 5, p. 365-70, 2010.

SAGEL, S. D.; ACCURSO, F. J. Monitoring inflammation in CF. Cytokines. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 23, n. 1, p. 41-57, 2002.

SAGEL, S. D.; CHMIEL, J. F.; KONSTAN, M. W. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. **Proc Am Thorac Soc**, v. 4, n. 4, p. 406-17, 2007.



SALVATORE, D. et al. An overview of international literature from cystic fibrosis registries 2. Neonatal screening and nutrition/growth. **J Cyst Fibros**, v. 9, n. 2, p. 75-83, 2010.

SALVATORE, D. et al. An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 3. Disease incidence, genotype/phenotype correlation, microbiology, pregnancy, clinical complications, lung transplantation, and miscellanea. **J Cyst Fibros**, v. 10, n. 2, p. 71-85, 2011.

SANDERS, M. E. et al. Probiotics and prebiotics: prospects for public health and nutritional recommendations. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1309, p. 19-29, 2014.

SAWADA, N. et al. Tight junctions and human diseases. **Med Electron Microsc**, v. 36, n. 3, p. 147-56, 2003.

SCHIPPA, S. et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) allelic variants relate to shifts in faecal microbiota of cystic fibrosis patients. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61176, 2013.

SCHLEE, M. et al. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. **Clin Exp Immunol**, v. 151, n. 3, p. 528-35, 2008.

SCHMITT-GROHE, S. et al. Severe antibiotic-associated colitis in a patient with cystic fibrosis and colonic wall thickening. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 34, n. 2, p. 224-6, 2002.

SCHOLZ-AHRENS, K. E. et al. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. **J Nutr**, v. 137, n. 3 Suppl 2, p. 838s-46s, 2007.

SCHUNTER, M. et al. Randomized pilot trial of a synbiotic dietary supplement in chronic HIV-1 infection. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 84, 2012.

SEKIROV, I. et al. Gut microbiota in health and disease. **Physiol Rev**, v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010.

SETH, A. et al. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent

mechanism. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 294, n. 4, p. G1060-9, 2008.

SHABGAH, A. G.; FATTAHI, E.; SHAHNEH, F. Z. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. **Postepy Dermatol Alergol**, v. 31, n. 4, p. 256-61, 2014.

SHEPHERD, R. W. et al. Energy expenditure and the body cell mass in cystic fibrosis. **Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 22-5, 2001.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHUKLA, S. et al. Meta-analysis: the effects of gut flora modulation using prebiotics, probiotics and synbiotics on minimal hepatic encephalopathy. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 33, n. 6, p. 662-71, 2011.

SHWACHMAN, H.; KULCZYCKI, L. L. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis; studies made over a five- to fourteen-year period. **Am J Dis Child**, v. 96, n. 1, p. 6-15, 1958.

SILK, D. B. et al. Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 29, n. 5, p. 508-18, 2009.

SINAASAPPEL, M. et al. Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. **J Cyst Fibros**, v. 1, n. 2, p. 51-75, 2002.

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1417-35, 2013.

SMYTH, A. R. et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. **J Cyst Fibros**, v. 13 Suppl 1, p. S23-42, 2014.

SMYTH, R. L. et al. Intestinal inflammation in cystic fibrosis. **Arch Dis Child**, v. 82, n. 5, p. 394-9, 2000.

SONG, C. H. et al. Probiotics promote endocytic allergen degradation in gut epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 426, n. 1, p. 135-40, 2012.

SRINIVASJOIS, R.; RAO, S.; PATOLE, S. Prebiotic supplementation in preterm neonates: updated systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Clin Nutr**, v. 32, n. 6, p. 958-65, 2013.

STAPPENBECK, T. S.; HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15451-5, 2002.

STAROSTA, V. et al. Anti-inflammatory cytokines in cystic fibrosis lung disease. **Eur Respir J**, v. 28, n. 3, p. 581-7, 2006.

STEAGALL, W. K. et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent regulation of epithelial inducible nitric oxide synthase expression. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 22, n. 1, p. 45-50, 2000.

STECENKO, A. A. et al. Dysregulated cytokine production in human cystic fibrosis bronchial epithelial cells. **Inflammation**, v. 25, n. 3, p. 145-55, 2001.

STURGESS, J.; IMRIE, J. Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants. **Am J Pathol**, v. 106, n. 3, p. 303-11, 1982.

SWIDSINSKI, A. et al. Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. **Gastroenterol**, v. 135, n. 2, p. 568-79, 2008.

TANNER, J. M. Growth and endocrinology of the adolescent. In: SAUNDERS (Ed.). **Endocrine and Diseases of Childhood**. Philadelphia, 1975. p.4-64.

TARRAN, R. et al. The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches. **Mol Cell**, v. 8, n. 1, p. 149-58, 2001.

- THOMAS, D. J. et al. *Lactobacillus rhamnosus* HN001 attenuates allergy development in a pig model. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16577, 2011.
- THOMAS, D. W.; GREER, F. R. Probiotics and prebiotics in pediatrics. **Pediatrics**, v. 126, n. 6, p. 1217-31, 2010.
- THURSFIELD, R. M.; DAVIES, J. C. Cystic Fibrosis: therapies targeting specific gene defects. **Paediatr Respir Rev**, v. 13, n. 4, p. 215-219, 2012.
- TSCHERNIA, A. et al. Effects of long-term consumption of a weaning food supplemented with oligofructose, a prebiotic, on general infant health status. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 29, n. 4, p. 503, 1999.
- TURCK, D. et al. ESPEN-ESPGHAN-ECFS guidelines on nutrition care for infants, children, and adults with cystic fibrosis. **Clin Nutr**, v. 35, n. 3, p. 557-77, 2016.
- URBANIAK, G. C.; PLOUS, S. **Research Randomizer (Version 4.0)** 2013.
- VAN ELBURG, R. M. et al. Intestinal permeability in exocrine pancreatic insufficiency due to cystic fibrosis or chronic pancreatitis. **Pediatr Res**, v. 39, n. 6, p. 985-91, 1996.
- VANSCOY, L. L. et al. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, n. 10, p. 1036-43, 2007.
- VARMA, T. K. et al. Endotoxin-induced gamma interferon production: contributing cell types and key regulatory factors. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 3, p. 530-43, 2002.
- VENKATAKRISHNAN, A. et al. Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 23, n. 3, p. 396-403, 2000.
- VITETTA, L. et al. A review of the pharmacobiotic regulation of gastrointestinal inflammation by probiotics, commensal bacteria and prebiotics. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 5, p. 251-66, 2012.

VOCI, S. M. **Estudo de calibração do questionário de frequência alimentar para adolescentes - QFAA a ser utilizado em um estudo de coorte de escolares de Piracicaba, SP.** 2006. 147 (Mestre). Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo

WAGENMAKERS, A. J. Muscle function in critically ill patients. **Clin Nutr**, v. 20, n. 5, p. 451-4, 2001.

WALKOWIAK, J. et al. Early decline of pancreatic function in cystic fibrosis patients with class 1 or 2 CFTR mutations. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 40, n. 2, p. 199-201, 2005.

WALLACH, J. **Wallach interpretação de exames laboratoriais**: Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan 2013.

WALLACH, J.; WILLIAMSON, M. A.; SNYDER, L. M. **Interpretação de Exames Laboratoriais - Wallach** 9 ed. 2013. 1004 ISBN 9788527722308.

WARD, P. A.; LENTSCH, A. B. Endogenous regulation of the acute inflammatory response. **Mol Cell Biochem**, v. 234-235, n. 1-2, p. 225-8, 2002.

WEINER, H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. **Microbes Infect**, v. 3, n. 11, p. 947-54, 2001.

WEISS, B. et al. Probiotic supplementation affects pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study. **Pediatr Pulmonol**, v. 45, n. 6, p. 536-40, 2010.

WERLIN, S. L. et al. Evidence of intestinal inflammation in patients with cystic fibrosis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 51, n. 3, p. 304-8, 2010.

WESTSTRATE, J. A.; DEURENBERG, P. Body composition in children: proposal for a method for calculating body fat percentage from total body density or skinfold-thickness measurements. **Am J Clin Nutr**, v. 50, n. 5, p. 1104-15, 1989.

WHELAN, K. Mechanisms and effectiveness of prebiotics in modifying the gastrointestinal microbiota for the management of digestive disorders. **Proc Nutr Soc**, v. 72, n. 3, p. 288-98, 2013.

WHISNER, C. M. et al. Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: a double-blind cross-over trial. **Br J Nutr**, v. 110, n. 7, p. 1292-303, 2013.

WHITE, H. et al. Nutritional intake and status in children with cystic fibrosis: does age matter? **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 44, n. 1, p. 116-23, 2007.

WHO. **The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis**. ORGANIZATION, W. H.: WORLD HEALTH ORGANIZATION 2004.

WHO. **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**. ORGANIZATION, W. H. Geneva: 312 p. 2006.

WHO. **Probiotics and prebiotics: World Gastroenterology Organisation. Global Guidelines 2011**

WHO. **Physical Status: The use and interpretation of anthropometry**. ORGANIZATION, W. H. Geneva: 460 p. 1995.

\_\_\_\_\_. **Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents**. WHO. 85: 660-667 p. 2007.

WHO. **World Health Organization AnthroPlus for personal computers manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents**. Genebra, Suíça: World Health Organization 2009.

WHO. **World Health Organization Anthro for personal computers manual: Software for assessing growth of the world's child**. Genebra, Suíça: World Health Organization 2011.

WICKENS, K. et al. A protective effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 against eczema in the first 2 years of life persists to age 4 years. **Clin Exp Allergy**, v. 42, n. 7, p. 1071-9, 2012.

WOLK, K. et al. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. **Blood**, v. 96, n. 1, p. 218-23, 2000.

YAMADA, H. Current perspectives on the role of IL-17 in autoimmune disease. **J Inflamm Res**, v. 3, p. 33-44, 2010.

YAN, F. et al. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. **Gastroenterol**, v. 132, n. 2, p. 562-75, 2007.

YAN, F.; POLK, D. B. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 277, n. 52, p. 50959-65, 2002.

YASMIN, F. et al. Cesarean Section, Formula Feeding, and Infant Antibiotic Exposure: Separate and Combined Impacts on Gut Microbial Changes in Later Infancy. **Front Pediatr**, v. 5, p. 200, 2017.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222-7, 2012.

YOUN, H. N. et al. Intranasal administration of live *Lactobacillus* species facilitates protection against influenza virus infection in mice. **Antiviral Res**, v. 93, n. 1, p. 138-43, 2012.

ZHAO, J. et al. Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 15, p. 5809-5814, 2012.

ZIEGLER, B. et al. Padrões ventilatórios na espirometria em pacientes adolescentes e adultos com fibrose cística. **J Bras Pneumol**, v. 35, p. 854-859, 2009.





## APÊNDICES



## APÊNDICE A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

***Senhores Pais:***

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

Eu,

---

confirmo que Emília Addison Machado Moreira ou Yara Franco Moreno discutiram comigo este estudo.

1. Avaliar o efeito da suplementação com simbiótico durante 90 dias sobre os marcadores da resposta inflamatória (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, IL-17A, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ) de indivíduos com fibrose cística.
2. Minha participação e do meu filho colaborando neste trabalho é muito importante porque permitirá avaliar se existe ou não alterações no estado nutricional e na resposta inflamatória com a suplementação de simbióticos durante 90 dias. A participação do meu filho na pesquisa implica em eu responder a algumas perguntas sobre a fibrose cística e o pesquisador irá examinar dados do prontuário, avaliar o estado nutricional, analisar exames de sangue e de função pulmonar. Fui esclarecido de que os riscos e desconfortos relacionados à pesquisa são os seguintes:
  - a) será realizada coleta de sangue
  - b) alguns indivíduos irão consumir simbióticos durante 90 dias, podendo gerar algum desconforto extra relacionado à digestão do alimento.
  - c) durante as avaliações o (a) seu (sua) filho (a) poderá sentir-se cansado ou chateado com as perguntas e avaliações, porém se necessitar de uma pausa ou interrupção o (a) seu (sua) filho (a) tem toda a liberdade para fazê-la.
3. O Hospital Infantil Joana de Gusmão também está interessado no presente estudo e já deu a permissão por escrito para que esta pesquisa seja realizada. Porém minha participação e de meu filho (a), ou não, no estudo não implicará em nenhum benefício ou restrição de qualquer

ordem para meu (sua) filho (a) ou para mim.

4. Eu também sou livre para não participar desta pesquisa se não quiser. Isto não implicará em quaisquer prejuízos pessoais ou no atendimento de meu filho (a). Além disto, estou ciente de que em qualquer momento, ou por qualquer motivo, eu ou minha família podemos desistir de participar da pesquisa.

5. Estou ciente de que o meu nome e o do meu filho não serão divulgados e que somente as pessoas diretamente relacionadas à pesquisa terão acesso aos dados e que todas as informações serão mantidas em segredo e somente serão utilizados para este estudo.

6. Se eu tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa, eu posso entrar em contato com Emília Addison Machado Moreira pelo telefone: (48) 99279990 ou e-mail: emilia.moreira@ufsc.br

Eu concordo em participar deste estudo.

Nome e assinatura de participante maior de 14 anos: \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do responsável legal pela criança: \_\_\_\_\_

Entrevistador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE B**

Data de entrevista: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Código Pesquisa: \_\_\_\_\_ Coleta: ( ) 1 ( ) 2

Suplemento (cor): \_\_\_\_\_

**Identificação**

Nome da criança: \_\_\_\_\_ N° de prontuário: \_\_\_\_\_

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Sexo: ( ) feminino ( ) masculino

Cor de pele: ( ) branco ( ) pardo ( ) negro ( ) amarelo

Alteração genética: \_\_\_\_\_

**Estado clínico**

Resultado do teste do suor: \_\_\_\_\_ mmol/L de cloreto Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Escore de Schwachman-Kulczycki: \_\_\_\_\_ pontos Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Espirometria: \_\_\_\_\_ % VEF1 \_\_\_\_\_ CVF \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Uso de enzimas pancreáticas: ( ) Sim ( ) Não

Quais e quantidade: \_\_\_\_\_

Uso de suplementos alimentares: ( ) Sim ( ) Não

Quais e quantidade: \_\_\_\_\_

Número de internações nos últimos 5 anos: \_\_\_\_\_

Uso de medicamentos ( ) sim ( ) não

Quais: \_\_\_\_\_

Número e duração (em dias) de episódios de exacerbação pulmonar: \_\_\_\_\_

Número e duração (em dias) de admissão hospitalar devido exacerbação pulmonar: \_\_\_\_\_

Antibiótico utilizado, via de administração (oral, intravenosa) e duração: \_\_\_\_\_

**Triagem nutricional**

Velocidade de ganho de peso (mínimo 3 meses) \_\_\_\_\_

Velocidade de ganho de altura (em um ano) \_\_\_\_\_

Peso prévio: \_\_\_\_\_ kg Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Altura prévia: \_\_\_\_\_ cm

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Antropometria, composição corporal, laboratorial**

Data: __/__/_____			Data: __/__/_____		
Peso atual		kg	Hemácias		mL/mm <sup>3</sup>
Altura atual		Cm	Hemoglobina		g/dL
CB		Cm	Hematócrito		%
PCT		Mm	Leucócitos		p/mm <sup>3</sup>
PCB		Mm	Neutrófilos		p/mm <sup>3</sup>
PSE		Mm	Linfocitos		p/mm <sup>3</sup>
PSI		Mm	Monocitos		p/mm <sup>3</sup>
			Elastase fecal		
			Proteínas totais		g/dL
			Albumina		g/dL
			PCR		mg/dL

Cultura: ( ) secreção orofaríngea ( ) escarro

*Haemophilus influenza* ( ) positivo ( ) negativo

*Staphylococcus aureus* ( ) positivo ( ) negativo

## APÊNDICE C



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

**O conteúdo de cada sache deverá ser diluído em um copo de água em temperatura ambiente ou fria, uma vez ao dia no período da manhã, de preferência em jejum ou duas horas depois de ter comido.**

Alimentos que devem ser EVITADOS ou consumidos com MODERAÇÃO durante a pesquisa

<b>Alimentos que devem ser EVITADOS</b>	<b>Alimentos que devem ser consumidos com MODERAÇÃO*</b>
Iogurte Activia da Danone	Cebola
Iogurte Activia Grego da Danone	Alho
Iogurte Bio fibras da Batavo	Produtos integrais como a cevada, aveia e trigo
Leite fermentado Yakult da Batavo	Sementes oleaginosas (linhaça, gergelim, amêndoas)
Leite fermentado Vigor Club da Vigor	Aspargos
Leite fermentado Paulista	Alcachofra
Leite fermentado Danito da Danone	Maça
Leite fermentado Danoninho da Danone	Banana
Leite fermentado Ninho Soleil da Nestle	Tomate
Leite fermentado Activia da Danone	Mel
Leite fermentado Chamyto da Nestle	
Leite fermentado Batavito da Batavo	
Yakult sofyl da Batavo	
Actimel da Danone	
Bebida Mucilon NutriProtect	
Kefir	

\*Consumir uma unidade por vez e não todos os dias.

Qualquer dúvida pode entrar em contato com Maiara Brusco de Freitas pelo telefone 048 9640-7160 (TIM) ou pelo email maiarabrusco@gmail.com.

















## APÊNDICE G



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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

**Senhores Pais:**

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

Eu, \_\_\_\_\_  
confirmando que Maiara Brusco de Freitas e/ou Camila Tomio discutiram comigo este estudo.

3. Caracterizar a microbiota intestinal e associar com marcador inflamatório intestinal (calprotectina), de crianças com e sem o diagnóstico de Fibrose Cística (FC).
4. A participação do paciente é muito importante, porque permitirá caracterizar a microbiota intestinal e associar com os marcadores inflamatórios intestinais, e avaliar se existe ou não relação com o estado nutricional. O pesquisador irá examinar e utilizar dados do prontuário, avaliar o estado nutricional e analisar exames de fezes.
5. Por não necessitar de técnica invasiva para a coleta de dados, os riscos da pesquisa serão mínimos ou até nulos, podendo haver apenas algum desconforto para realização da antropometria:
  - a) Os dados antropométricos como peso, altura, perímetro cefálico e perímetro torácico será realizado pelo pesquisador. Tais medidas podem gerar algum desconforto durante a coleta, se necessitar de uma pausa ou interrupção, o participante tem toda a liberdade para fazê-la.
  - b) A coleta da amostra de fezes será realizada no dia da

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

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

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

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

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



### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

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

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

Florianópolis, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pesquisadora

### DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DO SUJEITO

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

Florianópolis, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pesquisadora

Telefone para contato: \_\_\_\_\_

### DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

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

Assinatura da pesquisadora: \_\_\_\_\_



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

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

Eu, \_\_\_\_\_  
confirmando que Maiara Brusco de Freitas e/ou Camila Tomio discutiram comigo este estudo.

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

qualquer momento, ou por qualquer motivo, posso desistir de participar da pesquisa.

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

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

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

**DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO  
DO SUJEITO**

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

Florianópolis, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pesquisadora

Telefone para contato: \_\_\_\_\_

**DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL**

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

Assinatura da pesquisadora: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE H

### Nota de Imprensa

Trata-se dos resultados da tese de doutorado intitulada “Efeito da suplementação com simbiótico sobre a resposta inflamatória de crianças e adolescentes com fibrose cística” do Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), elaborada pela doutoranda Maiara Brusco de Freitas, sob orientação da docente Dra. Emília Addison Machado Moreira.

O presente estudo compreende duas etapas, sendo a população de ambas composta pelos pacientes com fibrose cística atendidos no ambulatório da fibrose cística do Hospitala Infantil Joana de Gusmão (HIJG) na cidade de Florianópolis – Santa Catarina. O HIJG é referência no estado de Santa Catarina no tratamento de crianças e adolescentes com até 15 anos de idade com FC, sendo que no ano de 2013 foram atendidos periodicamente 92 pacientes de todo o estado. Na etapa 1 foi avaliado o efeito da suplementação com simbiótico pelo período de 90 dias sobre os marcadores da resposta inflamatória e na etapa 2 foi avaliado a composição da microbiota intestinal e a inflamação intestinal ambos com crianças e adolescentes com fibrose cística.

Da etapa 1 participaram crianças e adolescentes com idade igual ou superior a 6 anos e menor ou igual a 15 anos. O simbiótico estudado trata-se de um produto comercial composto por um prebiótico (frutooligossacarídeo) e quatro cepas probióticas (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*), e o efeito do mesmo foi avaliado sobre o estado nutricional [altura para idade (E/I), peso-para-idade (P/I), índice de massa corporal para idade (IMC/I), percentual de gordura corporal (%GC), área muscular do braço (AMB) e a área gordurosa do braço (AGB)], a função pulmonar [Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (VEF1)] e os marcadores inflamatórios (IL-12, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , mieloperoxidase e metabólitos do óxido nítrico). A suplementação com a simbiótico avaliado no presente estudo e o tempo de suplementação não foi suficiente para resultar em uma melhora do estado nutricional refletida pelo ganho de peso, e da função pulmonar. Contudo, mostrou-se promissor ao diminuir os marcadores pró-inflamatórios IL-6, IL-8 e NOx em crianças e adolescentes com fibrose cística. Esses marcadores estão relacionados com o agravamento do processo inflamatório, sendo que a diminuição dos mesmos é de grande benefício para essa população. No entanto, são necessários estudos com

um período de avaliação superior a 90 dias para que se possa obter uma melhor compreensão dos efeitos do simbiótico nesta população.

Na etapa 2 participaram crianças e adolescentes com idade igual ou maior a 0 anos e igual ou menor a 15 anos com fibrose cística, tendo sido avaliado o estado nutricional (IMC/I e E/I), a inflamação intestinal (dosagem de calprotectina fecal), uso de antibióticos. A quantificação dos microrganismos intestinais *Bacteróides*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Lactobacillus (L.) paracasei*, *Escherichia (E.) coli*, *Clostridium (C.) difficile*, Firmicutes, *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, *Eubacterium (E.) rectale* e *Faecalibacterium (F.) prausnitzii* foi realizada por meio da técnica de hibridização fluorescente *in situ*. O presente estudo reforça que a inflamação intestinal está presente em pacientes com fibrose cística e que a presença da doença juntamente com a antibióticoterapia estão relacionadas a anormalidades na microbiota intestinal. Os microrganismos *Bacteroides*, Firmicutes, *E. rectale* e *F. prausnitzii* estão diminuídos nessa população, sendo que os mesmos são importantes para a manutenção da integridade da barreira intestinal e homeostase intestinal. As bactérias *C. difficile*, *E. coli* e *P. aeruginosa* estão aumentadas nessa população como consequência da doença e da antibióticoterapia, estando as mesmas relacionadas com a ocorrência de diarreia e disbiose.

Por fim, é importante enfatizar que a presença de inflamação na fibrose cística está descrita na literatura e estratégias são necessárias para atenuar esse processo, a fim de diminuir o consequente dano pulmonar, as alterações gastrointestinais e a influência negativa sobre o estado nutricional dos pacientes.

Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Nutrição - Universidade Federal de Santa Catarina.

Doutoranda: Maiara Brusco de Freitas - Orientadora: Dra. Emilia Addison Machado Moreira. Financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 471197/2013-0.

**ANEXOS**





## ANEXO A

Tipo 01		Pedaços separados, duros como amendoim
Tipo 02		Forma de salsicha, mas segmentada
Tipo 03		Forma de salsicha, mas com fendas na superfície
Tipo 04		Forma de salsicha ou cobra, lisa e mole
Tipo 05		Pedaços moles, mas contornos nítidos
Tipo 06		Pedaços aerados, contornos esgarçados
Tipo 07		Aquosa, sem peças sólidas

Fonte: Lane *et al.* (2011)



## ANEXO B

## TRIAGEM NUTRICIONAL

Velocidade de ganho de peso

Peso atual: \_\_\_\_\_ kg Peso prévio: \_\_\_\_\_ kg Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Ganho de peso: \_\_\_\_ g Intervalo de tempo: \_\_\_\_ dias (maior que 3 meses)

Ganho diário de peso \_\_\_\_\_ g/dia

Ganho de peso mínimo aceitável \_\_\_\_\_ g/dia (tabela abaixo)

Pontuação: \_\_\_\_\_ pontos

Velocidade de ganho de altura

Idade acima de 10 anos ( ) sim ( ) não

Escala de Tanner ( ) I ( ) II ( ) III ( ) IV ( ) V

Altura atual: \_\_\_\_\_ cm Altura prévia: \_\_\_\_\_ cm Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Ganho de altura: \_\_\_\_ cm Intervalo de tempo: \_\_\_\_ anos (entre 1 e 2 anos)

Ganho anual de altura \_\_\_\_\_ cm/ano

Ganho de altura mínimo aceitável \_\_\_\_\_ cm/anos (olhar tabela abaixo)

Pontuação: \_\_\_\_\_ pontos

Percentil de IMC

Percentil de IMC (CDC 2000): \_\_\_\_\_ Pontuação: \_\_\_\_\_ pontos

Escore da Triagem Nutricional			
	0 pontos	1 ponto	2 pontos
Percentil de IMC	≥ P50	< P50 e ≥ P10	< P10
Ganho de peso diário	≥ mínimo	> 0 e < mínimo	Perda de peso ou não ganho
Ganho anual de altura	≥ mínimo	> 0 e < mínimo	não ganho
Categorias da Triagem Nutricional			
Pontos da Triagem Nutricional	0 - 1	2 - 3	≥ 4
Categorias	Baixo risco	Moderado Risco	Alto risco

Fonte: Adaptado de McDonald (2007)

Tabela 8 – Taxa minimamente aceitável de ganho de peso diário (g/dia) e altura anual (cm/ano), de acordo com sexo e idade

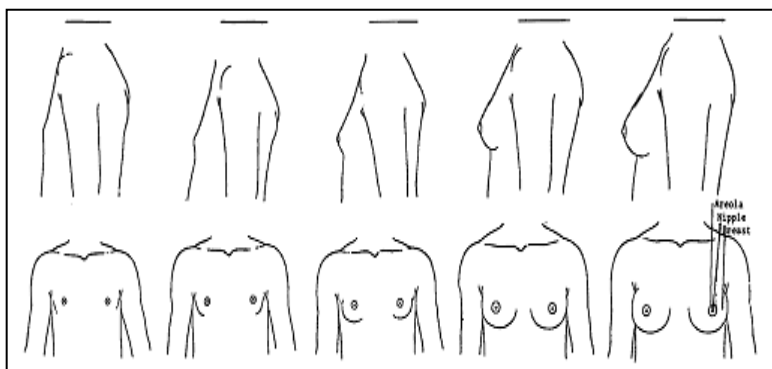
Idade (anos)	IMC > P50				IMC < P50			
	Ganho diário de peso (g/dia)		Ganho anual de altura (cm/ano)		Ganho diário de peso (g/dia)		Ganho anual de altura (cm/ano)	
	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino
5 - 5,99	3	2	5	5	7	6	7	7
6 - 6,99	3	2	5	5	7	7	6	6
7 - 7,99	3	3	4	4	8	7	6	6
8 - 8,99	3	3	4	4	8	8	6	6
9 - 9,99	2	3	4	4	9	8	5	6
10 - 10,99	3	3	4	4	9	11	5	6
11 - 11,99	3	4	4	4	11	14	5	7
12 - 12,99	4	1	4	3	15	14	6	6
13 - 13,99	4	< 1	4	1	18	11	8	3
14 - 14,99	4	< 1	3	<1	19	7	7	2

Fonte: Adaptado de McDonald (2008)

(Continua)

**MATURAÇÃO SEXUAL**

1. Desenho A 2. Desenho B 3. Desenho C 4. Desenho D 5. Desenho E



O mamilo está um pouco levantado. O resto do seio continua plano

Fase de botão. O mamilo está mais levantado que no estágio anterior. O seio é um pequeno monte e a aréola está mais larga que no estágio 1.

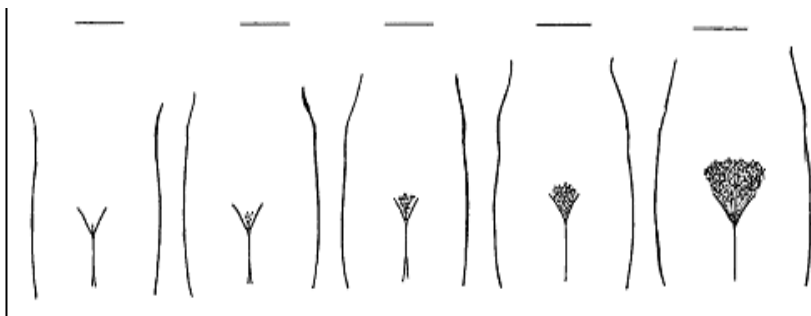
As aréolas e os seios estão mais largos que a fase 2. A aréola não sai fora do seio.

As aréolas e os mamilos formam um monte que se sobressai por cima do corpo na forma de mama (PS: Algumas meninas não passam pela fase 4, passam direto da fase 3 para a 5)

Fase adulta madura. Os seios estão completamente desenvolvidos. Apenas o mamilo se sobressai nesta fase, e a aréola muda para a forma geral da mama.

(Continua)

1. Desenho A    2. Desenho B    3. Desenho C    4. Desenho D    5. Desenho E



Não há a presença de pelos pubianos.

Há um pouco de pelos, longos, levemente coloridos. Podem ser lisos ou um pouco enrolados.

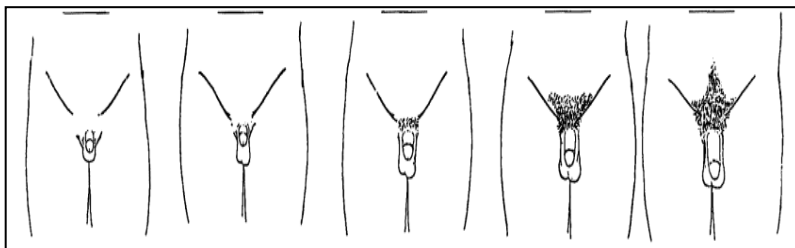
Os pelos são mais escuros nesta fase. São mais grossos e enrolados, espalhados e não cobrem uma grande área.

Os pelos estão escuros, enrolados como na fase adulta. Entretanto, não se espalham por uma grande área, e não atingiram as coxas.

Os pelos estão como na fase adulta. Cobrem uma grande área e geralmente formam um triângulo, e se espalham por entre as coxas.

(Continua)

1. Desenho A 2. Desenho B 3. Desenho C 4. Desenho D 5. Desenho E



Não há a presença de pelos pubianos.

Há um pouco de longos pelos, levemente coloridos. Podem ser lisos ou um pouco enrolados.

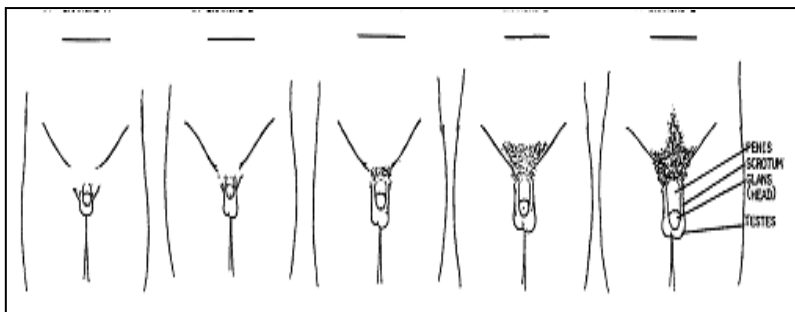
Os pelos são mais escuros nesta fase. São mais grossos e enrolados, espalhados e não cobrem uma grande área.

Os pelos estão escuros, enrolados como na fase adulta. Entretanto, não se espalharam por uma grande área, e não atingiram as coxas.

Os pelos estão como na fase adulta. Cobrem uma grande área e se espalham por entre as coxas.

(Continua)

1. Desenho A 2. Desenho B 3. Desenho C 4. Desenho D 5. Desenho E



Os testículos, saco escrotal e o pênis são do mesmo tamanho e forma que eram quando criança.

Os testículos e o saco escrotal aumentaram um pouco de tamanho, a pele do saco escrotal modificou. O saco segura os testículos baixou um pouco. O pênis ficou apenas um pouco maior.

O pênis cresceu em principalmente em comprimento. Os testículos e a bolsa escrotal cresceram e baixou que o estágio 2.

O pênis cresceu mais, está maior. A glândula (cabeça do pênis) está maior. O saco escrotal está mais escuro que antes e está maior pois os testículos aumentaram de tamanho.

O pênis, bolsa escrotal e testículos são de tamanho e forma de um adulto.



Table 1 Tabulated body fat % centile values by exact age

Years	Centile									
	2	9	25	50	75	85	91	95	98	
<b>Boys</b>										
5.0	12.2	13.1	14.2	15.6	17.4	18.6	19.8	21.4	23.6	
6.0	12.4	13.3	14.5	16.0	18.0	19.5	20.9	22.7	25.3	
7.0	12.6	13.6	14.9	16.5	18.8	20.4	22.0	24.1	27.2	
8.0	12.7	13.8	15.2	17.0	19.5	21.3	23.1	25.5	29.1	
9.0	12.8	14.0	15.5	17.5	21.2	22.2	24.2	26.8	31.0	
10.0	12.8	14.1	15.7	17.8	20.7	22.8	25.0	27.9	32.4	
11.0	12.6	13.9	15.4	17.7	20.8	23.0	25.3	28.3	32.9	
12.0	12.1	13.4	15.1	17.4	20.4	22.7	25.0	27.9	32.2	
13.0	11.5	12.8	14.5	16.8	19.8	22.0	24.2	27.0	31.0	
14.0	10.9	12.3	14.0	16.2	19.2	21.3	23.3	25.9	29.5	
15.0	10.4	11.8	13.6	15.8	18.7	20.7	22.6	25.0	28.2	
16.0	10.1	11.5	13.3	15.5	18.4	20.3	22.1	24.3	27.2	
17.0	9.8	11.3	13.1	15.4	18.3	20.1	21.8	23.9	26.5	
18.0	9.6	11.2	13.1	15.4	18.3	20.1	21.7	23.6	25.9	
<b>Girls</b>										
5.0	13.8	15.0	16.4	18.0	20.1	21.5	22.8	24.3	26.3	
6.0	14.4	15.7	17.2	19.1	21.5	23.0	24.5	26.2	28.4	
7.0	14.9	16.3	18.1	20.2	22.8	24.5	26.1	28.0	30.5	
8.0	15.3	16.9	18.9	21.2	24.1	26.0	27.7	29.7	32.4	
9.0	15.7	17.5	19.6	22.1	25.2	27.2	29.0	31.2	33.9	
10.0	16.0	17.9	20.1	22.8	26.0	28.2	30.1	32.2	35.0	
11.0	16.1	18.1	20.4	23.3	26.6	28.8	30.7	32.8	35.6	
12.0	16.1	18.2	20.7	23.5	27.0	29.1	31.0	33.1	35.8	
13.0	16.1	18.3	20.8	23.8	27.2	29.4	31.2	33.3	35.9	
14.0	16.0	18.3	20.9	24.0	27.5	29.6	31.5	33.6	36.1	
15.0	15.7	18.2	21.0	24.1	27.7	29.9	31.7	33.8	36.3	
16.0	15.5	18.1	21.0	24.3	27.9	30.1	32.0	34.1	36.5	
17.0	15.1	17.9	21.0	24.4	28.2	30.4	32.3	34.4	36.8	
18.0	14.7	17.7	21.0	24.6	28.5	30.8	32.7	34.8	37.2	

The 2nd, 85th and 95th centiles define the cutoffs for underfat, overfat and obese.

(Conclusão)



## ANEXO C

**QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR PARA CRIANÇAS DE 6 A 10 ANOS**

Horário do início \_\_\_\_\_ Data da entrevista: \_\_\_\_\_ Registro N° \_\_\_\_\_

Nome do entrevistador: \_\_\_\_\_

Nome da criança: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Escola: \_\_\_\_\_

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

**- Nos últimos 6 meses, seu filho comeu.....?:**

## 1. Doces, salgadinhos e guloseimas:

ALIMENTO	Nunca	<1 X/ mês	1-3X/ mês	1X / sem	2-4X/ sem	1X/dia	≥2X/ dia	Porção	P	M	G	EG	Fats	g/ml
1. Balaíto tipo chips, Balaíto Palha, Salgadinho								1 pacote P					V1	
2. Chocolate Bombom Negrinho								1 barra P 2 un. 3 un. P					V1	
3. Bolo sí cobertura, Bolo industrializado (Nutrelle®, Seven Soy®)								1 fete M					L51 G	
4. Biscoitos com recheio, Wafer, Amantigados								1/2 pacote ou 7 un.						
5. Maxi Golebrin <sup>®</sup> , Maxi chocolate <sup>®</sup> , Barra de cereal								1 unidade						
6. Club Social <sup>®</sup> , Toda Hora <sup>®</sup>								1 pacote P						
7. Sorvete, picolé com leite								2 bolas 1 picolé					L49	
8. A chocolateado em pó (Nescau <sup>®</sup> , Toddy <sup>®</sup> )								1 CS mesa, 1 Coobrem, C h					V18 308	
9. A chocolateado liq. (Tostinho <sup>®</sup> , Chocorito <sup>®</sup> )								1 caixa P					V1	
10. Pipoca doce ou salgada (estourada)								1 saco M de pipocueiro					V1	
11. Açúcar adicionado em café, chá, leite								2 cc Ch					V1	
12. Bolas								4 un.					V2	
13. Confeitos (Bibibib, M&M's®)								1 pacote P					V2	
14. Sobremesa tipo mousse ou flan								1 taça ou 1 pote					V2 V2	
15. Leite condensado, Doce de leite								1 CS, 1 C sobrem.R					V2	
16. Bolinho de chuva, Cacha viredo, Sonho								4 un., 2 un. M, 1 un. P					V2 V2	

## II. Salgados e preparações:

ALIMENTO	Nunca	<1 X/ mês	1-3X/ mês	1X / sem	2-4X/ sem	1X/dia	2-2X/ dia	Porção	P	M	G	EG	Folha	g/ml
17. Cheeseburger (pão, carne, queijo)								1 un. P						
18. Salgado frito (Coxinha, Risole/Paete), Enroladinho (presunto e queijo)								1 un. M					V2 ou 10 un. de folha	
19. Salgado assado (Empiã, Enroladinho salgada)								1 un. M					V3	
20. Croissant (presunto, queijo, calabresa)								1 un. M					V3	
21. Cachorro quente								1 un. M					V3	
22. Pizza								1 fete M					L53 P	
23. Pão de queijo								1 un. G ou 3 un. P					L52 G ou L52 3P	
24. Sopa (carne, feijão, legumes)								1 prato fundo						
25. Sopa de pacote								1 prato fundo						
26. Farofa (de farinha de mandioca)								1 colh. sopa					V3	
27. Salada de beteta com maionese								1 colher sopa					V3	

## III. Leites e produtos lácteos:

ALIMENTO	Nunca	<1 X/ mês	1-3X/ mês	1X / sem	2-4X/ sem	1X/dia	2-2X/ dia	Porção	P	M	G	EG	Folha	g/ml
28. Leite								1 caneca					V9 6D	
Que tipo de leite ele(a) costuma beber			Integral ( )			Semi-desnatado ( )		Desnatado ( )						
29. Leite fermentado Yakult <sup>®</sup> , Bifidus <sup>®</sup> , Charybi <sup>®</sup>								1 garrafa P ou 1 caixa P					V4	
30. Iogurte natural ou com frutas								1 pote					L56 35X	
31. Bebida (leite com frutas)								1 copo requeijão					V5 4B	
32. Denoninho <sup>®</sup> , Chambinho <sup>®</sup> , etc								2 potes G ou 3 P					L56 36P	
33. Queijo lanche ou muzzarela								1 fete M						
34. Requeijão								1CS R					L22 04X ou L29 04R	

## IV. Óleos e Gorduras

ALIMENTO	Nunca	<1 X/ mês	1-3X/ mês	1X/ sem	2-4X/ sem	1X/dia	≥ 2X/ dia	Porção	P	M	G	EG	Folha	g/ml
35.Maionesa tradicional								2 pontas de faca					V19 34B	
36.Margarina (origem vegetal)								2 pontas de faca					V19 34B	
37.Manteiga								2 pontas de faca ou 1CSM					V19 34A ou L29 04N	
38.Creme de leite								1 CS					L22 04X	
39.Óleo ou azeite (p/ temperar salada)								1 fio						

## V. Cereais, pães e tubérculos:

ALIMENTO	Nunca	<1 X/ mês	1-3X/ mês	1X/ sem	2-4X/ sem	1X/dia	≥ 2X/ dia	Porção	P	M	G	EG	Folha	g/ml
40.Arvaz cozido								3 CS Ch					L41 ou 2xL42 fol44	
41.Macarrão ao molho (carne ou frango)								2 pegadores					L40 fol39	
42.Macarrão Inst. (Nissin Lámen®,...)								1/2 pacote						
43.Lacanha								1 quadrado M					V14 tamanho M	
44.Biscoito sí recheio (onem onaker, água e sal, de leite, rosas)								6 un.						
45.Biscoito de polvilho salgado								30 un.						
46.Cacetinho, Pão de cachorro quente								1 un. M					L52 ou V3	
47.Pão de forma								2 fatias					V4	
48.Blonquinha								3 un.					V3	
49.Pão Integral								1 un. P, 2 fatias					V4	
50.Cereal matinal (Bualtha®,...)								1 xíc. chá, 1 colher P						
51.Betate frita pelito								1 escumadeira					L38 fol36	
52.Betate (purê / cozida)								3 CS Ch, 1 un. M					V4	
53.Polenta cozida, Alpin cozido								4 CS Ch, 1 pedaço M					V4	
54.Polenta frita, Alpin frito								1 pedaço M					V5	

## VI. Vegetais:

ALIMENTO	Nunca	q/ F.C.					q/ F.C.								
		<1X/ mês	1-3X/ mês	1X/ sem	2-4X/ sem	1X/ dia	≥ 2X/ dia	Porção	P	M	G	EG	Folha	g/ml	g/ml
55. Alface								1 pires ou 2 folhas G					L31 ou V13		
56. Repolho cru								1 pires					L31		
57. Beterraba cozida								1 CG Ch							
58. Cenoura crua								1/2 pires					L31 108 ou 22		
59. Chuchu								1 CG Ch							
60. Milho verde								4 CG Ch, 1 espiga							
61. Tomate								4 fatias M, 1 un. P					L30 P		
62. Morenga								1 CG Ch							
63. Vagem								1 CG Ch							
64. Espinafre								1 CG Ch							
65. Couve								1 CG Ch							
Quantas porções de vegetais ele(a) come por semana?															

## VII. Frutas:

ALIMENTO	Nunca	q/ F.C.					q/ F.C.								
		<1X/ mês	1-3X/ mês	1X/ sem	2-4X/ sem	1X/ dia	≥ 2X/ dia	Porção	P	M	G	EG	Folha	g/ml	g/ml
66. Banana								1 un. M					L48 M 166/66		
67. Laranja, Bergamota								1 un. M, 2 un. P					V13 15B		
68. Maçã/Pêra								1 un. M					V12 11B		
69. Mamão								1 fete P					L46 P 166/62		
70. Melão								1 fete M					L45 M		
71. Manga								1/2 un. P					V5		
Quantas porções de frutas ele(a) come por semana?															

## VIII. Leguminosas:

ALIMENTO	Nunca	q/ F.C.					q/ F.C.								
		<1X/ mês	1-3X/ mês	1X/ sem	2-4X/ sem	1X/ dia	≥ 2X/ dia	Porção	P	M	G	EG	Folha	g/ml	g/ml
72. Feijão, Lentilha								1 concha G					L43 164/45		
73. Feijão mexido								2 CG Ch					V5		

## IX. Carnes e Ovos

ALIMENTO	Nunca	<1 X / mês	1-3X / mês	1X / sem	2-4X / sem	1X / dia	≥ 2X / dia	Porção	P	M	G	EG	Folha	g/ml
74.Carne panela, assada, Picadinho, Bife								1 pedaço G, 1/2porção, 1 un. M					V00 29C L33 V16 22B L34 folio7	
75.Guizado, Almôndega								1 C semi, 2 un. M						
76.Bife à milanesa								1 un. M						
77.Frango (refogado, assado), desfiado								1 sobrecoxa G, 1/2 peito, 4 CS					V15 25B	
78.Frango frito								1 sobrecoxa M ou 1 coxa G					L37 folio34	
79.Carne suína (assada, refogada)								1 fêta P						
80.Ovo cozido								1 un. M						
81.Omelete								c/ 2 ovos						
82.Frco (presunto, Chester, mortadela, salame)								1 fêta M						
83.Salchicha								2 un. M						
84.Salchicho, Lingüiça								1 un., 6 fêtas						

## X. Bebidas:

ALIMENTO	Nunca	<1 X / mês	1-3X / mês	1X / sem	2-4X / sem	1X / dia	≥ 2X / dia	Porção	P	M	G	EG	Folha	g/ml
85.Refrigerante								1 copo requisição					V8 4B	
Que tipo de refrigerante ele(s) costuma beber?					Normal							Diet/ Light		
86.Suco natural								1 copo G					V8 4A	
87.Suco industrializado								1 copo requisição					V8 4B	
88.Suco em pó								1 copo requisição					V8 4B	
Que tipo de suco ele(s) costuma beber?					Normal							Diet/ Light		
89.Café (p/ diluir no leite)								1/3 de caneca					V9 8D	
90.Água								1 garrafa P					500ml	

## XI. Não mencionados:

ALIMENTO	<1 X / mês	1-3X / mês	1X / sem	2-4X / sem	1X / dia	≥ 2X / dia	Clide.	g/ml
91.								
92.								
93.								
94.								
95.								
96.								
97.								
98.								

Horário do final:

Assinatura:





## ANEXO D

## QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR (QFAA)

## I. Doces, salgadinhos e guloseimas:

ALIMENTO	QUANTIDADE	Nunca	menos de 1X mês	1 a 3X mês	1X por sem	2 a 4X sem	1X dia	2 ou mais X dia
B1. Batafina tipo chips ou Salgadinho	1/2 pacote grande							
B2. Chocolate/ Brigadeiro	1 tablete/ 1 barra/ 3 unidades porq							
B3. Bolo comum/ Doce Pullman	1 fatia média							
B4. Sorvete massa/ palito	2 bolas/ 1 unidade							
B5. Achecolado em pó (Nescau, Quik, etc.)	2 colheres de sopa mais							
B6. Pipoca estourada (doce ou salgada)	1 saco médio de pipocaria							
B7. Açúcar adicionado em café, chá, leite, etc.	2 colheres sobremesa							
B8. Balas	2 unidades							
B9. Doces de frutas (gelatina, marmelada, doce abóbora)	1 fatia fina/ 1 unidade média							
B10. Sobremesas tipo mousse	1 taça/ 1 pote							
B11. Croissant de chocolate	1 unidade média							

## II. Salgados e preparações:

ALIMENTO	QUANTIDADE	Nunca	menos de 1X mês	1 a 3X mês	1X por sem	2 a 4X sem	1X dia	2 ou mais X dia
B12. Cheeseburger de carne/ frango	1 sanduíche							
B13. Sanduíche (miolo, queijo, frango ou quente)	1 sanduíche							
B14. Sanduíche natural	1 sanduíche							
B15. Croissant/ Risólia/ Pão/ Empedado frito de presunto e queijo	1 unidade média							
B16. Pão de queijo	1 unidade média							
B17. Empada / Empada / Pão de Batata / Empedado assado de presunto e queijo	1 unidade média							
B18. Salada de batata com maionese	1 colher de servir							
B19. Sopa (carne, feijão, legumes)	1 prato fardo							
B20. Farofa (de farinha de mandioca)	1 colher de servir							
B21. Pizza	1 fatia média							
B22. Cachorro quente	1 sanduíche							
B23. Croissant presunto e queijo	1 unidade média							

## III. Leites e produtos lácteos:

ALIMENTO	QUANTIDADE	Nunca	menos de 1X mês	1 a 3X mês	1X por sem	2 a 4X sem	1X dia	2 ou mais X dia
R24. Leite integral	1 copo de requesijo cheio							
R25. Leite desnatado	1 copo de requesijo cheio							
R26. Leite fermentado (Yakult®)	1 garrafinha							
R27. Iogurte natural/ frutas	1 pote							
R28. Iogurte diet	1 pote							
R29. Queijo minas frescal/ flocos, cottage	1 fatia média							
R30. Requeijo	1 colher de sopa							

## IV. Óleos e Gorduras:

ALIMENTO	QUANTIDADE	Nunca	menos de 1X mês	1 a 3X mês	1X por sem	2 a 4X sem	1X dia	2 ou mais X dia
R31. Manteiga tradicional	1 colher de sopa							
R32. Margarina (origem animal)	1 ponta de faca							
R33. Margarina (origem vegetal)	1 ponta de faca							
R34. Azeite de Oliva	1 colher de café							

## F. Cereais, pães e tubérculos:

ALIMENTO	QUANTIDADE	Nunca	menos de 1X mês	1 a 3X mês	1X por sem	2 a 4X sem	1X dia	2 ou mais X dia
R35. Arroz cozido	4 colheres de sopa/ 1½ colher de servir/ 1 comid. grande							
R36. Macarrão instantâneo/ ao vapor/manteiga	3 colheres de servir/ porção							
R37. Massas (lasanha, ravioli, cappelletti)	1 porção média/ 1 prato raso							
R38. Biscoitos sem recheio/ croissant/craker	15 unidades							
R39. Biscoitos com recheio	7 unidades							
R40. Pão francês/ forma/ integral/castrol/ pão de bot dog	1 1/2 unidades/ 3 fatias							
R41. Cereal matinal tipo Suavithos®/ Barra de cereal	1 xícara de chá/ unidade	1						
R42. Batatas fritas de palito	1 saquinho pequeno/ 1 colher de servir							
R43. Batatas (purê, assado)	1 colher de servir							
R44. Polenta (cozida ou frita)	5 bardinhas médias/ 5 colheras de sopa							
R45. Mandioca cozida	2 porções médias							
R46. Parmosinha doce/ salgada	1 unidade média							

## VI. Verduras e legumes:

ALIMENTO	QUANTIDADE	Nome	menos de 1X mls	1 a 3X mls	1X por sem	2 a 4X sem	1X dia	2 ou mais X dia
B47. Alface	1 porção / 6 folhas médias							
B48. Acelga/ repolho	2 colheres de servir							
B49. Agrião/ ortiga	3 ramos/ 5 folhas médias							
B50. Couve-flor	2 ramos médias							
B51. Beterraba	1 colher de servir							
B52. Coumara	1 colher de servir							
B53. Espinafre/ couve	1 colher de servir							
B54. Ervilha	2 colheres de sopa							
B55. Milho verde	1 colher de sopa							
B56. Pepino	6 fatias médias							
B57. Tomate	3 fatias médias							

## VII. Frutas:

ALIMENTO	QUANTIDADE	Nome	menos de 1X mls	1 a 3X mls	1X por sem	2 a 4X sem	1X dia	2 ou mais X dia
B58. Abacate	½ unidade							
B59. Abacaxi	1 fatia média							
B60. Banana	1 unidade média							
B61. Laranja/ laranja	1 unidade média							
B62. Maçã/ pêra	1 unidade média							
B63. Melão	1 fatia média							
B64. Melão/ Melancia	1 fatia média							
B65. Manga	1/2 unidade média							
B66. Morango	½ xícara de chá							
B67. Uva	1 cacho médio							

## VIII. Feijão:

ALIMENTO	QUANTIDADE	Nunca	menos de 1X mês	1 a 2X mês	1X por sem	2 a 4X sem	1X dia	2 ou mais X dia
B68. Feijão (mercen ou preto)	1 1/2 concha média							

## IX. Carnes e Ovos:

ALIMENTO	QUANTIDADE	Nunca	menos de 1X mês	1 a 2X mês	1X por sem	2 a 4X sem	1X dia	2 ou mais X dia
B69. Carne cozida (Bife role/ moída/ de panela/ picadinho)	1 fatia média/ 1 C. de servir/ 1 unidade média							
B70. Bife frito/ Bife à milanesa	1 unidade média							
B71. Frango cozido/ assado/ grelhado/ frito	1 pedaço médio/ 1 unidade média							
B72. Peixe frito	1 filé médio/ peça							
B73. Carne salina (bifeira/ lombo)	1 unidade média/ 1 fatia média							
B74. Ovo frito/ mexido/ Omelete	1 unidade média/ 1 pedaço médio							
B75. Embutidos (presunto/ peito de porco, mortadela, salame etc)	2 fatias médias							
B76. Salsicha	1 1/2 unidade							
B77. Lingüiça	1 gomo médio							

## X. Bebidas:

ALIMENTO	QUANTIDADE	Nunca	menos de 1X mês	1 a 2X mês	1X por sem	2 a 4X sem	1X dia	2 ou mais X dia
B78. Refrigerante normal	1 1/2 copo de sopa/jilo/ 1 lata							
B79. Refrigerante diet	1 1/2 copo de sopa/jilo/ 1 lata							
B80. Chá mate com sabor	1 lata							
B81. Suco de abacaxi com açúcar	1 copo de sopa/jilo							
B82. Suco de laranja/ mandarina com açúcar	1 copo de sopa/jilo							
B83. Suco de mamão com açúcar	1 copo de sopa/jilo							
B84. Suco de melão/ melancia com açúcar	1 copo de sopa/jilo							
B85. Limonada/ laranja/da com açúcar	1 copo de sopa/jilo							
B86. Sucos naturais com leite/ Vitaminas de frutas	1 copo de sopa/jilo							
B87. Sucos artificiais	1 copo de sopa/jilo							
B88. Café	1 xícara de café poquena							
B89. Cerveja	1 copo médio							
B90. Vinho	1 copo médio							





## ANEXO E

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

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

Fonte: SHWACHMAN e KULCZYCKI (1958).