

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

BEATRIZ MASCARENHAS ZUIN

INDOXIL SULFATO URINÁRIO (INDICAN) EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM DOENÇA FALCIFORME: AVALIAÇÃO DE DISBIOSE INTESTINAL E
FATORES ASSOCIADOS

ARACAJU

2019

BEATRIZ MASCARENHAS ZUIN

**INDOXIL SULFATO URINÁRIO (INDICAN) EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM DOENÇA FALCIFORME: AVALIAÇÃO DE DISBIOSE INTESTINAL E
FATORES ASSOCIADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Cipolotti

ARACAJU

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Z94i Zuin, Beatriz Mascarenhas
Indoxil sulfato urinário (Indican) em crianças e adolescentes com doença falciforme: avaliação de disbiose intestinal e fatores associados / Beatriz Mascarenhas Zuin ; orientadora Rosana Cipolotti. – Aracaju, 2019.
66 f.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Doença Falciforme. 2. Disbiose. 3. Microbiota. 4. Estado nutricional. 5. Triptofano. I. Cipolotti, Rosana, orient. II. Título.

CDU 616.15

BEATRIZ MASCARENHAS ZUIN

**INDOXIL SULFATO URINÁRIO (INDICAN) EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM DOENÇA FALCIFORME: AVALIAÇÃO DE DISBIOSE INTESTINAL E
FATORES ASSOCIADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 21/08/2019

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Cipolotti

1º Examinador: Dr^a. Rosana Cipolotti

2º Examinador: Dra. Danielle Góes da Silva

3º Examinador: Prof. Dra. Anne Jardim Botelho

Aos amores da minha vida, Ana Carolina, minha esposa, e Valentin, Violeta e Aurora, meus filhos. À minha querida sogra, Ivone Marina, pelo apoio e pelo amor incondicional à minha família.

À minha mãe, Alice Lourdes, que, apesar da distância, está sempre em meus pensamentos como símbolo de luta.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos Especiais

À Dra. Rosana Cipolotti, minha orientadora de mestrado, pela gentileza, profissionalismo e competência. Por ter me dado liberdade de pensamento e pela oportunidade de desenvolver este trabalho, contribuindo para meu aprendizado. Minha gratidão e admiração.

Ao Dr. Ricardo Gurgel Queiroz, por contribuir com seus conhecimentos e experiência profissional e pela disponibilidade de ter participado em minha banca de qualificação. Meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Anne Jardim Botelho, pelo profissionalismo e pela disponibilidade em me atender nos momentos mais importantes deste trabalho, me ajudando a refletir da melhor forma.

À Dra. Danielle Góes da Silva, pelo olhar técnico, crítico e gentil. Minha admiração e respeito como pessoa e profissional.

A todos, minha admiração, como profissionais e pesquisadores que são, e minha infinita gratidão e respeito.

Agradecimentos

A Lucas Magalhães e Camila Nathália, exemplos de simplicidade e competência, por terem colaborado na realização da análise do teste indican no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, HU-UFS. Meu respeito e gratidão.

A todos os funcionários e professores do Núcleo de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, que, mesmo de forma indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES, por ter me contemplado com a bolsa de estudos para realização do mestrado e ao PROAP/UFS por ter disponibilizado recursos para compra de materiais.

RESUMO

ZUIN, B.M. Indoxil sulfato urinário (indican) em crianças e adolescentes com doença falciforme: avaliação de disbiose intestinal e fatores associados. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. UFS. 2019

Introdução: O indoxil sulfato urinário (Indican) é um ácido orgânico derivado do aminoácido triptofano proveniente da dieta, que é metabolizado por bactérias intestinais por meio de triptofanases. O Indican está presente na urina em níveis baixos em indivíduos saudáveis e um nível elevado de indican urinário é indicação de supercrescimento bacteriano no intestino delgado. A doença falciforme (DF) é uma das doenças genéticas mais prevalentes em todo o mundo. Trata-se de uma alteração autossômica recessiva, sendo a crise vaso-oclusiva aguda sua manifestação mais comum. Disbiose intestinal é definida como o desequilíbrio da microbiota intestinal (MI) e pode estar presente na DF. **Objetivo:** Verificar a ocorrência de disbiose intestinal em pacientes com DF, com e sem uso de hidroxiureia. **Métodos:** Trata-se de um estudo seccional, conduzido entre janeiro de 2018 e março de 2019, envolvendo 98 crianças e adolescentes (05 a 18 anos), divididos em três grupos: G1. pacientes com DF em uso de hidroxiúreia; G2. pacientes com DF sem uso de hidroxiuréia; G3. controle (indivíduos sem DF). Foi realizado exame de urina (Indican) para avaliar DI, parasitológico de fezes, avaliação de índices antropométricos, critérios de Roma IV, Escala de fezes Bristol e situação socioeconômica e demográfica. **Resultados:** Verificou-se a presença de disbiose intestinal entre os participantes, sendo 74% no G1, 76% no G2 e 65% no G3. Observou-se que variáveis como tipo de parto, tempo de amamentação e constipação funcional estiveram associadas às concentrações do Indican, independente da presença de DF entre os grupos. **Conclusão:** Foram observadas altas concentrações urinárias de Indican em pacientes com DF, assim como no grupo controle, sendo indicativo de disbiose intestinal, sem diferença significativa.

Descritores: Microbiota intestinal. Disbiose. Doença Falciforme. Estado Nutricional. Triptofano, Constipação intestinal

ABSTRACT

ZUIN, B.M. Urinary indoxyl sulfate (indican) in children and adolescents with sickle cell disease: evaluation of intestinal dysbiosis and associated factors. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. UFS. 2019

Introduction: Urinary indoxyl sulfate (Indican) is an organic acid derived from the amino acid tryptophan from diet that is metabolised by intestinal bacteria through tryptophanases. Indican is present in low urine in healthy individuals and a high level of urinary indican is an indication of bacterial overgrowth in the small intestine. Sickle cell disease (SCD) is one of the most prevalent genetic diseases worldwide. It is an autosomal recessive disorder, with acute vaso-occlusive crisis being its most common manifestation. Intestinal dysbiosis is defined as intestinal microbiota (IM) imbalance and may be present in SCD. **Objective:** To verify the occurrence of intestinal dysbiosis in patients with SCD, with and without hydroxyurea. **Methods:** This is a sectional study conducted between January 2018 and March 2019, involving 98 children and adolescents (05 to 18 years), divided into three groups: G1. SCD patients with hydroxyurea; G2 SCD patients without hydroxyurea; G3 control (individuals without SCD). Urine examination (Indican) was performed to assess intestinal dysbiosis, parasitological stool, anthropometric indices, Rome IV criteria, Bristol stool scale, and socioeconomic and demographic status. **Results:** It was found the presence of intestinal dysbiosis among the participants, being 74% in G1, 76% in G2 and 65% in G3. Variables such as type of delivery, time of breastfeeding and functional constipation were associated with Indican concentrations, regardless of the presence of the SCD between the groups. **Conclusion:** High urinary Indican concentrations were observed in patients with SCD, as well as in the control group, indicating intestinal dysbiosis, with no significant difference.

Keywords: Intestinal microbiota. Dysbiosis. Sickle cell disease. Nutritional status. Tryptophan, Constipation

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Situação socioeconômica, tipo de parto, tempo de amamentação e estado nutricional dos grupos estudados.....	31
Tabela 2. Parasitose intestinal, Escala de fezes de Bristol e constipação funcional dos grupos estudados.....	32
Tabela 3. Estado nutricional dos grupos avaliados.....	32
Tabela 4. Avaliação das dosagens de Indican entre os grupos avaliados.....	33
Tabela 5. Modelo linear generalizado, univariado, controlado e ajustado entre os níveis de Indican e fatores associados.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dosagem de Indican na urina.....	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3IS	3-indoxil sulfato
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DF	Doença falciforme
HbS	Hemoglobina S
HbSS	Homozigose para hemoglobina S
HU	Hidroxiureia
IMC	Índice de massa corpórea
MI	Microbiota intestinal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Microbiota intestinal.....	14
2.1.1 Permeabilidade intestinal.....	15
2.1.2 Disbiose intestinal.....	16
2.2 Indoxil sulfato urinário (Indican).....	17
2.1.4 Doença falciforme.....	18
2.1.5 Disbiose intestinal e doença falciforme.....	20
3. OBJETIVO.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	24
4.2 Amostra.....	24
4.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	24
4.4 Coleta de dados.....	25
5. RESULTADO.....	30
6. DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
APÊNDICES.....	47
ANEXOS.....	51

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal (MI) é altamente diversificada em sua composição e desempenha papel importante na fisiologia humana, metabolismo, nutrição e função imunológica (MARCHESI; ADAMS; FAVA et al., 2016).

O papel da MI na saúde e na doença é tão crucial quanto complexo. Alterações na MI comensal normal resultam em aumento dos microrganismos patogênicos que prejudicam tanto a homeostase microbiana quanto a do hospedeiro. Esse desequilíbrio microbiano é conhecido como disbiose intestinal (DI) e tem sido amplamente relatado como um dos principais contribuintes para a patogênese das condições cardiovasculares e metabólicas, neuroimunes e neurocomportamentais (FATTORUSSO; DI GENOVA; DELL'ISOLA et al., 2019; CHABE; LOKMER; SEGUREL, 2017), além dos distúrbios gastrointestinais, como as doenças inflamatórias intestinais, doenças intestinais funcionais, alergias alimentares, obesidade e doenças hepatológicas (LOPETUSO; PETITO; GRAZIANI et al., 2018).

Variações na composição bacteriana intestinal normal são determinadas por fatores genéticos e ambientais. Dentre os fatores ambientais, a dieta e os fármacos interferem de forma marcante no equilíbrio da microbiota com repercussões para o estado inflamatório (ARUMUGAM et al., 2011; CARICILLI et al., 2011; FALONY et al., 2016).

Algumas bactérias no intestino superior produzem enzimas que catalisam a conversão de triptofano em indol. O indol absorvido é convertido no fígado para sulfato de indoxil (Indican), que é então sulfatado para permitir sua excreção. O Indican está presente na urina em níveis baixos em indivíduos saudáveis (TAMMM, 1984) e estudos têm mostrado que níveis elevados de ácidos orgânicos específicos na urina humana podem indicar taxas anormais de crescimento microbiano intestinal. Além do Indican, existem outros ácidos orgânicos urinários associados ao supercrescimento microbiano, como: benzoato, hipurato, fenilacetato, fenilpropionato, cresol, hidroxibenzoato, hidroxifenilacetato, hidroxifenilpropionato e 3,4-di-hidroxifenilpropionato, D-lactato e D-arabinitol. A detecção de níveis anormalmente elevados desses produtos é uma ferramenta de diagnóstico útil para pacientes com sintomas gastrointestinais ou toxicológicos (LORD; BRALLEY, 2008).

A doença falciforme (DF) é uma doença hematológica frequente com risco de morte que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. O termo “Doença Falciforme” não se refere a uma única doença, mas sim a um conjunto de anemias hemolíticas hereditárias, com padrão

autossômico recessivo para a herança do alelo S, que apresentam propensão para que os eritrócitos se transformem em formas crescentes ou chamadas de foice (WARE et al., 2017).

DF pode levar à anemia e graves complicações, geralmente associadas a fenômenos tromboembólicos e vaso-oclusivos que afetam vários tecidos e sistemas (CHAMBERS; FORSYTHE; BERTRAND, 2000). Geralmente, as crises vaso-oclusivas (CVO) são as primeiras manifestações dessa doença, consideradas como maiores responsáveis pelos altos índices de internações (BRASIL, 2006) e intervenção médica imediata com drogas anti-inflamatórias, analgésicos não esteróides, hidroxiureia (HU), analgésicos opióides, reidratação e, em casos graves, transfusão de sangue, que causam outros efeitos colaterais a longo prazo (STEVENS et al., 1986).

Estudos sobre a patogênese das CVO's em pacientes com DF mudaram significativamente na última década. Uma sequência de estudos avaliando DI em portadores de DF tem demonstrando ligação direta entre as CVO's e MI, como um fator predominante para o desenvolvimento de tais crises. Mecanismos pelos quais a MI influencia a atividade da doença e novas abordagens para direcionar as cepas bacterianas responsáveis pela prevenção ou tratamento da DF já estão em andamento. A próxima abordagem terapêutica para pacientes com DF pode ser por meio da manipulação da MI, utilizando probióticos, prebióticos, simbióticos, terapia nutricional e transplante da microbiota fecal (LIM; METHÉ; KNOLL et al., (2018a); LIM et al., (2018b); ZHANG et al., 2015; CAMMAROTA; IANIRO; TILG; RAJILIC-STOJANOVIĆ et al., 2017).

Se considerarmos o estado inflamatório crônico de pacientes com DF e associarmos ao quadro de DI, pode-se dizer que tais condições podem contribuir para o agravamento da saúde geral destes pacientes. Aliado a este quadro, também devemos considerar o perfil destes possíveis patobiontes em relação à sua resistência microbiana, e perfil de interação celular com o hospedeiro.

Dessa forma, é coerente que a identificação dos principais fatores associados ao desequilíbrio da MI possa estar relacionado com a fisiopatologia da DF sendo relevante a investigação do presente estudo utilizando o marcador de DI, o Indican, em pacientes com DF, com e sem uso de hidroxiureia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Microbiota intestinal

Comunidades de microrganismos que vivem em íntima associação com seus hospedeiros são denominados microbiota (CLEMENTE; URSELL; PARFREY et al., 2012).

O corpo humano adulto compreende dez vezes mais células microbianas do que as células humanas, devido, em grande parte, à densidade extremamente alta de microrganismos encontrados no trato gastrointestinal humano. Os principais filos encontrados no intestino são Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria e este consórcio microbiano é estabelecido nos três primeiros anos de vida (TURNBAUGH; LEY; HAMADY et al., 2007; KOENIG; SPOR; SCALFONE et al., 2011). O ecossistema microbiano desempenha inúmeras funções importantes para o hospedeiro humano, incluindo proteção contra patógenos, processamento de nutrientes, estimulação da angiogênese e regulação do armazenamento de gordura do hospedeiro (LEY et al., 2005; MacDONALD; GORDON, 2005; ECKBURG et al., 2005).

O termo microbioma humano surgiu pela primeira vez para descrever a comunidade ecológica de microrganismos simbióticos e patogênicos no corpo humano. Os autores acreditavam que esses microrganismos eram significativos para a saúde e para a doença (LEDERBERG; MCCRAY, 2001), no entanto, essas pesquisas se concentravam mais no papel fermentativo da digestão das fibras alimentares na MI (MACFARLANE; MACFARLANE, 2012).

A composição da MI é geralmente quantificada usando métodos baseados em DNA, como sequenciamento de genes de RNA ribossômico 16S ou sequenciamento *shotgun* de genoma inteiro, que também permitem a inferência de funções da microbiota (RANJAN; RANI; METWALLY et al., 2015).

A MI é essencial no fornecimento de nutrição, na regulação do desenvolvimento epitelial e maturação da imunidade inata (HOOPER; GORDON, 2001). A composição da MI geralmente é estabelecida na primeira infância, dependendo de fatores geográficos, tipo de parto, amamentação, idade de desmame, exposição a antibióticos e alimentação (DOMINGUEZ-BELLO; COSTELLO; CONTRER et al., 2010; DURANTI; LUGLI.; MANCABELLI et al., 2017).

Em condições fisiológicas normais, a MI é um ecossistema homeostático com várias funções vitais e inter-relações importantes para a saúde do hospedeiro (SHREINER et al.,

2014). A MI é constantemente monitorada pelo sistema imune da mucosa. Embora as células epiteliais intestinais não sejam tradicionalmente classificadas como células da resposta imune inata, elas expressam um extenso repertório de receptores de reconhecimento padrão, como os receptores *Toll-like* e células com mecanismos pró e anti-inflamatórios, como células T-auxiliares Th17 e células T reguladoras (RAKOFF-NAHOUM; PAGLINO; ESLAMI-VARZANEH et al., 2004). A interrupção desse equilíbrio pode resultar em DI e aumentar o risco de doenças (GABORIAU-ROUTHIAU; RAKOTOBÉ, LÉCUYER et al., 2009).

Com o advento do Projeto do Microbioma Humano (HMP, 2012), muitos avanços foram feitos na elucidação do papel crítico que a microbiota comensal desempenha na saúde humana, na manutenção imunológica e nas doenças (ARPAIA; CAMPBELL; FAN et al., 2013; PICKARD; MAURICE; KINNEBREW et al., 2014).

2.1.1 Permeabilidade intestinal

A permeabilidade do intestino é um sistema complexo proporcionado por uma barreira anatômica da parede intestinal e uma barreira fisiológica intimamente ligada à MI e aos elementos do sistema imune da mucosa (BISCHOFF; BÁRBARA; BUURMAN et al., 2014).

A barreira intestinal desempenha um papel fundamental na prevenção de respostas inflamatórias à microbiota e é regulada por uma rede de mecanismos imunes para reconhecimento microbiano e tolerância à microbiota (WELLS; ROSSI; MEIJERINK et al., 2011). A barreira intestinal é composta, principalmente, por enterócitos fortemente ligados às proteínas juncionais, como as claudinas, ocludinas e zônulas ocludentes, conhecidas como junções íntegras e junções aderentes (GALLO; HOOPER, 2012).

A disfunção da barreira intestinal pode incluir tanto a permeabilidade intestinal aumentada como a inflamação, envolvendo frequentemente a disfunção de junções apertadas entre as células epiteliais, conhecida como *tight junctions* (ALONSO; VICARIO; PIGRAU et al., 2014).

A falha em alcançar ou manter o equilíbrio entre o hospedeiro e a microbiota tem consequências negativas para a saúde intestinal e sistêmica. Várias doenças têm sido relacionadas a mudanças nas populações da microbiota, ou à redução da diversidade da microbiota, incluindo doenças atópicas, doença inflamatória intestinal, diabetes, obesidade, câncer e, mais recentemente, neuropatologias e hematopatologias (CAMILLERI et al., 2012; LIM et al., 2018a; Zhang et al., 2015).

Anormalidades na composição da MI, a DI, favorecem a proliferação de microrganismos nocivos e estão associadas à quebra da barreira intestinal e ao aumento da permeabilidade intestinal, além de contribuírem para uma maior translocação de bactérias intestinais e maior ativação de neutrófilos envelhecidos (LIM; METHÉ; KNOLL et al., 2018a).

2.1.2 Disbiose Intestinal

A plasticidade do microbioma tem sido implicada em numerosas doenças, e uma alteração desfavorável da composição da MI, conhecida como DI, é responsável pelo crescimento potencial de bactérias patogênicas e diminuição no número de bactérias benéficas. A composição da MI é facilmente alterada por fatores ambientais, dieta, estresse, uso de antibióticos, toxinas, drogas e patógenos (HILL; ARTIS, 2010).

O primeiro pesquisador a relatar o termo “disbiose” foi o cientista russo Ilya Metchnikof, e sua definição foi estendida anos depois, para incluir um estado em que mudanças metabólicas na diversidade da MI poderiam produzir efeitos prejudiciais sistêmicos a longo prazo (MURRAY; PIZZORNO, 1988; HAWRELAK; MYERS, 2004).

Alguns pesquisadores sugerem que mudanças na ecologia humana, como água limpa, banhos mais freqüentes, uso disseminado de antibióticos, anti-inflamatórios, laxantes, sabonetes antimicrobianos, menor tamanho da família, diminuição no relacionamento social, maior número de cesarianas e menor oferta de leite materno podem ter efeitos não intencionais sobre a composição da MI, alterando a fisiologia humana, e contribuindo para o aumento de algumas doenças (BLASER; FALKOW, 2009).

Algumas doenças crônicas, incluindo doença inflamatória intestinal, esclerose múltipla, artrite reumatóide, asma, diabetes e obesidade estão associadas à DI. Recentemente, alguns pesquisadores confirmaram um papel fundamental das interações MI-hospedeiro na neurodegeneração em pacientes com a doença de Alzheimer no eixo cérebro-microbiota (KOWALSKI, K.; MULAK, 2019). Tang et al (2017) revisaram as possíveis vias moleculares que conectam a MI a doenças cardiovasculares ou cardiometabólicas, como a via trimetilamina N-óxido (TMAO), via dos ácidos graxos de cadeia curta e as vias dos ácidos biliares primários e secundários. Vários estudos observaram uma associação significativa entre transtorno do espectro autista (TEA), disfunção gastrointestinal e DI na MI, com alta ocorrência de sintomas gastrointestinais e gravidade positivamente associada à do TEA (WANG; TANCREDI; THOMAS, 2011). Esta ocorrência é caracterizada pela sinalização

comprometida de tirosinoquinase, que é importante no desenvolvimento do cérebro, na saúde gastrointestinal e na regulação da resposta imune (IERACI et al., 2002; OKUNISHI et al., 2005).

Dutta et al (2019b) forneceram a primeira evidência da presença de lesão intestinal e aumento da permeabilidade do intestino em pacientes com DF. O grau de translocação bacteriana para a circulação sistêmica é provavelmente determinado pelo balanço entre mudanças na permeabilidade do intestino e controle da densidade microbiana intestinal por padrões moleculares associados a danos (DAMPs), resultando em lesão intestinal.

Tais observações sugerem que mudanças na composição da MI podem ocorrer também em outras doenças crônicas, como a DF (DUTTA; METHE; AMAR et al., 2019a; LIM; METHÉ; KNOLL et al., 2018a; ZHANG; CHEN; MANWANI et al., 2015).

2.2 Indoxil sulfato urinário (Indican)

Trata-se de um ácido orgânico, o indol, derivado do aminoácido triptofano, proveniente da dieta, que é metabolizado por bactérias intestinais por meio de triptofanases. O indol é absorvido pelas células intestinais e liberado na corrente sanguínea, onde é transportado por proteínas, e, posteriormente, segue para o fígado, sendo conjugado com o sulfato, tornando-se indoxil sulfato ou indican (LIABEUF; DRÜEKE; MASSY, 2011).

As bactérias do intestino metabolizam o L-triptofano em muitos produtos, incluindo o antioxidante ácido indol-3-propiónico, o neurotransmissor triptamina e o indol. O indol pode sofrer hidroxilação e sulfatação por enzimas hepáticas, gerando também toxinas urêmicas de indoxil sulfato (DEVLIN; MARCOBAL; DODD et al., 2016). Em pacientes com doença renal crônica, o indoxil sulfato é altamente elevado no sangue, devido à depuração renal inadequada, pacientes em estágio final mantidos em diálise têm níveis de IS vinte vezes maiores que o normal (NIWA.; SHIMIZU, 2012).

O indoxil sulfato é um importante sinalizador intercelular entre as comunidades microbianas, atua também modulando a função da barreira da mucosa e a expressão de genes pró e anti-inflamatórios por células epiteliais intestinais (WEBER; OEFNER; HIERGEIST et al., 2015).

Um estudo recente demonstrou que o indol, que é um precursor do indoxil sulfato, aumenta as funções de barreira das células epiteliais intestinais *in vitro*, induzindo a expressão de vários genes envolvidos nas funções dessas células. Esses genes incluem os responsáveis pelas *tight junctions*, junções aderentes, citoesqueleto de actina e produção de

mucina, indicando o papel do indol no fortalecimento da barreira epitelial. No entanto, permanece desconhecido se o indol tem efeitos benéficos na manutenção da barreira intestinal *in vivo* (LEE; LEE, 2010).

O indoxil sulfato pode ser medido colorimetricamente por conversão em produtos de oxidação coloridos ou diretamente por cromatografia líquida com um produto ultravioleta detector de absorção ou espectrometria de massa (LORD; BRALLEY, 2008).

Como o intestino delgado é extensamente povoado por bactérias, o Indican está presente na urina em níveis baixos em indivíduos saudáveis. Nível elevado de Indican urinário é uma indicação de supercrescimento bacteriano no intestino delgado (LORD; BRALLEY, 2008).

Altas concentrações de Indican na urina refletem a presença de degradação das proteínas da alimentação, induzida principalmente por algumas espécies bacterianas, como *Proteus e Klebsiella*, levando a uma redução da acidez urinária e fecal, com consequente alteração do pH uro-fecal para valores alcalinos, possibilitando um maior crescimento bacteriano e patogênico (GIBSON; ROBERFROID, 1995; LAURINO; PALMIERI; ESPOSITO et al., 2016), além de estar relacionada com a síndrome do supercrescimento bacteriano do intestino delgado, má absorção e constipação intestinal (POWELL-JACKSON, P.R., MAUDGAL, D.P., SHARP et al., 1979).

Em estudo realizado recentemente, Dutta et al, (2019a) observaram que indivíduos com DF tiveram concentrações do 3-indoxil sulfato urinário (3-IS), que também é um metabólito derivado do triptofano, significativamente mais altos em comparação com grupo controle sem DF. Os altos índices de 3-IS foram correlacionados com abundância intestinal de *Clostridiales*, provavelmente devido ao supercrescimento bacteriano ligado ao 3-IS e aumento de neutrófilos envelhecidos que são fundamentais na iniciação e propagação de CVOs.

2.3 Doença Falciforme

O termo doença falciforme refere-se a qualquer condição na qual a produção de HbS leva a consequências fisiopatológicas (MODELL; DARLISON, 2008). As mais comuns dessas doenças são anemia falciforme (HbSS), hemoglobinopatia SC (HbSC), hemoglobinopatia S β -talassemia (HbS β -talassemia), além de outras formas de apresentação (MEHTA; HOFFBRAND, 2000; BAIN, 2011), sendo que a HbS, seguida da HbC, são as mais frequentes na população brasileira. Estas hemoglobinas variantes em situação de

homozigose ou dupla heterozigose podem produzir complicações clínicas com elevado grau de morbidade e mortalidade (BONINI-DOMINGOS, 1993; NAOUM, 1984; BONINI-DOMINGOS, 2013).

Os genótipos da DF determinam a gravidade e a presença ou não de sintomas clínicos. HbS β -talassemia, HbSC e SD-Punjab (HbSD) são consideradas genótipos de gravidade média, enquanto que os genótipos HbAS, que é responsável pelo traço falciforme, e HbSS, que caracteriza a anemia falciforme, possuem maior relevância clínica (STUART; NAGEL, 2004).

A fisiopatologia da DF é impulsionada pelos princípios da polimerização da hemoglobina S nos glóbulos vermelhos. Após a desoxigenação da hemoglobina, a substituição de um ácido glutâmico por um resíduo de valina na sexta posição da cadeia polipeptídica da β -globina resulta na polimerização e agregação dos polímeros em fibras de tubulina, que dão origem às células falciformes (BUNN, 1997; BRITTENHAM et al., 1985). A formação destas longas fibras poliméricas que crescem dentro dos eritrócitos desencadeia uma cascata de várias outras anormalidades celulares que participam do mecanismo fisiopatológico global da DF, promovendo desidratação celular com estresse celular físico e oxidativo (STUART; NAGEL, 2004).

No geral, as manifestações da DF são movidas por dois processos fisiopatológicos principais: vasoclusão com isquemia-reperusão e anemia hemolítica.

As alterações fisiológicas primárias que são responsáveis pelos eventos vaso-oclusivos culminam nos episódios dolorosos agudos que são a principal causa de hospitalização em pacientes com DF. As respostas inflamatórias também são componentes chave de inúmeras complicações da doença, incluindo auto-esplenectomia, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, úlceras, nefropatia e acidente vascular cerebral (BALLAS; LUSARDI, 2005; NATH; HEBBEL, 2015).

As complicações agudas e crônicas da DF exigem cuidados intensivos em ambulatório e hospitais. Apesar da necessidade considerável, existem poucas terapias curativas ou agentes modificadores da doença que visam a patobiologia subjacente na DF (KAPOOR; LITTLE; PECKER, 2018).

A hidroxycarbamida, também conhecida como hidroxiureia (HU), é a única droga comprovada para o tratamento da DF. Ela atua como um potente indutor de hemoglobina fetal (HbF) e sua eficácia clínica é reconhecida há mais de 30 anos. As respostas clínicas ao uso de HU incluem redução da frequência de episódios vaso-oclusivos, crises de dor, transfusões e

hospitalizações (CHARACHE; DOVER; MOORE et al., 1992; WARE; DAVIS; SCHULTZ et al., 2016).

Apesar da HU ser a única droga comprovada para o tratamento da DF, existe um grande interesse na literatura em tratamentos que visem as vias fisiopatológicas e novos compostos estão em fase de ensaios clínicos. As principais categorias de tratamento incluem a interrupção da vaso-oclusão pela redução da adesão celular, inflamação ou hipercoagulabilidade, assim como profilaxia contra vaso-oclusão, mudando a hidratação celular, coagulação, hemólise, oxidação ou ativação plaquetária e prevenção de polimerização intracelular de HbS, através de indução de HbF e estabilização da hemoglobina (WARE; MONTALEMBERT; TSHILOLO et al., 2017).

As abordagens terapêuticas atuais e ensaios clínicos abertos incluem novos agentes anti-coagulantes, terapia de transfusão a longo prazo, transplante de células-tronco hematopoiéticas, terapia de genes, terapia antioxidante, inibição da adesão celular, terapia anti-plaquetária e agentes que modifiquem o tônus vascular. O desenvolvimento de novos tratamentos para a DF é uma área de pesquisa ativa, no entanto, necessita de financiamento pelos institutos nacionais de saúde, além de mais estudos clínicos que contemplem a complexidade da DF (KAPOOR; LITTLE; PECKER, 2018).

De acordo com os estudos de Paul Frenett, pesquisador da Faculdade de Medicina Albert Einstein nos Estados Unidos da América, a HU possui atividade antimicrobiana que pode alterar significativamente a MI. Estudos *in vivo* desde 2001, com término em 2021, já estão testando os efeitos da HU na MI, através de técnicas de seqüenciamento do 16S rDNA, e avaliando por meio de transplante fecal, a contribuição da MI modificada pela HU na atividade da DF.

2.4 Disbiose intestinal e doença falciforme

Atualmente, os grupos de estudo que avaliam DI em DF fornecem dados mais complexos e expressivos através das análises de metagenômica, como sequenciamento de genes de RNA ribossômico 16S ou sequenciamento *shotgun* de genoma inteiro (RANJAN; RANI; METWALLY et al., 2016). Seis gêneros já foram identificados com base em seu maior potencial de associação com DF, como *Pseudobutyrvibrio*, *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Escherichia* e *Shigella* (ZHANG; CHEN; MANWANI et al., 2015; LIM; MORRIS; LI et al., 2018b).

Algumas evidências sustentam que o papel da MI na hematopoiese normal possa estar associado aos distúrbios hematológicos. Em alguns casos, acredita-se que os patógenos desencadeiam distúrbios hematológicos, e em outros, o desequilíbrio da homeostase da MI estaria associada a desfechos clinicamente significativos em pacientes com distúrbios hematológicos (RAUFF; IDREES; SHAH et al., 2011; FRANCO; IANNITTO, 2003). Distúrbios do excesso de ferro, como hemocromatose e hemólise crônica, tornam os pacientes susceptíveis a certas infecções bacterianas. Um estudo randomizado e controlado em crianças africanas avaliou os efeitos do aumento de ferro no cólon e observaram reduções significativas nos lactobacilos e um aumento nos níveis de enterobactérias, que incluem as espécies *Escherichia coli* e *Salmonella* (ZIMMERMAN; SINGH; MARTIN et al., 2012).

De acordo com Lim et al (2018b), a DF está diretamente associada à DI. Em seu estudo avaliando adultos e crianças de ambos os sexos com DF, observaram a composição da MI alterada significativamente menor em *Pseudobutyrvibrio* e *Alistipes* em comparação com indivíduos com traço falciforme. Esses microrganismos se correlacionaram negativamente com a lactato desidrogenase sérica, um marcador de hemólise.

A causa subjacente da DI em pacientes com DF ainda não é clara, mas provavelmente se deve, pelo menos em parte, à hipoxemia induzida por falcização recorrente na vasculatura esplâncnica (MORENO-INDIAS; TORRES; MONTSERRAT et al., 2015). Há evidências indiretas que apóiam a ocorrência de CVOs nos vasos esplâncnicos e causam hipoxemia intestinal, como a ocorrência de colite isquêmica na DF (KARIM; AHMED; ROSSOFF et al., 2002). A DI resultante da hipoxemia pode, portanto, resultar em alterações na MI e aumento da permeabilidade do intestino (LIM; METHÉ; KNOLL et al., 2018a).

Dutta et al (2019a), observaram que a lesão de reperfusão por hipóxia, além de alterar a MI e reduzir *Alistipes* e *Pseudobutyrvibrio*, pode induzir um aumento compensatório de outros microrganismos produtores de indol.

Neutrófilos são fundamentais na iniciação e propagação de CVO (TURHAN; WEISS; MOHANDAS et al., 2002). Uma nova teoria proposta por Zhang et al (2015), demonstrou que a MI foi responsável pela regulação do número de neutrófilos promotores de CVO. A depleção da MI com cursos prolongados de antibióticos combinados foi associada à redução significativa do número de neutrófilos envelhecidos e uma melhora no resultado clínico das CVOs induzido por TNF α , resultando em melhor fluxo sanguíneo local e maior sobrevida.. Esse trabalho destacou a importância da MI na regulação do envelhecimento de neutrófilos na DF e que a depleção da MI reduz a severidade do CVO experimental.

Tavakoli et al (2019), demonstraram que o tratamento com antibióticos de amplo espectro reduziu significativamente a densidade mineral óssea e o conteúdo mineral ósseo em camundongos machos com DF em comparação com camundongos controles saudáveis, além de reduzir significativamente a esplenomegalia. O aumento da carga bacteriana aumenta a carga antigênica que atravessa a barreira intestinal prejudicada pela inflamação crônica presente na DF, levando ao aumento de citocinas inflamatórias, prejuízo na função dos osteoblastos e perda óssea em camundongos com DF. Portanto, o aumento da massa óssea em camundongos com DF, após o tratamento com antibióticos de amplo espectro, pode ser devido ao esgotamento de bactérias patogênicas ou à diminuição da carga bacteriana em camundongos com DF.

Outro estudo em andamento com resultados preliminares revelou uma ligação entre o aumento da bactéria *Veillonella* intestinal, níveis mais altos de dor e DI importante em pacientes com DF. Esta bactéria pode formar um biofilme no TGI e permitir que outras bactérias como o *Streptococcus* se liguem ao biofilme e se tornem mais fortes e mais virulentas, contribuindo para o aumento de doenças como meningite e pneumonia bacteriana. Uma explicação para o aumento da dor seria a ligação com algumas células vermelhas do sangue ao biofilme da *Veillonella*, exacerbando as crises de dor. A condição geral isquêmica e um baixo nível de oxigênio parecem contribuir para o aumento da DI nesses pacientes, com prevalência de bactérias anaeróbias, como *Bifidobacterium*, *Campylobacter*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Scardovia* e *Atopobium* (BRIM; VILMENAY; ATEFI et al., 2017).

À medida que as pesquisas compreendem o papel da DI na patogênese das doenças crônicas, a manutenção de uma MI saudável passou a ser considerada um novo alvo terapêutico. Algumas das intervenções terapêuticas mais utilizadas na modulação da MI incluem o uso de probióticos, prebióticos, simbióticos e terapia nutricional. O transplante de microbiota fecal de doadores saudáveis é uma das mais recentes intervenções utilizadas para corrigir a DI (CAMMAROTA; IANIRO; TILG; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ et al., 2017), a maior parte da literatura publicada sobre essa intervenção está relacionada ao tratamento da infecção recorrente pelo *Clostridium difficile*, cuja eficácia é relatada como superior a 90% dos casos tratados (CAMMAROTA; MASUCCI; IANIRO et al., 2015; KELLY; KHORUTS; STALEY et al., 2016).

A restauração da homeostase da MI pode ser uma abordagem terapêutica eficaz para atenuar a inflamação induzida pela DI. Espera-se que um novo mecanismo que regule as manifestações da DF leve a novas maneiras de direcionar a inflamação na DF (ZHANG et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o marcador de DI (Indican) em pacientes com DF, com e sem uso de hidroxiureia, e fatores associados.

3.2 Objetivos Específicos

1. Estimar a prevalência de constipação funcional em pacientes com DF, com e sem uso de hidroxiureia;
2. Avaliar a presença de protozoários e helmintos em pacientes com DF, com e sem uso de hidroxiureia;
3. Avaliar o estado nutricional de pacientes com DF, com e sem uso de hidroxiureia;

4. CASUÍSTICA E MÉTODO

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo seccional.

4.2 Amostra

Pacientes com DF, com idade entre 05 a 18 anos, atendidos no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU/UFS), residentes, em sua maioria, em Sergipe, além de municípios da Bahia e de Alagoas. A justificativa para a faixa etária estabelecida baseia-se no fato de que crianças com DF, entre 3 meses a 5 anos de idade, fazem uso profilático de antibióticos para evitar infecções, principalmente as infecções graves decorrentes da própria doença.

Para a realização do presente trabalho, foram avaliados três grupos, dentre os quais, dois grupos caso e um grupo controle:

- Grupo 1. Pacientes com DF em uso de hidroxiureia;
- Grupo 2. Pacientes com DF sem uso de hidroxiureia;
- Grupo 3. Grupo controle (sem DF).

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com idade entre 5 a 18 anos, portadores de DF HbSS confirmada por meio eletroforese de hemoglobina, atendidos no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, com e sem uso de HU.

Foram excluídos do estudo pacientes que:

- Estivessem em uso de antibióticos de amplo espectro, probióticos e prebióticos que pudessem alterar a MI;
- Apresentassem doenças associadas de origem gastrointestinal e renal;
- Foram hospitalizados ou apresentassem episódios de doença aguda nas duas semanas anteriores ao estudo;
- Possuíssem relato de hemotransfusão nos últimos 30 dias anteriores ao estudo;

- Quando menores de idade, apresentassem pais ou responsáveis com transtornos mentais ou psicomotores que pudessem interferir na entrevista ou na avaliação antropométrica.

4.4 Coleta de dados

4.4.1 Descrição da Coleta de Dados

Para a realização do presente trabalho, um total de 98 crianças e adolescentes elegíveis participaram do estudo. Inicialmente, foi realizada a abordagem direta com os responsáveis pelos menores, justificando o projeto de pesquisa e apresentando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

A coleta de dados iniciou-se em janeiro de 2018 e teve seu término em março de 2019. As informações foram coletadas em questionários, após leitura, entendimento, aceitação e assinatura do TCLE, e incluíram questões referentes às (1) características sócio-econômico-demográficas; (2) características clínicas da DF; (3) avaliação antropométrica; (4) Critérios de Roma IV e escala de fezes Bristol; (6) exame de urina para avaliar DI; e (7) exame parasitológico de fezes.

As medidas antropométricas e a solicitação do exame parasitológico de fezes foram realizadas em conjunto, no mesmo momento da entrevista. Para avaliar DI, através do exame de urina (Indican), o mesmo foi agendado após 90 dias, devido os pacientes retornarem para a consulta hematológica neste período.

Em relação ao grupo controle, foi solicitado, junto à Secretaria de Educação de Aracaju – Sergipe, autorização para a realização do presente estudo na Escola Municipal de Educação Fundamental *Prof. Florentino Menezes* (Anexo E), situada no Bairro Mosqueiro, no município de Aracaju. As informações e exames coletados seguiram a mesma sequência de obtenção dos grupos caso.

4.4.2 Disbiose Intestinal

Para realização do teste Indican, foi utilizado o kit da Sigma-Aldrich MAK 128. O método utilizado foi o teste colorimétrico baseado no método de Curzon e Walsh (1962), em espectrofotômetro, no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, HU-UFS. Foi utilizado protocolo de acordo com as normas do fabricante.

Quanto ao procedimento, o kit foi deixado em temperatura ambiente, sendo transferidos 50 µL das amostras de urina para a placa de 96 poços.

Para realização da leitura 01, adicionou-se 140 µL do Reagente A para cada poço, sendo o mesmo homogeneizado levemente por toques na placa ou com a ponteira, e em seguida foi realizada a leitura em 480 nm, padronizando-se, assim, o *blank*.

Para realização da leitura 02, adicionou-se 10 µL de Reagente B em cada poço, sendo o mesmo homogeneizado e incubado por 5 minutos na bancada, e, em seguida, a leitura foi realizada em 480 nm, obtendo-se o “padrão”.

Para realização da leitura 03, adicionou-se 10 µL do “padrão” em cada poço, sendo o mesmo homogeneizado e realizada a leitura em 480 nm, obtendo-se o “padrão”.

Quando houve necessidade, as amostras foram diluídas em uma concentração 1:5, ou seja, uma parte da urina mais quatro partes de água destilada, multiplicado pelo fator de diluição 5.

Em relação ao procedimento para coleta de urina, para os participantes que residiam no município de Aracaju ou em até duas horas de distância do Ambulatório de Hematologia Pediátrica do HU/UFS, a coleta de urina (20ml) foi realizada pelos responsáveis pelos menores em suas residências, obtendo-se a primeira urina da manhã. Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao ambulatório e entregues à pesquisadora responsável pelo estudo. Para os participantes que residiam no interior do estado de Sergipe ou em distância superior a duas horas do ambulatório, a coleta foi realizada no mesmo período da consulta hematológica, respeitando o tempo determinado de 4 horas sem micção para realizar a coleta de urina. O protocolo de coleta sugerido foi o mesmo de uma coleta de urina padrão e foi considerado DI os valores acima de >400 µmol/L (Patney et al., 1979).

4.4.3 Infecções por Protozoários e Helmintos

A coleta de fezes foi realizada pelos responsáveis pelos menores em suas residências, sendo três amostras de fezes preservadas em formaldeído, em dias alternados. Para os participantes que residiam no município de Aracaju, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas HU-UFS. Para os participantes que residiam no interior do estado de Sergipe, foi orientando que as amostras fossem encaminhadas ao posto de saúde local para realização da análise. As amostras foram avaliadas pelo método de *Hoffmam* para detectar o estado de infecção, se positivo ou negativo (DE CARLI, 1995) . Posteriormente, os

participantes com resultados positivos fizeram o tratamento indicado para cada parasitose encontrada.

4.4.4 Estado Nutricional

O estado nutricional foi avaliado utilizando a antropometria, por ser um método simples, barato, não invasivo e de fácil obtenção e padronização.

Altura (em centímetros) e peso corporal (em quilos) foram aferidos com roupas leves e sem sapatos, utilizando-se uma balança de marca Filizola[®], com capacidade de 150 Kg e precisão de 100g, com estadiômetro acoplado com escala de 0,5 cm.

Os índices antropométricos foram calculados com base nos dados de peso e altura coletados e posteriormente os dados foram importados para o software AntroPlus. Foram calculados o escore-z para os índices de estatura para idade (E/I) e índice de massa corporal para idade (IMC/I), com base nas curvas de referência publicadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2007). Sendo considerado deficiência o escore-Z < -2 para ambos os índices (E-I e IMC-I) e magreza o IMC/I < -2 escore-Z, sobrepeso IMC/I entre 1 e 2 escore-Z e obesidade IMC/I ≥ 2 escore-Z (WHO, 2006).

As medidas antropométricas de todos os participantes foram aferidas pela pesquisadora B.M.Z, responsável pela pesquisa, conforme recomendações e técnicas padronizadas.

4.4.5 Constipação Funcional

Avaliação pelos métodos: Critérios de Roma IV e Escala de fezes Bristol

A prevalência da constipação funcional neste estudo foi avaliada segundo os critérios de Roma IV, que é a diretriz mais recente utilizada para o diagnóstico de constipação funcional, tendo sido sua versão atualizada em 2016. Essa ferramenta consiste em avaliar a constipação funcional através de seis perguntas, de forma clara e objetiva. Foi considerado constipação funcional ≥2 dos critérios selecionados pelos participantes. O questionário foi aplicado pela pesquisadora B.M.Z e não houve avaliação de exame físico (DROSSMAN, 2016) (Anexo C).

As escalas que tratam do formato das fezes, como a *Bristol Stool Form Scale* (BSFS), teve como objetivo avaliar, de maneira descritiva, a forma do conteúdo fecal, utilizou-se

métodos gráficos que representam sete tipos de fezes, de acordo com sua forma e consistência. O formato das fezes se modifica em várias doenças intestinais, por exemplo, as diarreias infecciosas, colites, constipação intestinal, incontinência anal e síndrome do intestino irritável. A inovação dessa escala é que ela apresenta as imagens que ilustram as fezes, juntamente com descrições precisas quanto à forma e à consistência, recorrendo a exemplos facilmente reconhecíveis. A BSFS também já foi validada para o Brasil (MARTINEZ; DE AZEVEDO, 2012) (Anexo D).

A BSFS foi utilizada no momento da entrevista com todos os participantes, para que eles pudessem selecionar o tipo de fezes que mais se assemelhassem às suas próprias fezes, de acordo com a consistência e forma.

4.4.6 Características Sócio-econômicas e Demográficas

Para obtenção das características sócio-econômicas das famílias dos participantes, utilizou-se um questionário padrão para extrair informações como sexo, idade, etnia, moradia, e renda mensal. Para uma maior amplitude de informações a respeito do quadro de DI, utilizou-se um questionário anexo ao sócio-econômico, incluindo informações como tipo de parto e tempo de amamentação. Todas as perguntas foram realizadas pela pesquisadora B.M.Z. (Apêndice C).

4.4.8 Análise dos Dados

A análise descritiva foi realizada através de frequências absolutas e relativas, no caso das variáveis categóricas, e de medidas de tendência central e variabilidade, no caso das variáveis contínuas. As diferenças entre os três grupos foram avaliadas através do teste de Qui-Quadrado e do teste de Kruskal Wallis, devido à distribuição não-paramétrica da maioria das variáveis. Foi utilizado o modelo linear generalizado com distribuição Gamma, com função de ligação logarítmica, sendo realizado em três etapas: modelo univariado, modelo controlado, incluindo todas as variáveis no modelo, e modelo ajustado, mantendo apenas as variáveis significativas a 5%, para avaliar a relação entre Indican e grupos com DF e controle, usando as variáveis clínicas, sociais e demográficas como controle.

4.4.9 Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe (CEP-UFS), com o parecer de número: 2.389.370 (APÊNDICE B).

5. RESULTADOS

Foram elegíveis 98 crianças e adolescentes, com idade entre 05 a 18 anos. Destas, 38 crianças e adolescentes com DF pertenciam ao grupo 1 (G1), 29 crianças e adolescentes com DF pertenciam ao grupo 2 (G2) e 31 crianças e adolescentes saudáveis pertenciam ao grupo controle (G3).

Na Tabela 1 são descritas algumas características dos grupos avaliados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos em relação às variáveis sexo, faixa etária, etnia, tipo de parto, período de amamentação e estado nutricional avaliado pela estatura /idade. Contudo, os grupos diferiram entre si em relação à renda familiar e maior frequência de excesso de peso. O grupo G1 apresentou maior renda salarial (p 0,007) e o grupo G3 apresentou maior prevalência de sobrepeso/obesidade (p 0,002).

Tabela 1. Situação sócio-econômica, tipo de parto, tempo de amamentação e estado nutricional dos grupos estudados.

	G1		G2		G3		Total		Valor p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sexo									
Feminino	20	53	16	55	16	52	52	53	0.960
Masculino	18	47	13	45	15	48	46	47	
Faixa etária									
< 10 anos	6	16	11	38	12	39	29	30	0.058
≥ 10 anos	32	84	18	62	19	61	69	70	
Etnia									
Negra	8	21	9	31	6	19	23	23	0.512
Parda	30	79	20	69	25	81	75	77	
Renda familiar mensal									
<1 salário-mínimo	2	5	7	24	11	36	20	20	0.007
≥ 1 salário-mínimo	36	95	22	76	20	64	78	80	
Tipo de parto									
Cesária	9	24	6	21	5	16	20	20	0.740
Normal	29	76	23	79	26	84	78	80	
Tempo de amamentação									
<12 meses	24	65	13	46	12	39	49	51	0.084
≥ 12 meses	13	35	15	54	19	61	47	49	
Estatura/idade									
Adequada	31	82	24	83	30	97	85	87	0.136
Baixa	7	18	5	17	1	3	13	13	
IMC/idade									
Baixo peso	3	8	-	-	1	3	4	4	0.002
Eutrofia	32	84	28	97	19	61	79	81	
Sobrepeso/Obesidade	3	8	1	3	11	36	15	15	

Teste Qui-Quadrado.

n: número de indivíduos. G1: grupo com DF em uso de hidroxiuréia. G2: grupo com DF sem uso de hidroxiuréia. G3: grupo controle. Valor do salário mínimo: R\$ 998,00.

Quanto à presença de parasitose, o grupo G2 apresentou maior frequência em relação aos demais grupos (p 0,017). Não houve diferenças significativas na escala de fezes de Bristol e no número de critérios de Roma IV (Tabela 2).

Tabela 2. Parasitose intestinal, Escala de fezes de Bristol e constipação funcional dos grupos estudados.

	G1		G2		G3		Total		Valor p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Parasitose*									
Não	17	71	6	35	17	77	40	64	0.017
Sim	7	29	11	65	5	23	23	36	
Escala Bristol									
Tipo 1 e 2	7	18	7	24	3	10	17	17	0.327
Tipo 3,4,5,7	31	82	22	76	28	90	81	83	
Nº critérios Roma IV									
≥ 2	9	24	6	21	8	26	23	24	0.896
< 2	29	76	23	79	23	74	75	76	

p-valor determinado pelo Teste Qui-Quadrado. *n=63

n: número de indivíduos. G1: grupo com DF em uso de hidroxiureia. G2: grupo com DF sem uso de hidroxiureia. G3: grupo controle.

Em relação aos índices antropométricos, observou-se que no grupo G3, os índices estatura-para-idade (E/I) e IMC/I foram significativamente maiores em relação aos grupos com DF (G1 e G2) (Tabela 3).

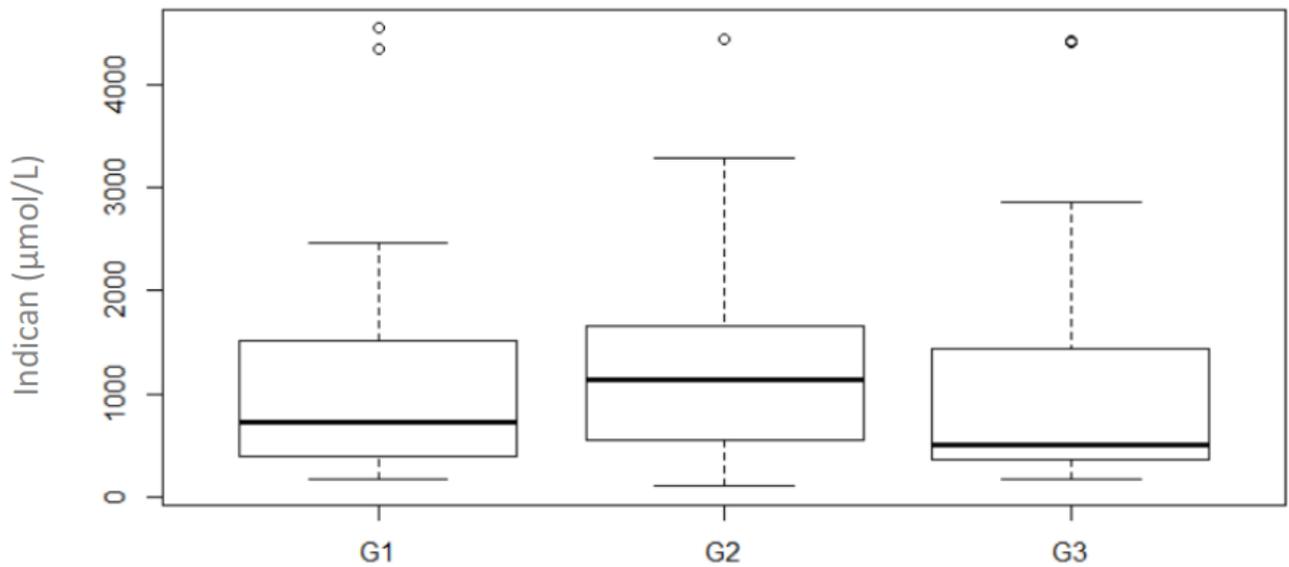
Tabela 3. Estado nutricional dos grupos avaliados.

	Média	DP	P25	P50	P75	Valor p
Estatura/idade(score z)						
G1	-0.91	1.43	-1.44	-0.81	-0,18	<0.001
G2	-1.16	1.04	-1,72	-0.93	-0,63	
G3	0.86	1.37	-0,17	1.03	1,86	
IMC/idade(score z)						
G1	-0.35	1.08	-1,10	-0.21	0,45	0.002
G2	-0.46	0.96	-1.40	-0.41	0,18	
G3	0.53	1.30	-0,42	0.63	1,45	

DP = desvio padrão da média, G1: grupo com DF em uso de hidroxiureia. G2: grupo com DF sem uso de hidroxiureia. G3: grupo controle. Teste Kruskal – Wallis.

Em relação ao teste colorimétrico para avaliar DI (Indican), foi considerado DI, os valores acima de >400 µmol/L (Figura 1).

Observaram-se médias ± desvios-padrão acima de 1,070 ± 1016,40 considerando DI, no entanto, as diferenças não foram significativas entre os grupos avaliados (p 0,533) (Tabela 4).

Figura 1. Dosagem de Indican na urina dos grupos estudados.

G1: grupo com DF em uso de hidroxiuréia. G2: grupo com DF sem uso de hidroxiuréia. G3: grupo controle.

Tabela 4. Avaliação das dosagens do Indican entre os grupos avaliados.

	Média	DP	P50	P25	P75	Valor p
Indican (mg/L)						
G1	268,95	255,37	182,30	97,23	379,51	0.554
G2	321,72	293,10	189,79	106,92	451,92	
G3	266,69	292,60	126,40	82,61	368,72	
Indican (µmol/L)						
G1	1.070,43	1.016,40	725,57	386,95	1.510,45	0.533
G2	1.310,92	1.180,01	819,41	406,28	1.938,97	
G3	1.061,41	1.164,57	503,09	328,80	1.467,50	

Teste de Kruskal Wallis. P=percentil

G1: grupo com DF em uso de hidroxiuréia. G2: grupo com DF sem uso de hidroxiuréia. G3: grupo controle.

Na análise estatística usando o modelo multivariado controlado, foi observado que as concentrações de Indican, como variável dependente, não foram diferentes entre os grupos caso e o grupo controle. No modelo ajustado, independente da doença, crianças e adolescentes nascidos de parto normal apresentaram menores concentrações de Indican, e aqueles amamentados em um período maior do que 12 meses de idade, com tipo de fezes 1 e 2, característico de constipação intestinal, apresentaram maiores concentrações de Indican (IC 95% -1,33 a -0,41; 0,51 a 1,24; 0,02 a 1,05, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5. Modelo linear generalizado, univariado, controlado e ajustado entre os níveis do Indican e fatores associados.

	B_R (IC95%)	B_C (IC95%)	B_A (IC95%)	p-valor
Grupo				
G1	-0,07 (-0,57;0,42)	0,60 (0,03;1,18)		
G2	0,33 (-0,22;0,89)	0,50 (-0,19;1,18)		
G3	1	1		
Sexo				
Feminino	0,38 (-0,05;0,81)	0,21 (-0,17;0,59)		
Masculino	1	1		
Parto				
Cesária	1	1	1	
Normal	-0,96 (-1,48;-0,43)	-0,98(-1,44;-0,51)	-0,87 (-1,33;-0,41)	<0,001
Tempo de amamentação				
≤ 12 meses	1	1	1	
>12 meses	0,77 (1,17;0,38)	0,97 (0,59;1,35)	0,87 (0,51;1,24)	<0,001
Renda				
<1 salário-mínimo	0,34 (-0,17;0,85)	0,46 (0,01;0,91)		
≥ 1 salário-mínimo	1	1		
Escala de Bristol				
Tipo 1, 2	0,30 (-0,31;0,90)	0,42 (-0,12;0,97)	0,53 (0,02;1,05)	0,043
Tipo 3, 4,5,7	1	1	1	
Critério de Roma				
<2	-0,16 (-0,70;0,38)	-0,20 (-0,71;0,32)		
≥2	1	1		
Parasitose				
Sim	0,42 (-0,02;0,87)	0,10 (-0,34;0,54)		
Não	1	1		
Idade				
Estatura/idade	-0,03 (-0,09;0,03)	-0,03 (-0,09;-0,02)		
IMC/idade	0,01 (-0,14;0,16)	0,01 (-0,15;0,17)		
	-0,12 (-0,31;0,07)	0,06 (-0,14;0,26)		

B_R – Parâmetro estimado no modelo univariado da regressão Log-Gamma; B_C – Parâmetro estimado no modelo controlado da regressão Log-Gamma; B_A – Parâmetro estimado no modelo ajustado da regressão Log-Gamma. IC95% – Intervalo com 95% de confiança.

G1: grupo em uso de hidroxiuréia. G2: grupo com DF sem uso de hidroxiuréia. G3: grupo controle.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo revelou a presença de altas concentrações urinárias de Indican, caracterizando um quadro de DI em crianças e adolescentes com DF, sendo 74% no G1, 76% no G2 e 65% no G3, no entanto, não se observou diferença significativa entre os grupos. Dutta et al (2019b) relataram o aumento dos níveis urinários de 3-indoxil sulfato urinário (3-IS) em adultos portadores de DF, em comparação com o grupo controle sem DF. Os altos índices de 3-IS foram relacionados à abundância intestinal de *Clostridiales*, provavelmente devido ao supercrescimento bacteriano ligado ao 3-IS e aumento de neutrófilos envelhecidos que são fundamentais na iniciação e propagação de CVOs. Os resultados do presente estudo sugerem DI semelhante em crianças e adolescentes com DF e aqueles sem DF.

No presente estudo, variáveis como tipo de parto, tempo de amamentação e presença de constipação intestinal influenciaram significativamente na variação da concentração de Indican. Observou-se que crianças e adolescentes nascidos de parto normal (80%) apresentaram menores concentrações de Indican (IC 95% -1,33 a -0,41). Durante o parto normal, o contato com a microbiota vaginal e intestinal da mãe é a fonte mais importante para a colonização microbiana infantil, favorecendo a colonização de bactérias de proteção como *Lactobacilos*, *Prevotella* e *Bifidobactérias* (DOMINGUEZ-BELLO; COSTELLO; CONTRER et al., 2010).

Stinson et al (2018) observaram uma diferença transitória na MI de bebês nascidos de parto cesáreo em comparação com bebês nascidos de parto normal. A modificação das comunidades microbianas podem levar a um estado de DI, aumentando a chance de surgir uma variedade de distúrbios imunológicos, inflamatórios e metabólicos. Isso pode sustentar o aumento da incidência de asma, alergias, obesidade, diabetes mellitus tipo 1, doença inflamatória intestinal e doenças auto-imunes em bebês nascidos de parto cesáreo.

Considera-se expressiva a alta taxa de parto normal entre os grupos do presente estudo, sugerindo um fator de proteção positivo para a MI, principalmente para os grupos com DF, uma vez que estes pacientes são mais susceptíveis a certas infecções bacterianas, principalmente nos cinco primeiros anos de vida.

Observou-se que o período de amamentação maior do que 12 meses de idade (49%) esteve associado com uma maior concentração de Indican (IC 95% 0,51 a 1,24). Ao contrário dos resultados apresentados, sabe-se que lactentes alimentados com leite materno têm uma MI rica em *Lactobacilos*, *Staphylococcus* e *Bifidobacterium*, enquanto a MI de bebês alimentados com fórmula infantil é mais complexa e semelhante à de um adulto, com contagens

aumentadas de *Roseburia*, *Clostridium* e *Anaerostipes*, além de maiores quantidades de microrganismos associados à inflamação (BACKHED; ROSWALL; PENG et al., 2015; O'SULLIVAN; FARVER; SMILOWITZ). Além disso, alguns estudos observaram que 27% da MI de uma criança é derivada verticalmente do leite materno da mãe, enquanto 10% são provenientes da pele ao redor da aréola (PANNARAJ; LI; CERINI et al, 2017). Algumas variáveis, como ambiente doméstico, hábitos de higiene, presença de animais de estimação, uso de antibióticos, estado nutricional da mãe, dieta materna/infantil, dentre outros fatores de exposição (STINSON; PAYNE; KEELAN et al, 2018), também podem estar relacionadas às mudanças na MI materna/infantil associadas ao quadro de DI.

A ocorrência de maiores concentrações de Indican (IC 95% 0,02 a 1,05) também estiveram associadas com os tipos de fezes 1 e 2, característicos de constipação funcional em 24% dos grupos, de acordo com os critérios de Roma IV. O tempo prolongado das fezes no intestino de indivíduos com constipação funcional pode levar à DI, o que pode afetar a função imune intestinal, a motilidade e a função de barreira intestinal (ZHU; LIU; ALKHOURI et al 2014), com uma diminuição relativa de bactérias de proteção, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides* spp. e um aumento paralelo de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Campylobacter jejuni* (GERRITSEN; SMIDT; RIJKERS et al 2011; ZHU; LIU; ALKHOURI et al 2014). A constipação é uma desordem gastrointestinal funcional predominante, acompanhada de DI, no entanto, a relação causal entre DI e constipação permanece pouco compreendida (CAO; LIU; AN et al 2017). Maiores taxas de parto cesáreo, menor tempo de amamentação, alimentação rica em alimentos ultraprocessados e histórico familiar positivo para constipação intestinal foram observados em crianças constipadas, associados com o quadro de DI (MORAES; MOTTA; BELTRÃO et al, 2016).

Apesar de serem escassos os estudos que expliquem a relação de causalidade entre constipação funcional e aumento das concentrações de Indican urinário, acredita-se que o trânsito colônico lento associado ao aumento de microrganismos patogênicos podem alterar o pH uro-fecal para valores alcalinos, possibilitando um maior crescimento bacteriano patogênico associado ao quadro de DI (GIBSON; ROBERFROID, 1995; LAURINO; PALMIERI; ESPOSITO et al, 2016).

Limitações do estudo

Uma limitação do presente estudo foi a ausência de avaliação da ingestão alimentar, especialmente a ingestão de proteínas. Entretanto, estudos apontam que diferentes concentrações de proteínas na dieta não alteram as concentrações urinárias de Indican (CASSANI et al, 2015; BRITO et al, 2016). Outra limitação foi a ausência de um valor preditivo para o teste Indican quando utilizado para avaliar DI em crianças e adolescentes, o que limitou o poder de estudo. Sugere-se que mais estudos utilizem e avaliem esta ferramenta nesta população.

7. CONCLUSÃO

Foram observadas altas concentrações urinárias de Indican em pacientes com DF, assim como no grupo controle, sendo indicativo de disbiose intestinal, sem diferença significativa. Observou-se que variáveis como tipo de parto, tempo de amamentação e constipação funcional foram influenciadas pelas concentrações de Indican, independente da presença da doença entre os grupos.

Considerações relevantes

Este é um dos primeiros estudos que avalia a presença de disbiose em crianças e adolescentes com DF, por meio da análise das concentrações de indoxil sulfato urinário, que é uma análise indireta da microbiota intestinal. Não foi possível concluir, por meio do método utilizado, se o diagnóstico de disbiose nesta população é fator patológico ou fisiológico. São necessários mais estudos que avaliem o desfecho disbiose intestinal em crianças e adolescentes para fins comparativos, utilizando o indoxil sulfato urinário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGANS, R.; RIGSBEE, L.; KENCHE, H.; MICHAIL, S.; KHAMIS, H.J, PALI, O. Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. **FEMS Microbiol Ecol.** 2011 Aug;77(2):404-12.
- AHMED, J.; KUMAR, A.; JAFRI, F.; BATOOL, S.; KNOLL, B.; LIM, S.H. Low Incidence of Hospital-Onset *Clostridium difficile* Infection in Sickle Cell Disease. **N Engl J Med.** 2019 Feb 28;380(9):887-888.
- ALONSO, C.; VICARIO, M.; PIGRAU, M.; LOBO, B.; SANTOS, J. Intestinal barrier function and the brain-gut axis. In: Lyte M, Cryan JF, editors. Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease. **New York: Springer;** 2014. pp. 73–113.
- ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. Disbiose intestinal. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica.* v. 24, n. 1, p. 58-65. 2009.
- ARPAIA, N.; CAMPBELL, C.; FAN, X et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature.** 2013;504:451–455.
- ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D.; YAMADA, T., and MENDE, D.R. et al. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature** 473: 174–180.
- ATA, B.; YILDIZ, S.; TURKGELDI, E.; BROCAL, V.P.; DINLEYICI, E.C.; MOYA, A.;URMAN,B. The Endobiota Study: Comparison of Vaginal, Cervical and Gut Microbiota Between Women with Stage 3/4 Endometriosis and Healthy Controls. **Sci Rep.** 2019; 9: 2204.
- BACKHED, F.; ROSWALL, J.; PENG, Y *et al.* Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. **Cell Host Microbe**, 17 (2015), p. 852.
- BAYRAM, B.; GONZALEZ-SARRIAS, A.; ISTAS, G et al. Breakthrough in the health effects of plant food bioactives; A perspective on microbiomics, Nutri(epi)genomics, and metabolomics. **J Agric Food Chem.** 2018;66(41):10686–10692.
- BISCHOFF, S.C.; BÁRBARA, G.; BUURMAN, W, et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterol.** 2014; 14 : 189.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. 2013. Diagnóstico laboratorial nas doenças falciformes. In: IVO, M. L. (Org.). **Hematologia:** um olhar sobre a doença falciforme. Campo Grande: Ed. UFMS, p. 45-72.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de condutas básicas na doença falciforme. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde;** 2006.
- BRIM, H.; VILMENAY, K.; ATEFI, N.; DAREMIPOURAN, D.; LEE, E.L.; VARMA, S.; O'NEAL, P.; ASHKTORAB, H. GUT Microbiome Analysis Reveals Major Dysbiosis in

Sickle Cell Diseases Patients with a Prevalence of Veillonella Strains. **Gastroenterol Clin North Am.** 2017;Vol. 152, Issue 5, Supplement 1, Page S631.

BRITO, J. S.; BORGES, N.A.; DOLENGA, C.J.R.; CARRARO-EDUARDO, J.C.; NAKAO, L.S.; MAFRA, D. Há relação entre ingestão alimentar de triptofano e níveis plasmáticos de indoxil sulfato em pacientes renais crônicos em hemodiálise? **J. Bras. Nefrol.** vol.38 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2016.

BRITTENHAM, G.M.; SCHECHTER, A.N.; NOGUCHI, C.T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. **Blood.** 1985. January;65(1):183-189.

BUNN, HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N Engl J Med** 337: 762–769, 1997.

CAMILLERI, M.; MADSEN, K.; SPILLER, R.; GREENWOOD-VAN.; MEERVELD, B.; VERNE, G.N. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. **Neurogastroenterol Motil.** 2012;24:503–512.

CAMMAROTA, G.; IANIRO, G.; TILG, H.; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; KUMP, P.; SATOKARI, R, et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. **Gut** 2017; Vol. 66, issue 4:569-80.

CAMMAROTA, G.; MASUCCI, L.; IANIRO, G.; BIBBO, S.; DINOI, G.; COSTAMAGNA, G, et al. Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation by colonoscopy vs. vancomycin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2015;41(9):835-43.

CARICILLI, AM.; PICARDI, PK.; de ABREU, LL.; UENO, M.; PRADA, PO.; et al. (2011) Gut Microbiota Is a Key Modulator of Insulin Resistance in TLR 2 Knockout Mice.

CASSANI, E.; BARICHELLA, M.; CANCELLO, R.; CAVANNA, IORIO, L.; CEREDA, E.; BOLLIRI, C.; ZAMPELLA, M.P.; BIANCHI, F.; CESTARO, B.; PEZZOLI, G. Increased urinary indoxyl sulfate (indican): New insights into gut dysbiosis in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.** 2015.

CAO, H.; LIU, X.; AN, Y.; ZHOU, G.; LIU, Y.; XU, M.; DONG, W.; WANG, S.; YAN, F.; JIANG, K.; WANG, B. Dysbiosis contributes to chronic constipation development via regulation of serotonin transporter in the intestine. **Sci Rep.** 2017 Sep 4;7(1):10322.

CHABE, M.; LOKMER, A.; SEGUREL, L. Gut protozoa: Friends or foes of the human gut microbiota? **Trends Parasitol.** 2017, 33, 925–934.

CHAMBERS, J.B.; FORSYTHE, D.W.; BERTRAND, S.L.; IWINSKI, H.J.; STEFLIK, D.E. RETROSPECTIVE REVIEW OF OSTEOARTICULAR INFECTIONS IN A PEDIATRIC SICKLE CELL AGE GROUP. **J PEDIAT ORTHOP.** 2000; 20(5):682-5.

CHARACHE, S.; DOVER, G.J.; MOORE, R.D, et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood** 1992; 79: 2555–65.

CLEMENTE, J.C.; URSELL, L.K.; PARFREY, L.W & KNIGHT. R. (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, 148(6), 1258-70.

COGILL, B. Anthropometric indicators measurement guide. Food and Nutrition Technical Assistance Project. **Academy for Education Development**, Washington, jun. 2001.

DE CARLI, G. A. Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas, Devid Pereira Neves. Parasitologia humana – 11.ed. – São Paulo Editora e técnicas. Rio de Janeiro: Medsi. pp. 455-459, 2011. Atheneu, 2005.

DEVLIN, A.S.; MARCOBAL, A.; DODD, D.; NAYFACH, S.; PLUMMER, N.; MEYER, T.; POLLARD, K.S.; SONNENBURG, J.L.; FISCHBACH, M.A. Modulation of a Circulating Uremic Solute via Rational Genetic Manipulation of the Gut Microbiota. **Cell Host Microbe**. 2016 Dec 14;20(6):709-715.

DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; COSTELLO, E.K.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 2010;107:11971–11975.

DUTTA, D.; METHE, B.; MORRIS, A.; LIM, SH. Elevated urinary 3-indoxyl sulfate in sickle cell disease. **Am J Hematol**. (2019a) Jun;94(6):E162-E164.

DUTTA, D.; METHE, B.; AMAR, S.; MORRIS, A.; LIM, S.H. Intestinal injury and gut permeability in sickle cell disease. **J Transl Med**. (2019b); 17: 183. Published online 2019 May 30.

DROSSMAN, D. Sp346: Overview of Rome IV: Changes in Criteria and New Educational Concepts. Presented at: **Digestive Disease Week**; May 21-24, 2016; San Diego.

ECKBURG, P.B.; BIK, E.M.; BERNSTEIN, C.N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**. 2005;308:1635–1638.

FALONY, G.; JOOSSENS, M.; VIEIRA-SILVA, S.; WANG*, J.; DARZI, Y.; FAUST, K *et al.* (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. **SCIENCE** 352: 560–564.

FATORUSSO, A.; DI GENOVA, L.; DELL'ISOLA, G.B.; MENCARONI, E.; ESPOSITO, S. Autism Spectrum Disorders and the Gut Microbiota. **Nutrients**. 2019 Feb 28;11(3). pii: E521.

FRANCO, V.; FLORENA, A.M.; IANNITTO, E. Splenic marginal zone lymphoma. **Blood**. 2003;101(7):2464–2472.

GABORIAU-ROUTHIAU, V.; RAKOTOBE, S.; LÉCUYER, E.; MULDER, J.; LAN, A.; BRIDONNEAU, C et al. (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of intestinal T cell responses. *Imunidade* 31 677–689. 10.1016 / **j.immuni**.2009.08.020.

GALLO, R.L.; HOOPER, L.V. (2012) Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. **Nat. Rev. Immunol**. 12, 503–516.

GERRITSEN, J.; SMIDT, H.; RIJKERS, G.T, DE VOS, W.M. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr.* 2011;6(3):209–240.

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

HAWRELAK, J.A.; MYERS, S.P (2004) The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev* 9: 180-197.

HIBBERT, J.M.; CREARY, M.S.; GEE, B.E.; BUCHANAN, I.D.; QUARSHIE, A.; HSU, L.L. Erythropoiesis and myocardial energy requirements contribute to the hypermetabolism of childhood sickle cell anemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Nov;43(5):680-7.

HILL, D.A.; ARTIS, D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 2010;28:623–67.

HOLLISTER, E.B., RIEHLE, K.; LUNA, R.A et al. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome.* 2015; 3: 36.

HOOPER ,L.V.; GORDON, J.I (2001) Commensal Host-Bacterial Relationships in the gut. *Science* 292:1115-1117.

HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM (HMP). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207–214.

IERACI, A.; FORNI, P. E.; PONZETTO, C. (2002). Viable hypomorphic signaling mutant of the met receptor reveals a role for hepatocyte growth factor in postnatal cerebellar development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15200–15205.

KAPOOR, S.; LITTLE, J.A.; PECKER, L.H. Mayo Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. *Clin Proc.* 2018 Dec;93(12):1810-1824.

KARIM, A.; AHMED, S.; ROSSOFF, L.J, SIDDIQUI, R.; FUCHS, A.; MULTZ, A.S. Fulminant ischaemic colitis with atypical clinical features complicating sickle cell disease. *Postgrad Med J.* 2002;78:370–372.

KELLY, C.R.; KHORUTS, A.; STALEY, C.; SADOWSKY, M.J.; ABD, M.; ALANI, M, et al. Effect of Fecal Microbiota Transplantation on Recurrence in Multiply Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine.* 2016; Vol. 165, issue 9:609-16.

KIM, Y.S.; UNNO, T.; KIM, B.Y.; PARK, M.S. Sex Differences in Gut Microbiota. *World J Mens Health.* 2019.

KIRKLAND, J.L.; MICHAEL ,LYE.; VARGAS, E. Indican excretion in the elderly. *Postgraduate Medical Journal* (November 1983) 59, 717-719.

KOENIG, J.E.; SPOR, A.; SCALFONE, N, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(suppl 1):4578–4585.

KOWALSKI, K.; MULAK, A. Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *M J Neurogastroenterol Motil.* 2019 Jan; 25(1): 48–60.

JESUS, A.C.M.; KONSTANTYNE, T.; LOBO, I.K.V.; BRAGA, J.A.P. *Rev. paul. pediatr.* vol.36 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2018.

LEDERBERG, J.; MCCRAY, A. Ome Sweet'Omics—a genealogical treasury of words. *Scientist.* 2001;15(8). <http://lhncbc.nlm.nih.gov/publication/lhncbc-2001-047>.

LEE, J.H.; LEE, J (2010) Indole como um sinal intercelular em comunidades microbianas . *FEMS Microbiol Rev* 34 : 426-444.

LEY, R.E.; BACKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C.A.; KNIGHT, R.D et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:11070–11075.

LIABEUF, S.; DRÜEKE, T.B.; MASSY, Z a. Protein-bound uremic toxins: New insight from clinical studies. *Toxins* (Basel). 2011;3:911–9.

LIM, S.H.; FAST, L.; MORRIS, A. Sickle cell vaso-occlusive crisis: it's a gut feeling. Lim et al. *J Transl Med* (2016) 14:334

LIM, M.Y.; ATAGA, K.I.; KEY, N.S. Hemostatic abnormalities in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol.* 2013;20(5):472–477. *J Transl Med* (2016) 14:334.

LIM, S.H.; METHÉ, B.A.; KNOLL, B.M.; MORRIS, A.; OBARO, S.K. Invasive non-typhoidal Salmonella in sickle cell disease in Africa: is increased gut permeability the missing link? *J Transl Med* (2018a) 16:239.

LIM, S.H.; MORRIS, A.; LI, K, et al. Intestinal microbiome analysis revealed dysbiosis in sickle cell disease. *Am J Hematol.* (2018b);93:E91–E93.

LOPETUSO, L.R.; PETITO, V.; GRAZIANI, C.; SCHIAVONI, E.; PARONI STERBINI, F.; POSCIA, A.; GAETANI, E.; FRANCESCHI, F.; CAMMAROTA, G.; SANGUINETTI, M.; et al. Gut Microbiota in Health, Diverticular Disease, Irritable Bowel Syndrome, and Inflammatory Bowel Diseases: Time for Microbial Marker of Gastrointestinal Disorders. *Dig. Dis.* 2018, 36, 56–65.

LORD, R.S.; BRALLEY, J.A. Clinical Applications of Urinary Organic Acids. Part 2. Dysbiosis Markers. *Alternative Medicine Review* Volume 13, Number 4 2008.

MACDONALD, T.T.; GORDON, J.N. Bacterial regulation of intestinal immune responses. *Gastroenterol Clin North Am.* 2005;34:401–412.

MACFARLANE, G. T & MACFARLANE, S. (2012) Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International*, 95(1), 50-60.

MARCHESI, J.R.; ADAMS, D.H, FAVA, F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 2016; 65: 330- 339.

MARTINEZ, A. P.; DE AZEVEDO, G. R. de. The bristol stool form scale: its translation to Portuguese, cultural adaptation and validation. **Rev. Latino-Am Enfermagem**, São Paulo, v. 20, n. 3, p.583-589, June 2012.

MORAES, J.G.; MOTTA, M.E.F.A.; BELTRÃO, M.F.S.; SALVIANO, T.L.; SILVA, G.A.P. Fecal Microbiota and Diet of Children with Chronic Constipation. **Int J Pediatr**. 2016; 2016: 6787269.

MORENO-INDIAS, I.; TORRES, M.; MONTSERRAT, J.M, et al. Intermittent hypoxia alters gut microbiota diversity in a mouse model of sleep apnoea. **Eur Respir J**. 2015;45:1055–1065.

MUGIE, S.M.; DI LORENZO, C.; BENNINGA, M.A. Constipation in childhood. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2011;8(9):502-11.

MURRAY, M.P.J.; PIZZORNO, J. Encyclopedia of natural medicine. Third Edition 3rd ed. (1988).

NIWA, T.; SHIMIZU, H. Indoxyl sulfate induces nephrovascular senescence. **J Ren Nutr**. 2012;22:102–106.

NAOUM, P.C. Anemias imigrantes: origem das anemias hereditárias no Brasil. **Ciência Hoje**. 1984; 3 (14): 59-64.

OKUNISHI, K.; DOHI, M.; NAKAGOME, K.; TANAKA, R.; MIZUNO, S., MATSUMOTO, K., et al. (2005). A novel role of hepatocyte growth factor as an immune regulator through suppressing dendritic cell function. **J. Immunol**. 175, 4745–4753.

O'SULLIVAN, A.; FARVER, M.; SMILOWITZ, JT. The influence of early infant-feeding practices on the intestinal microbiome and body composition in infants. **Nutr Metab Insights**, 8 (2015), pp. 1-9.

PANNARAJ, P.S.; LI, F.; CERINI, C.; BENDER, J.M.; YANG, S.; ROLLIE, A et al. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. **JAMA Pediatr** (2017).

PICKARD, J.M.; MAURICE, C.F.; KINNEBREW, M.A et al. Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host-commensal symbiosis in sickness. **Nature**. 2014;514:638–641.

POWELL-JACKSON, P.R.; MAUDGAL, D.P.; SHARP, D.; GOLDIE, A.; MAXWELL, J.D. Intestinal bacterial metabolism of protein and bile acids: role in pathogenesis of hepatic disease after jejunio-ileal bypass surgery. **Br J Surg** 1979 Nov;66(11): 772e5.

RAKOFF-NAHOUM, S.; PAGLINO, J.; ESLAMI-VARZANEH, F.; EDBERG, S.; MEDZHITOV, R. The recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell** 2004; 118 : 229-241.

RANJAN, R.; RANI, A.; METWALLY, A.; MCGEE, H.S.; PERKINS, D.L. . Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. **Biochem Biophys Res Commun.**2016;469:967-77.

RAUFF, B.; IDREES, M.; SHAH, S.A et al. Hepatitis associated aplastic anemia: a review. **Virol J.** 2011;8:87.

ROME IV diagnostic criteria for functional GI disorders released at DDW. June 23, 2016. Accessed 05/11/16 at: <http://bit.ly/28QsQMmu>.

SHREINER, A.B.; KAO, JY.; JOVEM, VB. (2015). The intestinal microbiome in health and disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 31 69–75. 10.1053 / **J. Gastro.**2014.03.032.

STEVENS, MC.; MAUDE, GH.; BECKFORD, M.; GRANDISON, Y.; MASON, K.; TAYLOR, B.; SERJEANT, BE.; HIGGS, DR.; TEAL, H.; WEATHERALL, DJ. et al. Alpha thalassemia and the hematology of homozygous sickle cell disease in childhood. **Blood.** 1986;67:411–4.

STINSON, L.F.; PAYNE, M.S.; KEELAN, J.A. A Critical Review of the Bacterial Baptism Hypothesis and the impact of Cesarean Delivery on the infant Microbiome. **Front. Med.**, 04 May 2018.

STUART, M.J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **Lancet.** 2004; 364(9442):1343-60.

TAMM, AO. Biochemical activity of intestinal 28. microflora in adult coeliac disease. **Nahrung** 1984;28:711-715.

TANG, W.H.; KITAI, T.; HAZEN, S.L (2017) Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. **Circ Res** 120: 1183-1196.

TAVAKOLI, S.; XIAO, L. Depletion of Intestinal Microbiome Partially Rescues Bone Loss in Sickle Cell Disease Male Mice. *Scientific Reports* **vol. 9**, Article number: 8659 (2019).

TORO-LONDONO, M.A.; BEDOYA-URREGO, K.; M.; GALVAN-DIAZ, A.L.; ALZATE, J.F. Intestinal parasitic infection alters bacterial gut microbiota in children. **PeerJ.** 2019 Jan 7;7:e6200.

TURHAN, A.; WEISS, L.A.; MOHANDAS, N.; COLLER, B.S.; FRENETTE, O.S **Proc Natl Acad. Sci EUA A.** 2002 5 de março; 99 (5): 3047-51.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C.M.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. The human microbiome project. **Nature.** 2007;449(7164):804–810.

UMEAKUNNE, K.; HIBBERT, J.M. Nutrition in sickle cell disease: recent insights. **Nutrition and Dietary Supplements.** 2019; 82.117.84.168.

WANG, L. W.; TANCREDI, D. J.; THOMAS, D. W. (2011). The prevalence of gastrointestinal problems in children across the United States with autism spectrum disorders from families with multiple affected members. **J. Dev. Behav. Pediatr.** 32, 351–360.

WARE, R.E.; DAVIS, B.R.; SCHULTZ, W.H et al. Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia–TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWiTCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. **Lancet**. 2016; 387: 661-670.

WARE, R. E.; MONTALEMBERT, M.; TSHILOLO, L.; ABBOUD, M. R. Sickle cell disease. **Lancet**. 2017 Jul 15;390(10091):311-323.

WEBER D, OEFNER PJ, HIERGEIST A, et al. Low urinary indoxyl sulfate levels early after transplantation reflect a disrupted microbiome and are associated with poor outcome. **Blood**. 2015;126:1723–1728.

WELLS, J.M.; ROSSI, O.; MEIJERINK, M.; VAN BAARLEN, P. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. **Proc Natl Acad. Sci U S A**. 2011;108.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity. Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity, Geneva: **World Health Organization**; 1997. p. 107-158.

ZHANG, D.; CHEN, G.; MANWANI, D.; MORTHA, A.; XU, C.; FÉ, J.J, et al Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. **Nature**. 2015;525:528–32.

ZHU, L.; LIU, W.; ALKHOURI, R.; BAKER, R.D.; BARD, J.E.; QUIGLEY, E.M et al. Structural changes in the gut microbiome of constipated patients. **Physiol Genomics** 46, 679–686 (2014).

ZIMMERMAN, M.A.; SINGH, N.; MARTIN, P.M et al. Butyrate suppresses colonic inflammation through HDAC1-dependent Fas upregulation and Fas-mediated apoptosis of T cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 2012;302(12):G1405–G1415.

9. APÊNDICES

9.1 Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “Indoxil sulfato urinário (indican) em crianças e adolescentes com doença falciforme: avaliação de disbiose intestinal e fatores associados”

Pesquisadora: Beatriz Mascarenhas Zuin

Universidade Federal de Sergipe – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Telefones: (79) 9 9605-0012 ou 9 9129-2045

Senhores pais ou responsáveis,

Nós somos pesquisadores da Universidade federal de Sergipe e estamos fazendo uma pesquisa e gostaríamos que seu filho (a) fizesse parte.

A pesquisa tem como objetivo avaliar o desequilíbrio do intestino através do exame de urina e exame de fezes. Para participar da pesquisa seu filho (a) precisa ter de 05 à 18 anos de idade. Inicialmente após os responsáveis aceitarem que os filhos (a) participem da pesquisa será realizado uma entrevista através de questionários para coletarmos informações sobre quantas vezes seu filho faz coco e como são as fezes dele, além das perguntas será realizado exames físicos como pesar, medir e circunferência da cintura (medir a barriga).

Caso o participante se sinta constrangido por qualquer motivo no decorrer da sua participação na pesquisa, poderá no mesmo momento comunicar a pesquisadora e caso não queira mais participar da pesquisa será respeitada sua decisão.

Sua participação é voluntária, ou seja, se não quiser seu filho (a) não participa. Também poderá desistir de participar da pesquisa ou ter acesso às informações em qualquer momento sem nenhum problema para ele ou para ela.

O estudo trará o benefício de sabermos se seu filho (a) tem algum tipo de verme no intestino que esteja causando algum desequilíbrio em seu organismo ou provocando alguma doença. Esta pesquisa também servirá como uma ferramenta importante de apreciação clínica dos pacientes com doença falciforme em Sergipe. Através dele, esperamos melhorar o modo como esses pacientes são tratados.

As informações que colheremos são confidenciais e serão utilizadas apenas para este estudo.

Depois de ter recebido explicações sobre o estudo, concordo de livre e espontânea vontade em participar do presente estudo. Aracaju/SE, _____ de _____ de _____

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador

9.2 Apêndice B

<p>UFS - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE</p> 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
<p>Título da Pesquisa: Indoxil sulfato urinário (indican) em crianças e adolescentes com doença falciforme: avaliação de disbiose intestinal e fatores associados.</p> <p>Pesquisador Responsável: Beatriz Mascarenhas Zuin</p> <p>CAAE: 78646817.4.0000.5546</p> <p>Número do parecer: 2.389.370</p> <p>Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE</p> <p>Situação da Versão do Projeto: Aprovado</p> <p>Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável</p>

9.3 Apêndice C

QUESTIONÁRIO SOCIAL E CLÍNICO

NÚMERO PRONTUÁRIO:

DATA:

ENTREVISTADOR:

Dados Pessoais:

Nome: _____

Data de Nascimento: _____ Naturalidade: _____

Telefone: _____ Cor da pele: _____

Endereço: _____

Nome do responsável: _____

Dados Sócio-econômicos :

Nível de escolaridade:

Pai _____ Mãe _____

Qual a profissão:

Pai _____ Mãe _____

Números de filhos: _____

Recebe algum benefício do governo () Sim Não () Qual? _____

Qual a renda familiar: _____

Dados do menor:

Escolaridade: _____

Qual o período? _____

Qual o meio de transporte para a escola _____

Faz quantas refeições na escola? _____

Pratica atividade física? () Sim () Não () frequência

Dados Clínicos:

Data do diagnóstico (DF): _____ Tempo de tratamento: _____

Medicamentos: _____

Outras doenças: _____

Data da última internação: _____ Motivo: _____

Episódios de quadros agudos nas duas últimas semanas? () Sim () Não

Retirou o baço () Sim () Não

Saúde bucal: () adequada () inadequada () em tratamento () aparelho ortodôntico () prótese

Dados Nutricionais:

Aleitamento materno () Sim () Não Quanto tempo? _____ Tipo de parto PN () PC ()

Faz uso de qual tipo de leite? _____ quantas vezes dia? _____

Faz uso de mingau no leite? _____

Faz uso de suplementos vitamínicos? _____

Faz uso de suplementos alimentares? _____

Como é o seu apetite? () Normal () Reduzido () Aumentado

Qual a frequência intestinal? _____

Qual a característica das fezes (escala Bristol): _____

Presença de parasitose: () Sim () Não

Faz uso de laxantes? () Sim () Não Qual? _____

Faz uso de repositores da flora intestinal? () Sim () Não Qual? _____

Quantos copos de água bebe durante o dia? _____

Qual o tipo de água que você bebe? () torneira () filtro de barro () fervida () mineral

() poço artesiano

Dados Antropométricos:

IMC: _____

Classificação: _____

	1	2	3	MÉDIA
Peso atual (kg)				
Altura (cm)				
CC				

ANEXOS

ANEXO A. Artigo submetido para o *British Journal of Hematology* em 12 de Agosto de 2019. O comprovante de submissão do artigo encontra-se no Anexo B.

ELEVATED URINARY INDOXYL SULFATE (INDICAN) IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH SICKLE CELL DISEASE INDICATIVE OF INTESTINAL DYSBIOSIS?

Zuin, Beatriz Mascarenhas, Gurgel, Ricardo Queiroz, Magalhães, Lucas Sousa, Jardim-Botelho Anne, Silva, D.G Mascarenhas-Oliveira A.C, Barreto, Ikaro Daniel C, Cipolotti, Rosana.

SUMMARY

Introduction: Urinary indoxyl sulfate (Indican ID) is an organic acid derived from the L-tryptophan from diet, that is metabolized by intestinal bacteria through tryptophanases. Sickle cell disease (SCD) is one of the most prevalent genetic diseases worldwide. Current evidence has revealed the presence of intestinal injury and increased intestinal permeability in patients with SCD, suggesting intestinal dysbiosis. To evaluate intestinal dysbiosis in patients with SCD with and without hydroxyurea. A total of 67 patients with SCD and 31 controls were submitted following evaluations: indican test, parasitological stool analysis, anthropometric indices, Rome IV criteria, Bristol Scale, and socioeconomic and demographic status. Intestinal dysbiosis was verified in all groups, however, no significant differences were observed. It was found the presence of intestinal dysbiosis among the participants being 74% in G1, 76% in G2 and 65% in G3. Variables such as type of delivery, time of breastfeeding and functional constipation were associated with ID concentrations, regardless of the presence of the disease between the groups. High urinary ID concentrations were observed in patients with SCD, as well as in the control group, indicating intestinal dysbiosis, with no significant difference.

Keywords: Intestinal microbiota. Dysbiosis. Sickle cell disease. Nutritional status. L-Tryptophan, Constipation

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is the most prevalent genetic disease in the world (Ware et al., 2017). SCD pathophysiology is driven by the principles of hemoglobin S polymerization in red blood cells that originate sickle cells (Bunn, 1997; Brittenham *et al*, 1985). The formation of long polymeric fibers that grow within the erythrocytes triggers a cascade of several other cellular abnormalities that participate in the global pathophysiological mechanism of SCD, promoting cellular dehydration with physical and oxidative cellular stress (STUART & NAGEL, 2004). In general, manifestations of SCD are driven by two major pathophysiological processes: vasocclusion with ischemia-reperfusion and hemolytic anemia

According to Lim *et al* (2018b), SCD is directly associated with intestinal dysbiosis. There is indirect evidence supporting the occurrence of vaso-occlusive crisis (VOC) in splanchnic vessels, causing intestinal hypoxemia (Karim *et al*, 2002), leading to intestinal dysbiosis with changes in intestinal microbiota (IM) and increased intestinal permeability (Lim *et al* (2018a). Dutta *et al* (2019b) observed that reperfusion injury by hypoxia, besides altering the IM and reducing *Alistipes* and *Pseudobutyrvibrio*, induced a compensatory increase of other indol producing microorganisms.

Indol is a metabolite produced from L-tryptophan by commensal bacteria by tryptophanase enzymes, being conjugated in the liver with sulfate, becoming indoxyl sulfate or indican (ID) (Liabeuf *et al* 2011).

In a recent study, it was observed that high levels of urinary 3-indoxyl sulfate (3-IS) were associated with aged circulating neutrophils, fundamental to the pathogenesis of VOC in patients with SCD (Dutta, 2019b).

If we consider the chronic inflammatory state of patients with SCD and associate it with intestinal dysbiosis, it can be said that such conditions may contribute to the worsening of the general health of these patients. However, we must also take into consideration the profile of these possible pathobiotics in relation to their microbial resistance and the cellular interaction profile with the host.

We believe it is consistent that the identification of the main factors associated with MI imbalance may be related to the pathophysiology of PD and the investigation of the

present study using the intestinal dysbiosis ID marker in relevant patients with and without hydroxyurea.

METHODS

This is a cohort study that was conducted between January 2018 and March 2019. A total of 98 children and adolescents between 05 and 18 years were divided into three groups: G1 (n =38) SCD patients in use of hydroxyurea; G2 (n =28) SCD patients without hydroxyurea; G3 (n =31) patients without SCD. For the Indican test, Sigma-Aldrich MAK 128 kit was used on colorimetric test based on the Curzon and Walsh method in a spectrophotometer at 480 nm. All urine samples were obtained at steady state of the disease without VOC or hospitalizations. All subjects were compared for gastrointestinal and renal function and did not use antibiotics (except G1) and probiotics in the two weeks prior to the study. It was performed parasitological stool examination, anthropometric index assessment, Rome IV criteria, Bristol Stool Scale to assess functional constipation, and socioeconomic and demographic status analysis.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Sergipe/Brazil (n° 2.389.370). The Informed Consent Form was signed by the patient or legal guardian in the case of a under age.

Results

Table 1 describes some of the characteristics of the groups evaluated. There were no statistically significant differences between study groups for gender, age, ethnicity, type of delivery, breastfeeding period and nutritional status assessed by height / age.

However, the groups differed in relation to family income and higher frequency of overweight compared to the other groups. Group G1 had higher wage income (p 0.007) and group G3 had higher prevalence of overweight / obesity (p 0.002).

Table 1. Socioeconomic status, type of delivery and time of breastfeeding, assessment of nutritional status according to the groups studied.

	G1		G2		G3		Total		p Value
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sex									
Female	20	53	16	55	16	52	52	53	0.960
Male	18	47	13	45	15	48	46	47	
Age									
< 10 anos	6	16	11	38	12	39	29	30	0.058
≥ 10 anos	32	84	18	62	19	61	69	70	
Ethnicity									
Skin Black people	8	21	9	31	6	19	23	23	0.512
Skin Brown people	30	79	20	69	25	81	75	77	
Monthly household income									
<1 minimum wage	2	5	7	24	11	36	20	20	0.007
≥ 1 minimum wage	36	95	22	76	20	64	78	80	
Type of delivery									
Cesarean	9	24	6	21	5	16	20	20	0.740
Normal birth	29	76	23	79	26	84	78	80	
Time of breastfeeding									
<12 meses	24	65	13	46	12	39	49	51	0.084
≥ 12 meses	13	35	15	54	19	61	47	49	
Height/age									
Adequate	31	82	24	83	30	97	85	87	0.136
Low	7	18	5	17	1	3	13	13	
BMI/age									
Low weight	3	8	-	-	1	3	4	4	0.002
Eutrophy	32	84	28	97	19	61	79	81	
Overweight/obesity	3	8	1	3	11	36	15	15	

P-values by Qui-Quadrado Test

n: number of individuals examined. G1: hydroxyurea group. G2: hydroxyurea-free group. G3: group control

Regarding the presence of parasitosis, group G2 presented higher frequency in relation to the other groups (p 0.017). Whereas there were no significant differences in Bristol stool scale and number of Rome IV criteria. (Table 2).

Table 2. Intestinal parasitosis, Bristol stool scale and functional constipation of the studied groups.

	G1		G2		G3		Total		p Value
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Parasitosis *									
Negative	17	71	6	35	17	77	40	64	0.017
Positive	7	29	11	65	5	23	23	36	
Bristol scale									
Type 1 e 2	7	18	7	24	3	10	17	17	0.327
Typoe3,4,5,7	31	82	22	76	28	90	81	83	
Nº Rome IV criteria									
≥ 2	9	24	6	21	8	26	23	24	0.896
< 2	29	76	23	79	23	74	75	76	

P-values Qui-Quadrado test.*n=63 n: number of individuals examined. G1: hydroxyurea group. G2: hydroxyurea-free group. G3: group control.

Regarding the anthropometric indices of the participants, it was observed that in the G3 group, the height-for-age (E / A) and BMI / I indices were significantly higher compared to the groups with SCD (G1 and G2) (Table 3).

Table 3. Nutritional status of the children and adolescents under study.

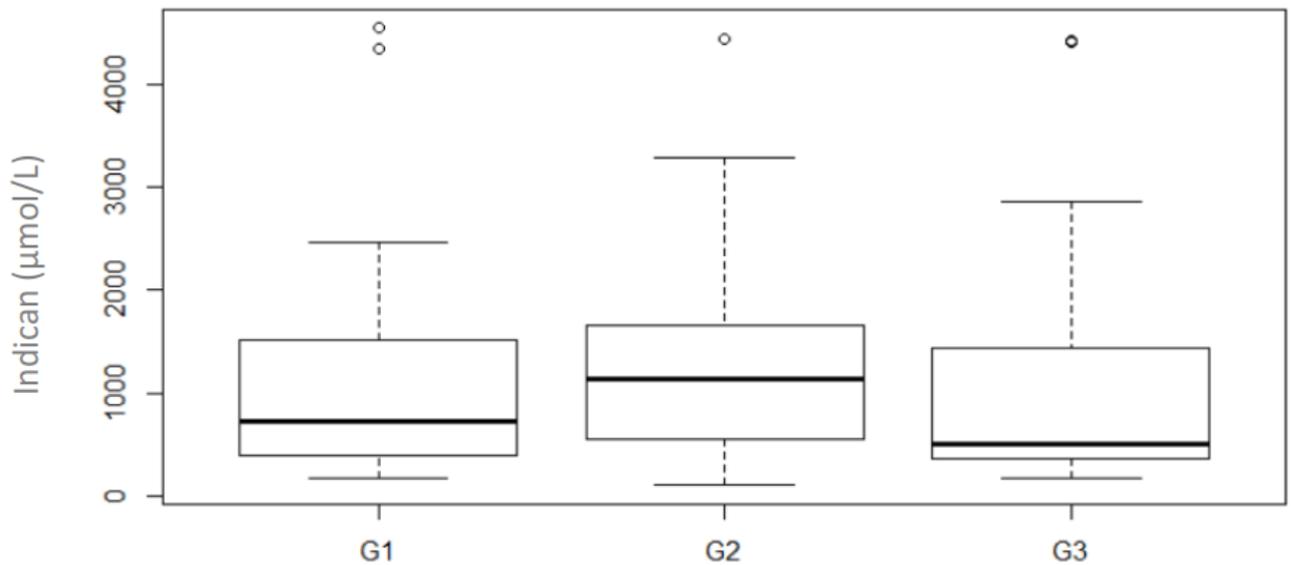
	Mean	DP	P25	P50	P75	p Value
height/age (escore z)						
G1	-0.91	1.43	-1.44	-0.81	-0,18	<0.001
G2	-1.16	1.04	-1,72	-0.93	-0,63	
G3	0.86	1.37	-0,17	1.03	1,86	
BMI/age (escore z)						
G1	-0.35	1.08	-1,10	-0.21	0,45	0.002
G2	-0.46	0.96	-1.40	-0.41	0,18	
G3	0.53	1.30	-0,42	0.63	1,45	

P-values; p: percentil

n: number of individuals examined. G1: SCD hydroxyurea group. G2: SCD hydroxyurea-free group. G3: group control.

Regarding the colorimetric test to evaluate DI (Indican), DI values > 400 µmol / L were considered (Figure 1).

Mean ± standard deviations above 1.070 ± 1016.40 considering intestinal dysbiosis were observed, however the differences were not significant between the groups evaluated (p 0.533) (Table 4).

Figure 1. Indican dosage in the urine of the studied groups

G1: SCD hydroxyurea group. G2: SCD hydroxyurea-free group. G3: group control.

Table 4. Evaluation of Indican dosages between the evaluated groups.

	Mean	DP	P50	P25	P75	<i>p</i> Value
Indican (mg/L)						
G1	268,95	255,37	182,30	97,23	379,51	0.554
G2	321,72	293,10	189,79	106,92	451,92	
G3	266,69	292,60	126,40	82,61	368,72	
Indican (µmol/L)						
G1	1.070,43	1.016,40	725,57	386,95	1.510,45	0.533
G2	1.310,92	1.180,01	819,41	406,28	1.938,97	
G3	1.061,41	1.164,57	503,09	328,80	1.467,50	

Test Kruskal Wallis. P=percentil

G1: SCD hydroxyurea group. G2: SCD hydroxyurea-free group. G3: group control.

In the statistical analysis using the controlled multivariate model, it was observed that ID concentrations, as a dependent variable, were not different between the case groups and the control group. In the adjusted model, regardless of the disease, children and adolescents born in normal delivery had lower concentrations of ID, and those breastfed over 12 months of age, with fecal type 1 and 2 characteristic of constipation, had higher concentrations ID (95% CI -1.33 to -0.41; 0.51 to 1.24; 0.02 to 1.05 respectively) (Table 5).

Table 5. Generalized, univariate linear model controlled and adjusted between Indican levels and associated factors.

	B_R (IC95%)	B_C (IC95%)	B_A (IC95%)	p Value
Group				
G1	-0,07 (-0,57;0,42)	0,60 (0,03;1,18)		
G2	0,33 (-0,22;0,89)	0,50 (-0,19;1,18)		
G3	1	1		
Sex				
Female	0,38 (-0,05;0,81)	0,21 (-0,17;0,59)		
Male	1	1		
Type of delivery				
Cesarean	1	1	1	
Normal birth	-0,96 (-1,48;-0,43)	-0,98(-1,44;-0,51)	-0,87 (-1,33;-0,41)	<0,001
Breastfeeding period				
≤ 12 meses	1	1	1	
>12 meses	0,77 (1,17;0,38)	0,97 (0,59;1,35)	0,87 (0,51;1,24)	<0,001
Monthly household income				
<1 salário-mínimo	0,34 (-0,17;0,85)	0,46 (0,01;0,91)		
≥ 1 salário-mínimo	1	1		
Bristol stool scale				
Tipo 1, 2	0,30 (-0,31;0,90)	0,42 (-0,12;0,97)	0,53 (0,02;1,05)	0,043
Tipo 3, 4,5,7	1	1	1	
Nº Rome IV criteria				
<2	-0,16 (-0,70;0,38)	-0,20 (-0,71;0,32)		
≥2	1	1		
Parasitosis				
Positive	0,42 (-0,02;0,87)	0,10 (-0,34;0,54)		
Negative	1	1		
Age	-0,03 (-0,09;0,03)	-0,03 (-0,09;-0,02)		
height/age (escore z)	0,01 (-0,14;0,16)	0,01 (-0,15;0,17)		
height/age (escore z)	-0,12 (-0,31;0,07)	0,06 (-0,14;0,26)		

B_R – Estimated parameter in the univariate regression model Log-Gamma. B_C – Estimated parameter in the controlled regression model Log-Gamma. B_A – Estimated parameter in the regression adjusted model Log-Gamma. CI95% – 95% confidence interval.

DISCUSSION

The present study revealed the presence of high urinary ID concentrations, characterizing intestinal dysbiosis in children and adolescents with SCD, being 74% in G1, 76% in G2 and 65% in G3, however, no significant difference was observed between the groups. Dutta et al (2019b) reported for the first time increased urinary levels of urinary 3-indoxyl sulfate (3-IS) in adults with SCD compared to the control group without SCD. High levels of 3-IS were correlated with intestinal *Clostridium* amount due to bacterial overgrowth

linked to 3-IS and increased aged neutrophils that are critical in initiating and propagating CVOs. The results of the present study suggest similar intestinal dysbiosis in children and adolescents with SCD and those without SCD.

In the present study, variables such as type of delivery, time of breastfeeding and presence of constipation significantly influenced the variation of ID concentration. Children and adolescents born in normal delivery (80%) had lower ID concentrations (95% CI -1.33 to -0.41). During normal birth, contact with the mother's vaginal and intestinal flora is the most important source for infant microbial colonization, favoring the colonization of protective bacteria such as *Lactobacilli*, *Prevotella* and *Bifidobacteria* (DOMINGUEZ-BELLO; COSTELLO; CONTRER et al., 2010).

Stinson et al (2018), observed a transient difference in the intestinal microbiota of babies born by cesarean section compared to babies born in normal delivery. Modification of microbial communities can lead to a state of ID, increasing the chance of a variety of immune, inflammatory and metabolic disorders arising. This may support the increased incidence of asthma, allergies, obesity, type 1 diabetes mellitus, inflammatory bowel disease and autoimmune diseases in babies born by cesarean section.

We considered the high rate of normal delivery between groups as significant, suggesting a positive protective factor for intestinal microbiota, especially for groups with SCD, as these patients are more susceptible to certain bacterial infections especially in the first five years of life.

Breastfeeding greater than 12 months of age (49%) was found to be associated with a higher ID concentration (95% CI 0.51 to 1.24). Contrary to the results presented, it is known that breastfed infants have a rich intestinal microbiota in *Lactobacilli*, *Staphylococcus* and *Bifidobacterium*, whereas in infants fed breastfeeding with infant formula is more complex and similar to that of an adult, with increased counts of *Roseburia*, *Clostridium* and *Anaerostipes*, as well as larger amounts of inflammation-associated microorganisms (BACKHED; ROSWALL; PENG et al, 2015; O'SULLIVAN; FARVER; SMILOWITZ). In addition, some studies have found that 27% of a child's intestinal microbiota is derived vertically from the mother's breast milk, while 10% comes from the skin around the areola. (PANNARAJ; LI; CERINI et al, 2017). The divergent results presented provide justification for the variability of the individual microbiome of nursing mothers and infants to be taken into account, as well as the temporal changes of each individual. Some variables, such as home environment, hygiene habits, presence of pets, antibiotic use, mother's nutritional status, maternal/ infant diet, among other exposure factors (STINSON; PAYNE; KEELAN et al,

2018), need to be evaluated to demonstrate possible changes in maternal microbiota / pediatric associated with intestinal dysbiosis during breastfeeding.

Higher concentrations of ID (95% CI 0.02 to 1.05) were also associated with the type of stool 1 and 2 characteristic of functional constipation in 24% of the groups according to Rome IV criteria. Extended bowel time in individuals with functional constipation may lead to ID, which may affect intestinal immune function, motility, and intestinal barrier function (ZHU; LIU; ALKHOURI et al 2014), with a relative reduction of protective bacteria, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Bacteroides* spp. and a parallel increase in potentially pathogenic microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Campylobacter jejuni*. (GERRITSEN; SMIDT; RIJKERS et al 2011; ZHU; LIU; ALKHOURI et al 2014). Constipation is a predominant functional gastrointestinal disorder accompanied by intestinal dysbiosis, however, the causal relationship between intestinal dysbiosis and constipation remains poorly understood (CAO; LIU; AN et al 2017). Factors such as higher cesarean delivery rates, shorter breastfeeding time, ultra-processed foods and a positive family history of constipation were observed in constipated children associated with intestinal dysbiosis (MORAES; MOTTA; BELTRÃO et al, 2016).

Although we have not found in the literature explanations for the causal relationship between functional constipation and Increased Urinary ID concentrations, we believe that slow colonic transit associated with increased pathogenic microorganisms may alter uro-fecal pH to alkaline values, allowing for greater bacterial and pathogenic growth associated with intestinal dysbiosis (GIBSON; ROBERFROID, 1995; LAURINO; PALMIERI; ESPOSITO et al, 2016).

Study Limitations

A limitation of the present study was the lack of assessment of food intake, especially protein intake. However, studies indicate that different dietary protein concentrations do not alter the urinary concentrations of ID (CASSANI et al, 2015; BRITO et al, 2016). Another limitation was the lack of a predictive value for the ID test and the use of this tool to assess intestinal dysbiosis in children and adolescents, which limited the study power. More studies are suggested to use and evaluate this tool in this population.

Conclusion

High urinary ID concentrations were observed in patients with SCD, as well as in the control group, indicating intestinal dysbiosis, with no significant difference. Variables such as type of delivery, time of breastfeeding and functional constipation were influenced by ID concentrations, regardless of the presence of the disease between the groups.

Relevant Considerations

This is one of the first studies to assess the presence of intestinal dysbiosis in children and adolescents with SCD by analyzing urinary indoxyl sulfate concentrations, which is an indirect analysis of the intestinal microbiota. It was not possible to conclude if the diagnosis of dysbiosis in this population is a pathological or physiological factor through the method used. Further studies to assess the outcome of intestinal dysbiosis in children and adolescents are needed for comparative purposes using urinary indoxyl sulfate.

References

1. Ware, R. E., Montalembert, M., Tshilolo, L., Abboud, M. R. Sickle cell disease. *Lancet*. 2017 Jul 15;390(10091):311-323.
2. Bunn, HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 337: 762–769, 1997.
3. Brittenham, G.M., Schechter, A.N., Noguchi, C.T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood*. 1985. January;65(1):183-189.
4. STUART, M.J., NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004; 364(9442):1343-60.
5. Lim, S.H., Morris, A., Li, K, et al. Intestinal microbiome analysis revealed dysbiosis in sickle cell disease. *Am J Hematol*. (2018b);93:E91–E93.
6. Karim, A., Ahmed, S., Rossoff, L.J., Siddiqui, R.; Fuchs, A., Multz, A.S. Fulminant ischaemic colitis with atypical clinical features complicating sickle cell disease. *Postgrad Med J*. 2002;78:370–372.
7. Lim, S.H., Methé, B.A., Knoll, B.M., Morris, A., Obaro, S.K. Invasive non-typhoidal *Salmonella* in sickle cell disease in Africa: is increased gut permeability the missing link? *J Transl Med* (2018a) 16:239.
8. Dutta, D., Methe, B., Amar, S., Morris, A., Lim, S.H. Intestinal injury and gut permeability in sickle cell disease. *J Transl Med*. (2019b); 17: 183. Published online 2019 May 30.

9. Liabeuf, S., Drüeke, T.B., Massy, Z a. Protein-bound uremic toxins: New insight from clinical studies. *Toxins (Basel)*. 2011;3:911–9.

Dominguez-bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107:11971–11975.

10. Dutta, D., Methe, B., Morris, A., Lim, SH. Elevated urinary 3-indoxyl sulfate in sickle cell disease. *Am J Hematol*. (2019a) Jun;94(6):E162-E164.

11. Stinson, I.f., Payne, M.S., Keelan, J.A. A Critical Review of the Bacterial Baptism Hypothesis and the impact of Cesarean Delivery on the infant Microbiome. *Front. Med.*, 04 May 2018.

12. Backhed, F., Roswall, J., Peng, Y *et al*. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*, 17 (2015), p. 852.

13. O'Sullivan, A., Farver, M., Smilowitz, J.T. The influence of early infant-feeding practices on the intestinal microbiome and body composition in infants. *Nutr Metab Insights*, 8 (2015), pp. 1-9.

14. Pannaraj, P.S., Li, F., Cerini, C., Bender, J.M., Yang, S., Rollie, A *et al*. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatr* (2017).

15. Zhu, L., Liu, W., Alkhoury, R., Baker, R.D., Bard, J.E., Quigley, E.M *et al*. Structural changes in the gut microbiome of constipated patients. *Physiol Genomics* 46, 679–686 (2014).

16. Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G.T., de Vos, W.M. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr*. 2011;6(3):209–240.

17. Cao, H., Liu, X., An, Y., Zhou, G., Liu, Y., Xu, M., Dong, W., Wang, S.; Yan, F., Jiang, K., Wang, B. Dysbiosis contributes to chronic constipation development via regulation of serotonin transporter in the intestine. *Sci Rep*. 2017 Sep 4;7(1):10322.

18. Moraes, J.G., Motta, M.E.F.A., Beltrão, M.F.S., Salviano, T.L.; Silva, G.A.P. Fecal Microbiota and Diet of Children with Chronic Constipation. *Int J Pediatr*. 2016; 2016: 6787269.

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

20. Curzon, G., Walsh, J. (1962) A method for the determination of urinary indoxyl sulphate (indican). *Clinica Chimica Acta*, 7, 657.

ANEXO B. Comprovante de submissão do artigo na revista British Journal of Hematology

12/08/2019 ScholarOne Manuscripts

 British Journal of Haematology

 Home

 Author

 Review

Submission Confirmation Print

Thank you for your submission

Submitted to
British Journal of Haematology

Manuscript ID
BJH-2019-01517

Title
Elevated urinary indoxyl sulfate (indican) in children and adolescents with sickle cell disease indicative of intestinal dysbiosis?

Authors
ZUIN, BEATRIZ
Gurgel, Ricardo
Magalhaes, Lucas
Botelho, Anne
Silva, Danielle
Oliveira, Ana Carolina
BARRETO, IKARO DANIEL
Rosana, Cipolotti

Date Submitted
12-Aug-2019

[Author Dashboard](#)

<https://mc.manuscriptcentral.com/bjh> 1/2

ANEXO C. Critérios de Roma IV

Dois dentre os critérios abaixo, presentes uma vez por semana no mês anterior ao diagnóstico, em crianças que não preencham os critérios diagnósticos para síndrome do intestino irritável e na ausência de patologia orgânica:

- Duas ou menos evacuações no toalete por semana, em crianças com desenvolvimento igual ou maior ao esperado para quatro anos de idade
- Pelo menos um episódio de incontinência fecal por semana
- Retenção fecal
- Dor ao evacuar ou fezes endurecidas
- Presença de massa fecal palpável no reto
- Relato de fezes de grosso calibre capazes de entupir vaso sanitário

Anexo D. Escala de Bristol

<p>TIPO 1 Caroços duros separados, como nozes.</p> 	<p>1 – Pedacos separados, duros como amendoim</p>
<p>TIPO 2 Na forma de salsicha mas com caroços.</p> 	<p>2 – Forma de salsicha, mas segmentada</p>
<p>TIPO 3 Na forma de salsicha ou cobra mas com rachas na superfície.</p> 	<p>3 - Forma de salsicha, mas com fendas na superfície</p>
<p>TIPO 4 Como uma salsicha ou cobra, regular e macio.</p> 	<p>4 – Forma de salsicha ou cobra, lisa e mole</p>
<p>TIPO 5 Caroços macios com cantos bem demarcados.</p> 	<p>5 – Pedacos moles, mas com contorno nítidos</p>
<p>TIPO 6 Caroços macios com cantos rasgados.</p> 	<p>6 – Pedacos aerados, contornos esgarçados</p>
<p>TIPO 7 Totalmente líquido.</p> 	<p>7 – Aquosa, sem peças sólidas</p>

ANEXO E - Autorização de coleta na EMEF Florentino Menezes.

ESTADO DE SERGIPE
PREFEITURA MUNICIPAL DE ARACAJU
SECRETARIA MUNICIPAL DE EDUCAÇÃO
DEPARTAMENTO DA EDUCAÇÃO BÁSICA – DEB

Memorando nº 102/2018.
Ref. PMA/SEMED/DEB.

Aracaju, 21 de setembro de 2018.

Ilma Sra.
GEANE DOS SANTOS
Diretora Geral da EMEF Professor Florentino Menezes

Senhora Diretora,

Estamos pelo presente autorizando a mestrandia em Ciências da Saúde **Beatriz Zuin**, do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe, a realizar pesquisa intitulada “ Disbiose intestinal em portadores de doença falciforme”, na instituição de ensino EMEF Professor Florentino Menezes.

Informamos que a mestrandia **Beatriz Zuin**, representada através de assinatura em Termo de Compromisso, está se comprometendo junto a esta Secretaria a apresentar cópia do Relatório.

Atenciosamente,

PROF. MSC. MANUEL ALVES DO PRADO NETO

Diretor do Departamento da Educação Básica/SEMED

Prof. Msc. Manuel Prado
Diretor do Departamento da
Educação Básica
D-DEB/SEMED

Av. Pedro Paes de Azevedo, nº 761 – Grageru – CEP: 49025-120 - Aracaju / SE
Fone: (79) 3179 – 1506 – e-mail: educação@aracaju.gov.br