

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MOUSELINE TORQUATO DOMINGOS

**A CONDUTIVIDADE COMO DIAGNÓSTICO CONFIRMATÓRIO NA TRIAGEM
NEONATAL DA FIBROSE CÍSTICA NO PARANÁ**

CURITIBA

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MOUSELINE TORQUATO DOMINGOS

**A CONDUTIVIDADE COMO DIAGNÓSTICO CONFIRMATÓRIO NA TRIAGEM
NEONATAL DA FIBROSE CÍSTICA NO PARANÁ**

CURITIBA

2011

MOUSELINE TORQUATO DOMINGOS

**A CONDUTIVIDADE COMO DIAGNÓSTICO CONFIRMATÓRIO NA TRIAGEM
NEONATAL DA FIBROSE CÍSTICA NO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Neiva Isabel Rodrigues
Magdalena

Co-Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho

CURITIBA

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB9/991 COM OS DADOS FORNECIDOS PELA AUTORA

D671 Domingos, Mouseline Torquato

A condutividade como diagnóstico confirmatório na triagem neonatal da fibrose cística no Paraná / Mouseline Torquato Domingos. – Curitiba, 2011.

198 f. : il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Neiva Isabel Rodrigues Magdalena

Coorientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Fibrose cística. 2. Triagem neonatal. 3. Teste do suor.

I. Magdalena, Neiva Isabel Rodrigues. II. Rosário Filho, Nelson Augusto
III. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente.
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WI 820

Parecer

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - MESTRADO E DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**, do Setor de Ciências Saúde, da Universidade Federal do Paraná, após argüir a Mestranda

Mouseline Torquato Domingues

em relação ao seu trabalho de Dissertação intitulada

“O Feste do Suor no Diagnóstico Confirmatório na Triagem Neonatal da Fibrose Cística no Paraná”

é de parecer favorável à *Aprovação* da aluna, habilitando-a ao título de *Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente*,

área de concentração em

Hemato-Oncologia e Genética Pediátrica.

Curitiba, 18 de outubro de 2011

Magda
Professora Neiva Isabel Rodrigues Magdalena
UFPR, Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Rui
Professor Rui Fernando Pilotta
UFPR, Primeiro Examinador

Carlos
Professor Carlos Antonio Riedi
UFPR, Segundo Examinador

Rosana
Professora Rosana Marques Pereira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
Mestrado e Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Dezolina pelo exemplo de vida e honestidade; irmãos Maristella, Margareth e Miguel.

AGRADECIMENTOS

A elaboração desta dissertação não seria possível sem o apoio, a colaboração e o incentivo de diversas pessoas e algumas instituições. Meus agradecimentos à:

À Prof. Dra. Neiva Isabel Rodrigues Magdalena, orientadora desta dissertação, a quem devo, primordialmente, a conclusão deste trabalho. Seu apoio e incentivo foram fundamentais. Que na sua grandiosidade de mestre e educadora, continue sempre os seus ensinamentos, com este espírito humano, amigo e sincero. O meu sincero obrigado.

Ao Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho, pela co-orientação, agradeço sua gentileza e compreensão durante este estudo. Sou reconhecedora e admiradora de seu vasto conhecimento na área.

Aos professores, médicos, enfermeiros, médicos residentes, mestrandos, doutorandos e funcionários do Departamento de Pediatria da UFPR, pela contribuição na formação profissional.

À equipe, colegas da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional pelo companheirismo e a feliz oportunidade de trabalharmos juntos.

Em especial aos meus colegas do laboratório, bioquímicas Maria Aparecida Veiga Ribas, Alexandra Mitiru Watanabe, Maria Marta Jucksch, Regina Tokunaga, as técnicas Márcia, Marilza, Rita, Nair, Daiane Carla, Maria Luiza e à secretária Cirlene Mesquita pelo carinho e auxílio constante.

Ao analista de sistemas Adinã Vale da Rocha pelo fornecimento dos dados e pela amizade.

Ao operador de Microcomputadores Osny Osires Cardoso pelo auxílio e apoio fundamental durante a coleta de dados.

Às assistentes sociais da FEPE e equipe, Adriane, Cleusa, Marlene, Simone, Ivonete, Pâmela pelo brilhante trabalho que fazem na busca ativa das crianças e apoio familiar.

À equipe de enfermagem do SRTN da FEPE pela orientação constante no aprimoramento da coleta de sangue dos recém-nascidos.

À equipe médica do ambulatório de Pneumologia do Hospital de Clínicas, pelo cuidado com os pacientes.

Ao Sr. José Alcides Marton da Silva, digníssimo presidente da FEPE, pelo incentivo, apoio e pela oportunidade da realização deste estudo.

Ao Dr. Ehrenfried Wittig, pelo incentivo, carinho e apoio constante na conclusão desse trabalho. Com todo meu respeito e admiração agradeço a oportunidade de trabalharmos juntos.

À Prof^a. Dr^a. Mônica Nunes Lima, no auxílio, análise estatística e pelo apoio fundamental durante este trabalho.

Ao Dr. Salmo Raskin e a equipe do laboratório GENETIKA pela pesquisa da mutação $\Delta F508$ nas amostras de crianças portadoras de fibrose cística diagnosticadas na FEPE.

Às crianças com FC e seus familiares.

A todos meus verdadeiros amigos, que souberam compreender minha ausência em muitas ocasiões, incentivaram e colaboraram direta ou indiretamente

na elaboração deste trabalho. Saibam que a amizade não tem preço e que vocês são muito especiais na minha vida.

Aos meus irmãos queridos, cunhados e sobrinhos, que sempre estiveram presentes, que me incentivaram e acompanharam durante todo o período de realização deste trabalho e em todos os outros momentos da minha vida.

Em especial à minha mãe, falecida durante o desenvolvimento deste trabalho, eu dedico todo o meu esforço, toda dedicação, pelo incentivo constante em vida, pelo exemplo de caráter, dignidade e força. Sem ela eu jamais teria alcançado este feito.

A Deus, que guia todos os meus dias, minhas palavras e minha vida.

A todos, meu sincero agradecimento.

RESUMO

Introdução: A triagem neonatal da fibrose cística (FC) foi introduzida no Brasil em 2001 por meio de um decreto ministerial que estabelece, no Paraná, a acreditação do primeiro programa na Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE). O protocolo utilizado na FEPE é o da determinação em dois estágios da tripsina imunorreativa (IRT) antes da idade de 30 dias do recém nascido (RN). O método utilizado é imunofluorimétrico (Auto Delfia da *PerkinElmer*®). A monitoração do método é realizada por meio do controle de qualidade dos *Kits* e internacional (IRTIQAS – França e CDC Atlanta - USA). O valor de corte utilizado nos dois estágios é de 70 ng/ml (ug/l). Um resultado positivo na primeira amostra coletada do RN (1º estágio) necessita confirmação em uma segunda coleta para determinação da IRT (2º estágio). Quando o resultado é confirmado positivo, a criança é submetida ao teste do suor pela determinação da condutividade (*WESCOR*®) seguida da dosagem quantitativa do Cloreto (Cl⁻) por titulação coulométrica (Cloridrômetro/LABCONCO) como diagnóstico confirmatório da doença. O valor de corte utilizado no primeiro método é de 50 mmol/l e no segundo método 60 mmol/l de cloreto no suor. Os casos confirmados positivos são encaminhados para pesquisa da mutação $\Delta F508$ e seguimento clínico. **Objetivos:** Os objetivos desta pesquisa foram: comparar os resultados obtidos nas duas técnicas utilizadas no teste do suor, o método da Condutividade e o método Coulométrico quantitativo; comparar os resultados da IRT inicial e de repetição; correlacionar o peso da criança com volume de suor obtido, condutividade e concentração de cloreto no suor. **Material e Métodos:** No período de janeiro de 2002 a dezembro de 2008 foram avaliadas 1.218.642 crianças provenientes do programa de triagem neonatal do Paraná. Destas, 13.235 (1,08%) tiveram um resultado positivo no primeiro estágio. Das 13.235 crianças 2309 (17,44%) tiveram um resultado de IRT positivo no segundo estágio. Todas foram submetidas ao teste do suor para confirmação diagnóstica laboratorial da FC. Dos 2309 RN foi selecionado por conveniência 444 RN com resultado normal no teste do suor e 90 com diagnóstico confirmado de FC. Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo, de coorte da avaliação da triagem neonatal para Fibrose Cística. Os dados foram digitados em planilha eletrônica (*Microsoft Excel*®), conferidos e exportados para posterior análise estatística (*Statistica - Statsoft*®). A estimativa da diferença entre médias, para variáveis de distribuição contínua e grupos independentes foi realizada pelo teste t de *Student* e Análise da Variância (Anova). A estimativa da diferença entre frequências foi realizada pelo teste qui-quadrado de Pearson. Para estimar a probabilidade de volume de suor de acordo com o peso de nascimento foi utilizada a Regressão Logística Univariada. O coeficiente de correlação de Person foi calculado para estimar as possíveis correlações entre os métodos quantitativo coulométrico e a condutividade. O coeficiente de Kappa foi calculado para estimar a concordância

entre os métodos. A curva Roc (*Receiver Operation Curve*) foi utilizada para estimar o ponto de corte e índices de sensibilidade e especificidade do teste de condutividade, considerando o método coulométrico como o padrão-ouro.

Resultados: Dos 444 RN, cento e oitenta e cinco (41,6%) eram do sexo masculino, 234 (52,7%) do sexo feminino e 25 (5,6%) sem informação disponível quanto ao gênero, sendo 400 da cor branca (94,6%). A média de peso de nascimento foi de $3228,8 \pm 2352,8$ g (IC de 95% = 3002,4 – 3455,4g), com mediana de 3110g, variando de 775,0 a 3601,0g. Dos 90 RN com FC, 46 (51,1%) eram do sexo masculino e 44 (48,9%) do sexo feminino, 86 (95,5%) da cor branca, 04 (4,5%) de cor parda com média de peso ao nascimento de $3091,2 \pm 477,9$ g, variando de 2000,0 a 3997,0g. Os dados peso e cor foram extraídos da ficha de coleta dos RN os quais são preenchidos na alta hospitalar. A idade em mediana na triagem neonatal foi de 3 dias, e na data da consulta médica de 29,5 dias. O volume de suor, condutividade e a concentração de cloreto no suor foi significativamente maior em crianças de maior peso ($p = 0,001$). A presença da mutação $\Delta F508$ confere resultados de condutividade e concentração de cloreto significativamente mais altos do que os obtidos em pacientes sem a presença desta mutação ($p = 0,001$). Não houve diferença significativa entre os níveis de IRT inicial e o da segunda coleta nos recém nascidos independente da presença da mutação $\Delta F508$. Observou-se forte correlação entre o método da condutividade e o método quantitativo para determinação de cloreto no suor ($r = 0,97$; Coeficiente de Kappa = 0,89; $p < 0,001$). O teste de condutividade apresentou uma sensibilidade de 100,0%, especificidade de 96,2%, valor preditivo positivo de 83,3%, valor preditivo negativo de 100,0%, acurácia de 96,8%, índice de falso positivo de 16,7% e de falso negativo nulo. O valor de corte sugerido neste estudo foi de 69,0 mmol/l no teste de condutividade (Curva Roc), considerado confirmativo da doença. Os valores de condutividade na faixa de 60 a 69 mmol/l foram sugeridos como os limites do intervalo de equívocos.

Conclusão: Este estudo, realizado com um grande número de sujeitos sugere que a condutividade pode ser tão viável como a análise quantitativa de cloro no suor para diagnosticar ou excluir a FC e, portanto, o seu potencial como ferramenta definitiva de diagnóstico para a FC deve ser considerado.

Palavras-Chave: Fibrose Cística; Triagem Neonatal; Teste do Suor.

ABSTRACT

Introduction: The neonatal screening of cystic fibrosis (CF) was introduced in Brazil in 2001 through a Ministerial decree establishing, in Parana, the accreditation of the first program in the Ecumenical Foundation for The Protection of the Handicapped (FEPE). The protocol used in the determination is the two-stage immunoreactive trypsin (IRT) before the age of 30 days of the newborn (NB). The method used is immunofluorometric (Delfia Auto PerkinElmer ®). The monitoring method is performed by means of quality control and international Kits (IRTIQAS - France and CDC Atlanta - USA). The cutoff value used in the two stages is 70 ng / ml (ug / l). A positive result in the first sample collected from NB (1st stage) leads to confirmation of the IRT elevated in a second sample (2nd stage). When the result is confirmed positive, the child is subjected to the sweat test for determining the conductivity (Wescor ®) followed by quantitative measurement of chloride (Cl-) by coulometric titration (Cloridrômetro / Labconco) and confirmatory diagnosis of the disease. The cutoff value used in the first method is 50 mmol / l and in the second method is 60 mmol / l of chloride in sweat. Confirmed cases are referred to research of the $\Delta F508$ mutation and clinical outcome. **Objectives:** The objectives were: to compare the results of the two techniques used in the sweat test, the method of conductivity and coulometric quantitative method; to compare the results of initial and repeat IRT; correlated the child's weight with the volume of sweat obtained, conductivity and concentration of chloride in sweat. **Sample:** From January 2002 to December 2008, 1.218.642 children were evaluated from the neonatal screening program of Parana. Of these, 13.235 (1.08%) had a positive result in the first stage. Of the 13.235 children 2309 (17.44%) had a positive IRT of the second stage. All were submitted to the sweat test to confirm the diagnosis of CF. Of the 2309 infants was selected for convenience 444 with normal results in the sweat test and 90 with confirmed diagnosis of CF. This is an observational, retrospective cohort evaluation of neonatal screening for CF. Data were entered in a spreadsheet (Microsoft Excel ®), checked and exported for statistical analysis (Statistica - Statsoft ®). The estimate of the difference between means for continuous variables distribution and independent groups was performed by Student's t test and Analysis of Variance (ANOVA). The estimate of the difference between frequencies was performed using the chi-square test. To estimate the probability of sweat volume according to birth weight was used univariate logistic regression. The Person correlation coefficient was calculated to estimate the possible correlations between the quantitative coulometric methods and conductivity. The Kappa coefficient was calculated to estimate the correlation between the methods. The ROC (Receiver Operation Curve) was used to estimate the cutoff, sensitivity and the specificity of the conductivity test, considering the coulometric method as the gold standard. **Sample:** Of the 444 infants, one hundred and eighty-five (41.6%) were male, 234 (52.7%) female and 25 (5.6%) no information

available regarding gender, being 400 of white (94.6%). The average birth weight was 3228.8 ± 2352.8 g (95% CI = 3002.4 to 3455.4 g), with a median of 3110g, ranging from 775.0 to 3601.0 g. Of the 90 infants with CF, 46 (51.1%) were male and 44 (48.9%) female, 86 (95.5%) were Caucasian, 04 (4.5%) brown with the average birth weight of 3091.2 ± 477.9 g, ranging from 2000.0 to 3997.0 g. The weight and color data were taken from the collection form of NB which are filled at hospital discharge. The median age in neonatal screening was 3 days, and the date of follow up 29.5 days. The sweat volume, conductivity and chloride concentration in sweat was significantly higher in children of higher weight ($p = 0.001$). The presence of the $\Delta F508$ mutation gives results of conductivity and chloride concentration significantly higher than those obtained in patients without the presence of this mutation ($p = 0.001$). There was no significant difference between the initial levels of IRT and the second collection in infants regardless of the presence of the $\Delta F508$ mutation. A strong correlation was found between conductivity and the coulometric quantitative method for determining chloride in sweat ($r = 0.97$, Kappa coefficient = 0.89, $p < 0.001$). The conductivity test showed a sensitivity of 100.0%, specificity 96.2%, positive predictive value of 83.3%, negative predictive value of 100.0%, 96.8% accuracy, false positive rate of 16.7% and false negative zero. The cutoff value suggested by this study was 69.0 mmol / l in the conductivity test (ROC curve) regarded as confirmatory of the disease. The conductivity values in the range 60 to 69 mmol / l have been suggested as the limits of the range of misconceptions.

Conclusion: In conclusion, this study, with a large number of subjects suggests that the conductivity can be as viable as a quantitative sweat chloride to diagnose or rule out CF and therefore its potential as a definitive diagnostic tool for CF should be considered.

Key-Words: Cystic Fibrosis; Neonatal Screening; Sweat Test.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NO SUOR RELACIONADA AO DIAGNÓSTICO DA FC.....	30
FIGURA 2 - GENE DA FC.....	32
FIGURA 3 - IDADE DE SOBREVIVÊNCIA NA FC (mediana).....	36
FIGURA 4 – FISIOPATOLOGIA DA FC.....	69
FIGURA 5 - CFTR – PROTEÍNA REGULADORA DA CONDUTÂNCIA IÔNICA TRANSMEMBRANA DA FIBROSE CÍSTICA	76
FIGURA 6 – EMBRIOLOGIA DA GLÂNDULA SUDORÍPARA	85
FIGURA 7 - MECANISMO DE TRANSPORTE IÔNICO NA GLÂNDULA SUDORÍPARA	87
FIGURA 8 - MODELO DE TRANSPORTE DE ELETRÓLITOS NO EPITÉLIO DAS VIAS RESPIRATÓRIAS	87
FIGURA 9 - MODELO DE TRANSMISSÃO DAS DOENÇAS DE HERANÇA AUTOSSÔMICA RECESSIVA.....	104
FIGURA 10 - DEMONSTRATIVO DE AMOSTRA COLETADA NA TRIAGEM NEONATAL.....	110
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DE TRIAGEM DA FIBROSE CÍSTICA NO SRTN	111
FIGURA 12 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ANÁLISE FLUORIMÉTRICA DE IRT	112
FIGURA 13 - PICOTADOR AUTOMÁTICO MULTIPUNCHER	114
FIGURA 14 - SISTEMA AUTODELFIA DE ANÁLISE.....	114
FIGURA 15 - INDUTOR DO SUOR	124
FIGURA 16 – ELETRODOS.....	125

FIGURA 17 - DISCOS DE PILOGEL	126
FIGURA 18 - ADAPTAÇÃO DOS ELETRODOS NO BRAÇO DO RN - PRODUÇÃO DE SUOR EFICAZ.....	126
FIGURA 19 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO ELETRODO - QUEIMADURAS DURANTE A IONTOFORESE	127
FIGURA 20 - RECOMENDAÇÕES PREVENTIVAS DE QUEIMADURAS.....	128
FIGURA 21 – MACRODUCT	129
FIGURA 22 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO CORANTE NO MACRODUCT.....	129
FIGURA 23 - REMOÇÃO E ARMAZENAMENTO DO SUOR COLETADO.....	130
FIGURA 24 - – EQUIPAMENTO LEITOR DA CONDUTIVIDADE “SWEAT CHECK”	131
FIGURA 25 - – – LEITURA DA CONDUTIVIDADE NO “SWEAT CHECK”	132
FIGURA 26 - – QUANTIDADE DE SUOR COLETADA NO MACRODUCTO”.....	132
FIGURA 27 - – DIGITAL CHLORIDOMETER – MODELO 442-5100 (115V/50HZ) LABCONCO CORPORATION”.....	135

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – MÉDIA, DP DOS VALORES DE IRT NO PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO EXAME	140
GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DO RESULTADO DO PRIMEIRO E O SEGUNDO EXAME	141
GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA IRT NA TRIAGEM INICIAL E NA RECOLETA	141
GRÁFICO 4 – MÉDIA, DP DOS VALORES DE IRT OBTIDOS EM TRÊS DETERMINAÇÕES DISTINTAS DE PACIENTES COM FC	143
GRÁFICO 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DE IRT DO PRIMEIRO E SEGUNDO EXAME EM PACIENTES COM FC	143
GRÁFICO 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DE IRT DO PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO EXAME EM PACIENTES COM FC	144
GRÁFICO 7 - DISTRIBUIÇÃO DA IDADE NO PRIMEIRO EXAME DE IRT	145
GRÁFICO 8 – DISTRIBUIÇÃO DA IDADE NO SEGUNDO EXAME DE IRT EM CRIANÇAS COM FC	145
GRÁFICO 9 – DISTRIBUIÇÃO DA IDADE NO TERCEIRO EXAME DE IRT EM CRIANÇAS COM FC	146
GRÁFICO 10 - VARIAÇÃO DO VOLUME DE SUOR DE ACORDO COM O PESO DA CRIANÇA .	147
GRÁFICO 11 - PROBABILIDADE DE VOLUME DE SUOR DE ACORDO COM O PESO DA CRIANÇA	147
GRÁFICO 12 - CORRELAÇÃO ENTRE O TESTE COULOMÉTRICO QUANTITATIVO E A CONDUTIVIDADE (PRIMEIRO EXAME)	149
GRÁFICO 13 - CORRELAÇÃO ENTRE O TESTE COULOMÉTRICO QUANTITATIVO E A CONDUTIVIDADE (SEGUNDO EXAME)	149
GRÁFICO 14 - CORRELAÇÃO ENTRE O MÉTODO QUANTITATIVO (PADRÃO-OURO) DE DOSAGEM DE CLORETO NO SUOR E O MÉTODO DA CONDUTIVIDADE NO SUOR	150
GRÁFICO 15 - CURVA ROC ENTRE O MÉTODO QUANTITATIVO (PADRÃO OURO) DE DOSAGEM DE CLORETO NO SUOR E O MÉTODO DA CONDUTIVIDADE NO SUOR	151

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - CURSO DA DOENÇA PULMONAR NA FC.....	44
QUADRO 2 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA FC	68
QUADRO 3 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS COMPATÍVEIS COM O DIAGNÓSTICO DA FC	79
QUADRO 4 - PRINCÍPIOS PARA DETECÇÃO PRECOCE DE DOENÇAS.....	101
QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO BÁSICA DO SUOR OBTIDO DE INDIVÍDUOS NORMAIS	164
TABELA 1 - MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES DA FC	71
TABELA 2 - FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES CFTR DETECTADAS EM INDIVÍDUOS AFETADOS, POR GRUPO CONTINENTAL E ESTADO DE NASCIMENTO.....	72
TABELA 3 - ASSOCIAÇÃO ENTRE MUTAÇÕES E AS ESPECIFICIDADES FENOTÍPICAS DA FC	92
TABELA 4 - PREVALÊNCIA DE PACIENTES COM FC NA POPULAÇÃO DOS PAÍSES DA UNIÃO EUROPÉIA	95
TABELA 5 - ESTIMATIVA E LIMITE DE CONFIANÇA DE 95% DA FREQUÊNCIA DE HOMOZIGOTOS E DE HETEROZIGOTOS PORTADORES DA FC EM EURO E AFRO-BRASILEIROS	96
TABELA 6 - VALORES DE IRT, MÉDIA, COEFICIENTE DE VARIAÇÃO, DP, VALOR MÍN. E MÁX., DE IRT OBTIDOS EM TRÊS COLETAS DISTINTAS DOS PACIENTES COM FC	142
TABELA 7 - DOSAGEM QUANTITATIVA DE CLORETO E DA CONDUTIVIDADE EM PACIENTES COM FC	148
TABELA 8 - DOSAGEM QUANTITATIVA DE CLORETO E DA CONDUTIVIDADE EM PACIENTES NÃO FC	150
TABELA 9 – CONCORDÂNCIA ENTRE O DIAGNÓSTICO PELA CONDUTIVIDADE E PELO TESTE QUANTITATIVO COULOMÉTRICO DE DOSAGEM DE CLORETO	151

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DOS RN COM SUSPEITA DE FC NA TRIAGEM NEONATAL
(NÃO CONFIRMADOS PELO TESTE DO SUOR) POR FAIXA DE PESO..... 152

TABELA 11 - CASOS DE FC DE ACORDO COM A PRESENÇA DA MUTAÇÃO $\Delta F508$ 154

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP	-	Academia Americana de Pediatria
ACMG	-	Colégio Americano de Genética Médica
ALT	-	Alanina aminotransferase (antigamente chamada de - TGO - transaminase glutâmica oxalacética
AP	-	Fosfatase alcalina
AST	-	Aspartato aminotransferase
Ca ₂ ⁺	-	Íon Cálcio
cAMP	-	AMP cíclico
CDC	-	<i>Center for Disease Control nos EUA</i>
CFGAC	-	<i>Genetic Analysis Consortium</i>
CFRDM	-	<i>Diabetes Mellitus Relacionada à FC</i>
CFTR	-	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator,</i> Regulador Transmembrana da Fibrose Cística
Cl	-	Cloreto (Referindo-se aos íons Cloreto)
Cl ⁻	-	Íon Cloreto
Cl1	-	Dosagem Quantitativa de Cloreto (Coulométrica) no primeiro exame
Cl 2	-	Dosagem Quantitativa de Cloreto (Coulométrica) no segundo exame
COND	-	Condutividade
COND 1	-	Condutividade no primeiro exame
COND 2	-	Condutividade no segundo exame
DIOS	-	Síndrome de obstrução intestinal distal
DNV	-	Declaração de Nascido Vivo
DEXA	-	<i>Dual-emission X-ray absorptiometry</i> (Dupla emissão de absorciometria de raios-X)
FC	-	Fibrose Cística
FEPE	-	Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional
GGT	-	Gama glutamil transpeptidase ((ou Gama GT)
HC	-	Hipotireoidismo Congênito
IRT	-	Tripsina Imunorreativa

K ⁺	-	Íon Potássio
Mmol/l	-	Milimol por litro
Na	-	Sódio
Na ⁺	-	Íon Sódio
NaCl	-	Cloreto de Sódio
NPD	-	Medida da diferença de potencial nasal
PAS	-	Coloração ácido periódico-Schiff
PCR	-	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PKU	-	Fenilcetonúria
PNTN	-	Programa Nacional de Triagem Neonatal
RN	-	Recém nascido
ROC	-	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
SRTN	-	Serviço de Referência em Triagem Neonatal
SUS	-	Sistema Único de Saúde
TGO	-	Transaminase glutâmica oxalacética
VPN	-	Valor preditivo negativo
VPP	-	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 OBJETIVOS.....	26
1.1.1 Objetivos Gerais	26
1.1.2 Objetivos Específicos.....	27
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1 FIBROSE CÍSTICA	28
2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	35
2.3 FISIOPATOLOGIA.....	36
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	39
2.4.1 Manifestações Respiratórias.....	41
2.4.1.1 Insuficiência respiratória	44
2.4.1.2 Atelectasia	44
2.4.1.3 Pneumotórax.....	45
2.4.1.4 Hemoptise.....	45
2.4.1.5 Aspergilose broncopulmonar alérgica	46
2.4.1.6 Microbiologia.....	46
2.4.1.7 Complicações	47
2.4.2 Manifestações Digestivas	47
2.4.2.1 Pâncreas	49
2.4.2.2 Patologia.....	49
2.4.2.3 Manifestações clínicas	50
2.4.2.4 Avaliação laboratorial.....	52
2.4.2.5 Curso clínico	53
2.4.2.6 Pancreatite recorrente.....	53
2.4.2.7 Diabetes Mellitus	54
2.4.2.8 Trato Gastrointestinal.....	56

2.4.3	Manifestações Hepatobiliares	59
2.4.3.1	Doença hepatobiliar	59
2.4.3.2	Manifestações clínicas	60
2.4.3.3	Glândulas sudoríparas	62
2.4.4	Manifestações Nutricionais	67
2.5	CFTR.....	68
2.5.1	Mutações no Gene CFTR	70
2.5.2	Epidemiologia da Fibrose Cística	73
2.5.3	Diagnóstico Clínico	78
2.5.4	Diagnóstico Precoce	80
2.5.5	Curso Clínico de Crianças com FC Identificados Através da Triagem Neonatal.....	83
2.5.6	Efeitos em Longo Prazo da Primeira Infância – Resultados nos Bebês Recém, Identificados nos Programas de Triagem Neonatal.....	83
2.5.7	Controvérsias Atuais na Triagem de Recém-Nascidos Para FC	84
2.5.8	Função do CFTR no epitélio e patogênese da doença.....	84
2.5.8.1	Glândula sudorípara.....	85
2.5.8.2	O epitélio das vias aéreas.....	89
2.5.8.3	Genótipo CFTR e outras características do fenótipo na FC	91
2.6	INCIDÊNCIA	92
2.7	TRIAGEM NEONATAL	96
2.8	DIAGNÓSTICO.....	102
2.9	GENÉTICA	104
3	MATERIAL E MÉTODOS	105
3.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	105
3.2	CARACTERÍSTICA DO ESTUDO.....	106
3.3	AMOSTRA DA PESQUISA	106
3.3.1	Critério de Inclusão	106
3.3.2	Crterios de Exclusão	106

3.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	107
3.5 METODOLOGIA DA TRIAGEM NEONATAL	107
3.6 COLETA E ENVIO DE MATERIAL	108
3.6.1 Coleta de Sangue Inadequada.....	109
3.7 DETERMINAÇÃO DA TRIPSINA IMUNORREATIVA (IRT) NA TRIAGEM NEONATAL	111
3.7.1 Princípio do Ensaio	112
3.7.2 Conteúdo do “Kit”	113
3.7.3 Cuidados Necessários	115
3.7.4 Controle de Qualidade	115
3.7.5 Resultados Anômalos	116
3.7.6 Resultados.....	116
3.8 TESTE DO SUOR - COLETA DO SUOR – ESTIMULAÇÃO ATRAVÉS DA IONTOFORESE POR PILOCARPINA	116
3.8.1 Princípio do Ensaio	116
3.8.2 Soluções de Eletrólitos.....	117
3.8.3 Almofadas de Gaze como Base para Solução de Eletrólitos.....	118
3.8.4 Coleta	118
3.8.4.1 Tempo de coleta	119
3.8.4.5 Armazenamento do suor antes da análise	119
3.8.4.6 Pesagem.....	119
3.8.4.7 Quantidade de amostra - Definição de amostra suficiente	120
3.8.4.8 Cuidados necessários.....	120
3.8.4.9 Recomendações	120
3.8.4.10 Instrumentação e equipamento (Sistema de coleta de suor Wescor Macroduct (Modelo 3600, 3700 etc.).....	120
3.9 ANÁLISE DO SUOR - DETERMINAÇÃO DA CONDUTIVIDADE NO SUOR – WESCOR - TÉCNICA QUALITATIVA.....	124
3.9.1 Coleta do Suor	124

3.9.2	Recomendações para Prevenir as Queimaduras	128
3.9.3	Remoção e Armazenamento da Amostra de Suor Coletado	131
3.9.4	Leitura.....	132
3.9.5	Controle de Qualidade	133
3.9.6	Observações.....	133
3.9.7	Linearidade da Condutividade e Concentração de Eletrólitos	134
3.10	DETERMINAÇÃO DE CLORETO NO SUOR – TÉCNICA QUANTITATIVA.....	134
3.10.1	Princípio do Método	134
4	RESULTADOS	140
4.1	NÍVEIS DE IRT EM PACIENTES COM SUSPEITA DE FC SUBMETIDAS AO TESTE DO SUOR	140
4.2	NÍVEIS DE IRT EM PACIENTES COM FC	142
4.3	IDADE DA CRIANÇA NA TRIAGEM NEONATAL PARA FC.....	144
4.4	VOLUME DE SUOR EM RN COM SUSPEITA DE FC NA TRIAGEM NEONATAL	146
4.5	CONDUTIVIDADE E DOSAGEM DE CLORETO.....	148
4.6	VALORES MÉDIOS DE IRT, VOLUME DE SUOR, CONDUTIVIDADE E DE CL DE ACORDO COM A FAIXA DE PESO DO RN	152
4.6.1	Análise Comparativa do Volume de Suor nas Categorias de Peso	152
4.6.2	Análise Comparativa da Condutividade nas Categorias de Peso.....	153
4.6.3	Análise Comparativa da Concentração de Cloreto nas Categorias de Peso	153
4.7	ANÁLISE COMPARATIVA DAS DOSAGENS DE IRT NAS CATEGORIAS DE PESO	153
4.8	VALORES MÉDIOS DE IRT, VOLUME DE SUOR, CONDUTIVIDADE E DE CL DE ACORDO COM A PRESENÇA DA MUTAÇÃO $\Delta F508$	153
4.8.1	Análise Comparativa das Dosagens de IRT nos Grupos.....	154
4.8.2	Análise Comparativa do Volume de Suor nos Grupos.....	154
4.8.3	Análise Comparativa da Condutividade nos Grupos	154
4.8.4	Análise Comparativa da Concentração de Cloreto nos Grupos.....	155
5	DISCUSSÃO	156

5.1 IRT.....	156
5.2 IDADE.....	161
5.3 VOLUME	161
5.4 CONDUTIVIDADE E DOSAGEM DE CLORETO.....	163
5.5 IRT/CONDUTIVIDADE/CLORETO DE ACORDO COM A PRESENÇA DA MUTAÇÃO $\Delta F508$	175
6 CONCLUSÕES	178
REFERÊNCIAS.....	179
APÊNDICES.....	189
ANEXOS	214

1 INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma das doenças genéticas mais graves e comuns na população caucasiana. É uma condição com herança autossômica recessiva, com uma frequência de 1 em 2000 nascidos vivos e uma frequência de portadores calculada em cerca de 1:50 (ANDERSEN, 1966).

Comumente os sinais e sintomas clínicos incluem doença pulmonar crônica, insuficiência pancreática, anomalias no trato gastrointestinal e no canal secretor da glândula sudorípara e um aumento na concentração de eletrólitos no suor (HEELEY, 1992).

O diagnóstico da FC é sugerido pelas manifestações de infecção sinopulmonar crônica e insuficiência pancreática exócrina. O diagnóstico deve sempre ser confirmado por um teste do suor realizado de acordo com as normas editadas no documento *National Committee for Clinical Laboratory Standards. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Analysis; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document C34-A2 (NCCLS, 2000)*.

O tripsinogênio é um dos principais componentes dos produtos secretores do pâncreas humano, o que torna seu nível no sangue um indicador específico da função pancreática. Das enzimas pancreáticas, a tripsina é a única produzida exclusivamente pelo pâncreas. As células acinares pancreáticas produzem as duas primeiras isoenzimas do tripsinogênio enzimaticamente inativo, que são ativadas para tripsina na clivagem de um hexapeptídeo do N-terminal. A forma predominante no sangue é o tripsinogênio. A tripsina ativa está ligada aos inibidores $\alpha 1$ antitripsina, $\alpha 2$ macroglobulina e inter- α -tripsina (HEELEY, 1992).

A identificação do aumento nos níveis de IRT no sangue dos bebês com FC tem tornado possível a triagem da FC neonatal em larga escala.

O aumento de IRT e de outras enzimas pancreáticas no sangue dos recém-nascidos com FC deve-se provavelmente ao bloqueio das secreções canaliculares no pâncreas, pois as células acinares parecem produzir uma quantidade normal de zimogênio. Há também um declínio relacionado à idade nos níveis de IRT em crianças com FC. Supostamente, isso ocorre devido à atrofia do ácino e sua substituição por tecido fibroso resultando em disfunção pancreática. Apenas formas

predominantes são medidas pelo Kit AutoDELFIA Neonatal IRT utilizado nos testes de triagem neonatal.

Estudos recentes provaram que um diagnóstico precoce por meio de triagem neonatal tem benefícios nutricionais demonstrados pelo melhor crescimento e, portanto, oferece a oportunidade de evitar a desnutrição em bebês com FC (DANKERT-ROELSE, 1995).

Há evidências de que o tratamento precoce pode ser importante na determinação de resultados clínicos posteriores em crianças com fibrose cística.

A descoberta da existência de alta concentração de sódio e cloreto no suor de pacientes com fibrose cística tem sido amplamente aplicada no diagnóstico da doença (DARLING, 1953; DI SANT AGNESE, 1956).

Di Sant Agnese e colaboradores quando testaram 43 pacientes com a doença, encontraram que todos tinham concentração de cloreto no suor acima de 60 mmol/l com valor médio de 106 mmol/l. Todos os 50 controles tiveram valores abaixo de 80mmol/l e somente 3 foram acima de 60 mmol/l (GIBSON, 1959).

Independente do método envolvido, o teste do suor geralmente constitui-se de três partes: estimulação da sudorese por iontoforese de pilocarpina; coleta do suor em gaze, papel filtro, serpentina tubular, retalho, ou tubo capilar; e a análise quantitativa da concentração de cloreto no suor, análise quantitativa de sódio no suor e a medida da condutividade ou osmolaridade no suor.

O teste do suor, embora considerado padrão ouro no diagnóstico da FC, também pode ser classificado em teste qualitativo e quantitativo. Um teste qualitativo é um teste de triagem para FC e o paciente com resultado positivo ou limítrofe deverá ter um teste quantitativo. Exemplo de triagem qualitativa para o teste do suor é a o teste de condutividade da *Wescor Sweat Check Analyzer* (*Wescor, Logan, Utah*), o *Advanced Instruments Conductivity Analyzer* (*Advanced Instruments, Norwood, Mass*) o Orion eletrodo de pele para cloretos (*Orion Research, Cambridge, Mass*), o *Scandipharm CF Indicator System Chloride Patch* (*Scandipharm, Birmingham, Ala*), e a medida por osmolaridade.

No teste quantitativo do suor, a quantidade de suor é medida e a concentração de cloreto ou de sódio é determinada (HAMMOND, 1994).

O método para obtenção de suor no diagnóstico da FC consiste da introdução da pilocarpina na pele por iontoforese produzindo sudorese localizada. O processo de iontoforese é completamente indolor e necessita apenas 5 minutos. Uma

sudorese rápida continua por cerca de 30 minutos depois da estimulação, período este necessário para adequada coleta do suor produzido (GIBSON, 1959).

O teste de iontoforese por pilocarpina, quando executado corretamente, é muito preciso, mas o fator tempo e habilidade são requeridos para prevenir a evaporação durante a coleta. Este fato pode prejudicar a determinação posterior do peso do suor através de balança analítica e o cálculo da composição química da amostra diluída. Para simplificar o teste, muitos laboratórios têm adotado métodos alternativos.

O sistema de coleta Macroduto (*Wescor Inc., Logan, Utah*) é simples e evita muitos problemas. O suor é coletado através de um tubo espiral plástico, evitando evaporação. As etapas de pesagem e eluição neste procedimento são eliminadas. O suor coletado pode ter sua composição iônica analisada imediatamente, ou pode ser submetido a um analisador de condutividade (*Sweat-Chek Conductivity Analyzer*) antes da determinação química.

A compreensão dos aspectos genéticos e fisiopatológicos da fibrose cística tem possibilitado aumentar os estudos na identificação das mutações do gene da CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* - Regulador Transmembrana da Fibrose Cística), porém o elevado número de mutações já descritas é um fator limitador para o uso dos testes genéticos mantendo-se o diagnóstico pelo teste do suor (LEGRYS, 1996).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- a) Avaliar os resultados laboratoriais dos testes utilizados na triagem neonatal para a FC: Tripsina Imunoreativa (IRT), teste do suor qualitativo (Condutividade) e o teste do suor quantitativo (Dosagem de Cloreto) nos indivíduos detectados suspeitos no programa de triagem neonatal do Paraná.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Comparar os níveis de IRT inicial da triagem e o obtido na recoleta;
- b) Correlacionar o peso da criança com volume de suor obtido, condutividade e concentração de cloreto no suor;
- c) Comparar os resultados de IRT inicial, de cloreto e da condutividade com a presença ou ausência da mutação $\Delta F508$ em pacientes com FC;
- d) Comparar os resultados obtidos nas duas técnicas utilizadas no diagnóstico confirmatório da FC no recém nascido: o método da Condutividade e o método Amperométrico ou Coulométrico quantitativo para dosagem de cloretos no suor;
- e) Determinar os indicadores de sensibilidade, especificidade, valor de preditivo positivo e estimar valor de corte para o teste da condutividade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FIBROSE CÍSTICA

Uma das mais antigas referências à FC é um dito popular do folclore da Europa Setentrional: “se uma criança que beijada na fronte apresentasse gosto salgado, ela seria enfeitiçada, e logo iria morrer”.

Esta lenda descreve o suor salgado dizendo que é a base de um importante teste diagnóstico. Ela também enfatiza a mortalidade precoce.

A primeira descrição de uma das características relevantes da FC foi dada pelo patologista Landsteiner em 1905¹, ao descrevê-la como Fibrose Cística do Pâncreas, uma enfermidade característica do pâncreas exócrino, não envolvendo as ilhotas de Langherans, constatando em certos enfermos recém-nascidos a presença de um íleo meconial. Em 1919, Passini² verificou nos antecedentes dos enfermos a presença de esteatorréia crônica semelhante à da síndrome celíaca (DAMACENO, 1996).

Somente em 1936 Fanconi, Uehlinger e Knauer vincularam a patologia pancreática exócrina da FC à lesão pulmonar obstrutiva crônica e a bronquiectasia, componentes clínicos indissociáveis.

A FC foi primeiramente reconhecida como doença em 1938 quando estudos de autópsias em crianças desnutridas, somando 49 casos, distinguiram esta doença com característico muco pegajoso nos ductos glandulares, indicando também o íleo meconial como manifestação mais precoce da enfermidade, denominando-a de Fibrose Cística do Pâncreas e separando-a de outras entidades como a Síndrome da Doença Celíaca. Até 1930, a doença era considerada uma síndrome clínica de características semelhantes a outras causas de má absorção e retardo de crescimento como a intolerância ao glúten descrita por Andersen³ em 1938. Essa

¹ Landsteiner, K.; Darmverschluss durch eingedicktes meconium: pankreatites. Zentrabl allg Path 1905: 6: 903.

² Passini, F.; Pankreaserkrankung als ursache des nichtgedeihens. Dtsch. Med. Wschr, 1919:851-853, 1919.

³ Andersen, D.H.; Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease – A clinical and pathologic study. Am. J. Dis. Child. 1938:56:341-99.

³ Passini, F.; Pankreaserkrankung als ursache des nichtgedeihens. Dtsch. Med. Wschr, 45:851-853, 1919.

doença foi caracterizada por má absorção de gorduras e proteínas, esteatorréia, distúrbio no crescimento, infecção pulmonar, dano pancreático, distúrbios nutricionais, como consequência da perda de enzimas pancreáticas, vulnerabilidade à infecções pulmonares e óbito (FARBER, 1944). Até este ponto, a base dos estudos estava focada nas anormalidades do muco. A espessura e a viscosidade do muco pegajoso nos ductos das glândulas em toda parte do corpo, permitiu uma designação alternativa de “mucoviscidose” (FARBER, 1944). Mais tarde recebeu a denominação de “Exocrinopatia Generalizada” em virtude de inúmeras glândulas exócrinas estarem afetadas (DI SANT AGNESE, 1956).

A descoberta crítica aconteceu durante um período de verão intenso no ano de 1948, em Nova York, por um jovem pediatra, Paul di Sant’ Agnese⁴ verificando um quadro de prostração por calor em muitas das crianças com FC internadas. Descobriu que os pacientes com FC perdiam excessivo sal no suor. Encontrou este distúrbio em 177 indivíduos.

Ele postulou que o suor delas era anormal e demonstrou um excesso de 05 (cinco) vezes mais sódio e cloreto no suor destes pacientes, que persistia mesmo depois que a onda de calor desapareceu (DI SANT AGNESE, 1956). Essa descoberta levou ao desenvolvimento de um teste que tem se mantido como pedra angular no diagnóstico; a mensuração do teor de cloreto no suor.

Esta anormalidade, persistente na FC, à parte do muco viscoso da glândula, implicou que a base do defeito poderia não ser especificamente na modificação das características do muco.

Elevadas concentrações de cloreto no suor constituíram a base de um teste diagnóstico denominado de técnica de iontoforese por pilocarpina (GIBSON, 1959).

O teste contribuiu sobremaneira para o diagnóstico da FC. Poucos testes na medicina clínica têm potencial discriminativo como o “Teste do Suor”. Quase toda criança com diagnóstico clínico de FC tem elevada concentração de cloreto no suor, acima de 60 mmol/l. Somente em poucas condições, clinicamente pouco distintas da FC, há também concentrações elevadas de eletrólitos no suor, considerado como falso positivo quando o teste é aplicado. Em caso de teste positivo não se deve descartar a possibilidade de a amostra de suor ter sofrido evaporação ou

³ Andersen, D.H.; Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease – A clinical and pathologic study. Am. J. Dis. Child. 56:344-399, 1938.

⁴ Farber, S.; Pancreatic function and disease in early life.: Pathologic changes associated with pancreatic insufficiency in early life. Arch. Path. 37:231-250, 1944

contaminação durante o procedimento. O teste também pode gerar resultado falso negativo em situações de edema, ou devido à algumas mutações da FC onde a concentração de íons cloreto não é alterada, e também devido à problemas técnicos durante a diluição da amostra coletada de suor, conforme o método empregado, como ilustrado na figura 1.

Falso negativo	Falso positivo
Edema, desnutrição, algumas mutações da	Hipotireoidismo, Doença de Addison, Displasia ectodérmica, doença de depósito de glicogênio, Fucosidose, desnutrição
	Outras

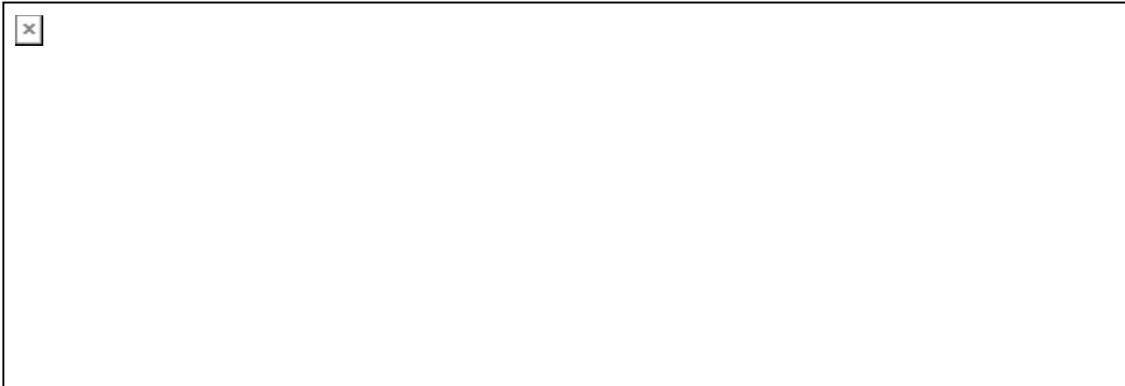


FIGURA 1 - CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NO SUOR RELACIONADA AO DIAGNÓSTICO DA FC

FONTE: DAVIS (2001) (Revised and reprinted by permission)

Por meio do Teste do Suor, pacientes com forma clínica branda, alguns sem insuficiência pancreática, poderiam ser identificados. A descoberta de Di Sant'Agnese levou imediatamente Shwachman *et al.*, em 1955-1956, à pesquisa das taxas de eletrólitos no suor, o que se incorpora hoje como prova indispensável no diagnóstico diferencial da FC. Conhecida universalmente como Prova ou Teste do Suor é atualmente utilizada no mundo todo (DAMACENO, 1996).

O entendimento da patogenia e da base molecular da FC teve pouco progresso durante os próximos 30 anos (1950, 60s e 70s) (SCREEVER, 2001).

Em 1946, Anderson e Hodges⁵ reconheceram a FC como doença de origem genética transmitida como herança autossômica recessiva. Já os anos 80

⁵ Anderson, D.H.; Hodges, R.G.; Celiac Syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. Am. J. Dis. Child. 72:62, 1946.

testemunharam notáveis avanços na compreensão da fisiopatologia da doença. Em 1983, Paul Quinton, demonstrou que nas glândulas sudoríparas, a permeabilidade ao íon cloreto no seu escoamento para os ductos, encontrava-se defeituosa. Os canais apicais para o cloro, ao nível da membrana, estavam presentes, mas sua regulação pelo AMP-cíclico mostrava-se aberrante. Quinton e Bijman registraram altos potenciais bioelétricos ao nível da membrana, devido ao decréscimo da absorção de cloro nas glândulas sudoríparas dos pacientes com FC (QUINTON, 1983).

No mesmo período, Knowes *et al.* e Boucher *et al.* também forneceram evidências desse defeito no epitélio do transporte aéreo na FC identificando um aumento na reabsorção de (sódio) Na como traço regular da FC nas vias aéreas. Eles demonstraram que o epitélio tinha um aumento da permeabilidade ao (Íon sódio) Na^+ (KNOWLES, 1983).

Widdicombe *et al.* demonstraram que o defeito no epitélio da FC era predominantemente na membrana apical. No epitélio normal das vias aéreas um aumento do cAMP abre o canal apical de Cl^- (Íon cloreto) provendo um caminho para o Cl^- fluir através do epitélio. No epitélio da FC um aumento do cAMP falha ao abrir o canal de Cl^- apical (SCREEVER, 2001).

Mais deduções vieram quando o Dr. Kenzo Sato mostrou um defeito no cAMP-estimulado, mas não na secreção do Cl^- estimulado pelo (Íon cálcio) Ca^{2+} (Íon cálcio) nos ductos das glândulas secretoras.

Além disso, o Dr. Hinda Kopelman *et al.* sugeriram defeito no transporte de sal no epitélio pancreático (SCREEVER, 2001).

Pela primeira vez essas observações começaram a fornecer uma hipótese comum e uniforme sobre a doença: A FC é causada pelo transporte anormal de Cl^- nos epitélios.

Nos anos 80 também houve um grande esforço para clonar o gene da FC. Em 1990, Welsh *et al.* e Wilson, Collins *et al.* expressaram a proteína CFTR em células epiteliais de FC e o defeito no transporte de Cl^- na FC (WELSH, 1993; SCREEVER, 2001).

O gene da FC, ilustrado na figura 2, foi descoberto em 1989 por Laap-Chee Tsui e Francis S. Collins, utilizando a estratégia de clonagem por posicionamento

denominando-o de *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), regulador de condutância transmembrana da FC (TSUI, 1991)(ROMMENS, 1989).

Eles concluíram que o gene se expressava em epitélios afetados pela doença e encontraram mutações que estavam presentes nos cromossomos da FC, mas que não estavam presentes nos cromossomos normais.

Desde então, mais de 1500 mutações associadas a esta doença foram identificadas em todo o gene. A capacidade para detectar mutações tem permitido que indivíduos possam ser rastreados para mutações e tem proporcionado a capacidade de diagnóstico pré-natal (THE CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM, 1994).

O gene da FC é composto por 27 exons, localizado no braço longo do cromossomo 7, no locus q31. É formado por 250 quilobases, com 27 exons e tem a propriedade de codificar um RNAm de 6,5 quilobases, que transcreve uma proteína transmembrana reguladora de transporte iônico, composta por 1.480 resíduos de aminoácidos, conhecida como canal de cloreto AMP cíclico (cAMP) regulador e que é chamado de gene *CFTR*. Das mutações do gene a mais comum chama-se $\Delta F508$, tratando-se de uma deleção de três nucleotídeos do 10º exon do referido gene, ocasionando a ausência do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína. Esta deleção produz-se em uma região chave da proteína CFTR que parece desempenhar um papel fundamental na fixação da ATP (ROMMENS, 1989).

Esta mutação é a mais freqüente, presente em cerca de 1 em 30 indivíduos brancos nos EUA (Figura 2).

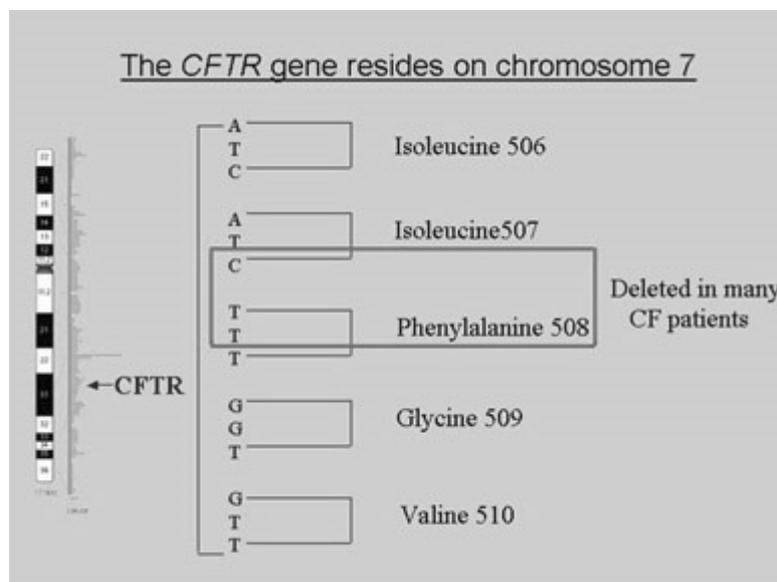
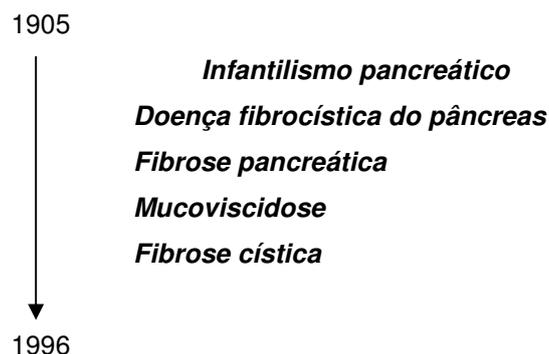


FIGURA 2 - GENE CFTR

FONTE: <http://www.mcgill.ca/hostres/diseases/cystic/>

Atualmente, o termo “fibrose cística” é aplicado a pacientes com uma lesão no canal cloreto e AMP – Regulador da proteína CFTR, expresso em muitas células epiteliais, incluindo o ducto de suor, ocasionando aumento da concentração de cloreto no suor e alterações nas vias respiratórias, promovendo o surgimento de doença que no pulmão se caracteriza por infecção bacteriana e bronquiectasia; no ducto pancreático por insuficiência pancreática; no intestino e árvore biliar conduzindo à obstrução intestinal; e nos vasos deferentes que pela obstrução acarreta infertilidade masculina.

A FC recebeu nas últimas décadas as seguintes denominações:



Existe consenso entre os autores de que deve permanecer a denominação Fibrose Cística (FC) que se apóia na reutilização da tradicional designação procedente da descrição inicial; portanto, Fibrose Cística do Pâncreas excluindo o termo Pâncreas que fazia sobressair a participação isolada desse órgão, que deve prevalecer ao se referir a esta doença (SCREEVER, 2001).

Durante a década de 1990 surgiram importantes deduções sobre a função do CFTR, como as mutações, sua função e pistas para a patogênese e fisiopatologia. Com base em estudos de diferentes laboratórios, sabe-se que a CFTR, localizada na membrana apical dos epitélios, está afetada. O conhecimento de que a CFTR é um canal epitelial de Cl⁻, regulado pela fosforilação, começou a juntar-se às observações clínicas de que o epitélio é o sítio da doença, de que existem

anormalidades fisiológicas no transporte de Cl^- nestes epitélios, e de que o defeito genético molecular e a função do canal CFTR de Cl^- são importantes.

O conhecimento que na FC o transporte dos eletrólitos está defeituoso nos epitélios explica mais facilmente as anomalias nas glândulas sudoríparas, pâncreas, ductos deferentes e intestino. No entanto, é mais difícil compreender a patogênese da doença pulmonar.

Apesar dos grandes avanços na genética, molecular e celular, e aspectos fisiológicos da FC, a doença pulmonar permanece como uma ameaça à vida e um problema incurável.

Uma melhor compreensão dos aspectos clínicos básicos de uma doença determina evolução no desenvolvimento da terapia genética e de novos fármacos.

A história e o estudo da investigação da FC podem fornecer algumas lições de valor para o estudo de outras doenças. Em primeiro lugar, a identificação de pessoas com uma síndrome clínica distinta seguida pela clonagem posicional levou à descoberta do gene da FC.

Em segundo lugar, grande esforço tem sido empregado para compreender a função da proteína CFTR e sua estrutura. Este trabalho tem ajudado a relacionar a biologia molecular do gene CFTR à fisiologia dos epitélios.

Em terceiro lugar, uma avaliação no banco de dados da mutação e da relação entre genótipo e fenótipo pode ter vários benefícios. O conhecimento das relações genótipo-fenótipo possibilita o estabelecimento do prognóstico da doença em alguns casos, incluindo terapias orientadas para mutações específicas no futuro.

Em quarto lugar, o estudo intensivo de um único gene da doença pode ter um inesperado impacto em outras áreas da medicina. Por exemplo, poucos teriam previsto que mutações no gene CFTR seriam relacionadas à infertilidade masculina idiopática e pancreatite. Além disso, mais investigações sobre a FC indiretamente têm beneficiado o entendimento de outras doenças.

Quinto, não obstante o enorme progresso que tem sido feito, o conhecimento da estrutura da proteína CFTR e de sua função permanece ainda superficial, e a compreensão do motivo pelo qual os pacientes desenvolvem doenças pulmonares não está totalmente elucidado. Esta situação é devida, em parte, à necessidade de compreender a biologia, ao nível do órgão e organismo. Tentativas de obter esse conhecimento proporcionam um verdadeiro desafio, porque elas exigem que os investigadores observem o paciente ou o modelo de sistemas que reproduzem

fielmente os mecanismos biológicos *in vivo*. Em alguns casos, camundongos geneticamente manipulados podem ser instrumentos para alcançar este objetivo (SCREEVER, 2001).

2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA FC

A fibrose cística é uma doença complexa que afeta vários órgãos e sistemas, incluindo o pulmão e o trato respiratório superior, o trato gastrointestinal, pâncreas, fígado, glândulas sudoríparas e trato geniturinário.

As alterações nutricionais, secundárias à insuficiência pancreática visto na maioria dos pacientes com FC, têm graves consequências para o crescimento e o sistema esquelético. A lesão pancreática também resulta no *Diabetes Mellitus* em um crescente número de pacientes. Complicações reumáticas não são incomuns e provavelmente estão relacionadas a uma infecção crônica das vias aéreas.

A disfunção de órgãos pode aparecer em diferentes idades em indivíduos com FC. A progressão da doença também é extraordinariamente variável, porém a maioria dos pacientes com FC têm evidência de muitas anormalidades relacionadas com o pulmão e o trato respiratório superior. Embora a FC seja uma doença multissistêmica, é no pulmão que ocorre o envolvimento das principais causas de morbidade e mortalidade.

Na FC, uma falha de defesa do pulmão leva à proliferação de bactérias, particularmente a *Pseudomonas aeruginosa*, acompanhada de intensa inflamação das vias aéreas. Tosse e produção de escarro são os achados clínicos mais comuns. Muitos pacientes também apresentam pólipos nasais e sinusite.

A avaliação do estado respiratório na FC é útil na determinação do tratamento e prognóstico e inclui técnicas de imagens, medição da função pulmonar e monitoração das vias aéreas por meio de culturas microbianas. Na FC a doença pulmonar pode resultar em uma série de complicações, incluindo atelectasia, hemoptise grave, pneumotórax e aspergilose broncopulmonar alérgica.

O curso clínico dos pacientes com FC é caracterizado por um declínio progressivo da função pulmonar levando, em última análise, à insuficiência respiratória intratável e morte ou necessidade de transplante pulmonar.

A mediana de sobrevivência acumulada nos Estados Unidos foi de 32,3 anos em 1997. (DAVIS, 2006).

A figura 3 ilustra a idade, em mediana, de sobrevivência de pacientes com FC desde a primeira descrição da doença. Os dados anteriores a 1970 foram coletados da literatura (DAVIS, 2006).

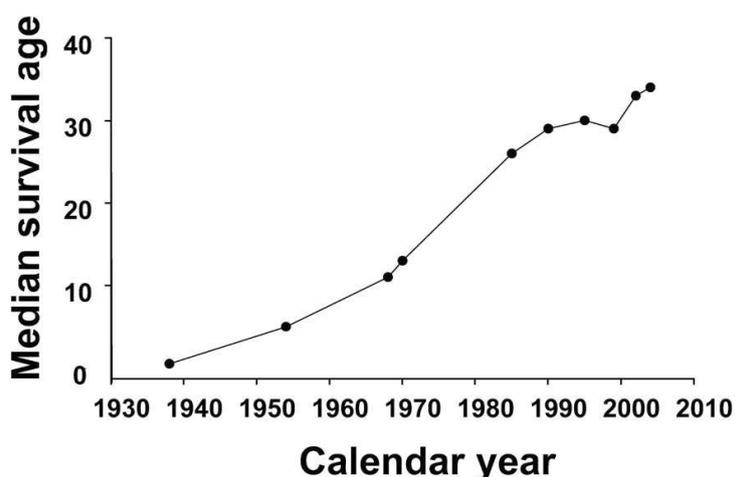


FIGURA 3 - IDADE DE SOBREVIVÊNCIA NA FC (mediana)

FONTE: DAVIS (2006)

2.3 FISIOPATOLOGIA

A FC afeta predominantemente as vias respiratórias. As marcas da patologia nas vias aéreas são o muco pegajoso, infecção e inflamação. A progressão da doença pulmonar de forma mais estrutural e com lesões de vias aéreas, resulta em bronquiectasias e bronquiolectasias.

Na fase final da doença pulmonar há grande destruição da arquitetura das vias aéreas acompanhadas por fibrose do parênquima pulmonar circundante. Cistos bronquiectásicos e abscessos são proeminentes. A circulação brônquica fica hipertrofiada e pode haver alterações vasculares associadas à hipertensão pulmonar. O interstício e alvéolos, na sua maior parte, são mais preservados do que as vias aéreas.

Há ainda um grande interesse científico do conhecimento do início da patologia da FC no pulmão. Em parte, porque não está claro como as mutações que

causam alterações na proteína CFTR levam a endobronquite infecciosa. A determinação do mecanismo de início da doença pulmonar pode fornecer pistas para a patogênese, pois existem poucos estudos patológicos do pulmão fetal na FC.

Um estudo de fetos, com diagnóstico presuntivo de FC, com base na elevação da enzima intestinal e história familiar, concluiu que as glândulas traqueais estavam dilatadas pelo muco, evidenciada pela reação positiva do ácido periódico-Schiff (PAS) quando comparada com o material do grupo controle (SCREEVER, 2001).

A coloração ácido periódico-Schiff ou coloração PAS (do inglês *Periodic acid-Schiff*) é um método de coloração utilizado em histologia e patologia. Este método é primariamente usado para identificar glicogênio em tecidos. A reação do ácido periódico seletivamente oxida os resíduos de glicose produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff e produz uma cor púrpura-magenta. Um corante básico adequado é frequentemente usado como um corante de contraste.

A coloração PAS é principalmente usada para colorir estruturas contendo uma alta proporção de macromoléculas de carboidratos (glicogênio, glicoproteína, proteoglicanos). A maioria dos estudos da patologia pulmonar em lactentes com FC foram realizados várias décadas atrás, quando os pacientes ainda crianças freqüentemente sucumbiam à doença respiratória ou íleo meconial.

Um dos primeiros estudos de 28 crianças com doença respiratória bacteriana mostrou infecção em 25 e nenhuma infecção ou infiltrado celular nas demais. Essas três crianças apresentaram, entretanto, grande quantidade de muco pegajoso, o que sugeriu o diagnóstico de FC. Infecção viral ou bacteriana anterior poderia ter contribuído para a presença de muco pegajoso nestes casos, porém, estudos virais não foram realizados nem foram notificadas culturas bacterianas anteriores (SCREEVER, 2001).

Uma série de estudos examinando a morfologia de glândulas traqueais em crianças com FC, não registraram anormalidades na maioria dos casos.

Por meio de técnicas morfométricas foi observado um aumento sutil do diâmetro da traquéia acinar com presença de muco na glândula, apesar de um número de pacientes com FC apresentarem valores indistinguíveis (SCREEVER, 2001).

Em cada um dos estudos relatados em crianças, alguns pacientes apresentam histologia normal nos pulmões em todos os aspectos.

O peso da evidência patológica, então, é que os pulmões são normais ao nascimento na FC, à exceção de um pequeno aumento na média do diâmetro acinar e muco nas glândulas. No entanto, há elementos característicos da FC incluindo infiltrado inflamatório, metaplasia epitelial, bronquiectasia mucopurulenta pegajosa, e algumas evidências de pneumonia. Estas alterações são evidentes no pulmão de pacientes mais velhos com FC. Macroscopicamente os pulmões destes pacientes apresentam múltiplos cistos que estão na maior parte da árvore brônquica cheias de material mucopurulento.

Os brônquios perfazem cerca de 13 a 17 por cento da superfície de corte do pulmão na FC, em comparação com menos de 5 por cento em indivíduos controle. Os lobos superiores são mais císticos do que os lobos inferiores. Além disso, a nodularidade do pulmão aparece macroscopicamente e em uma inspeção mais minuciosa corresponde a um preenchimento de muco das pequenas vias aéreas. Áreas irregulares de congestão são muitas vezes observadas.

Microscopicamente, há muco pegajoso nas vias aéreas com intenso infiltrado neutrofílico. Neutrófilos estão em vários estágios de degradação. As paredes respiratórias mostram perda de epitélio juntamente com mural (inflamação parietal) e infiltrados celulares. Inflamação intramuros consiste freqüentemente de plasma, linfócitos e células, ao contrário da população de células luminiais de neutrófilos.

Fibrose peribrônquica e peribronquiolar é comum. Ocorre hiperplasia de células caliciformes e sua extensão para vias aéreas mais periféricas. As pequenas vias aéreas podem ser dilatadas ou estreitadas. Veias brônquicas são vistas próximas das áreas de fibrose, sugerindo uma bronquiolite obliterante. O envolvimento pulmonar na FC muitas vezes pode ser desigual com pulmão normal adjacente a áreas marcadamente bronquiectásicas.

Só muito raramente há evidência de enfisema, embora a hiperventilação de espaços aéreos seja comumente encontrada.

O dano parenquimatoso ocorre, levando a pneumatocele e fibrose intersticial em áreas próximas às vias aéreas. Cistos peripleurais e aderências também estão freqüentes em exame ultraestrutural do epitélio na FC, que revela alguma desorganização de cílios (SCREEVER, 2001). Dada a importância da infecção na FC, a localização das bactérias no interior da via aérea merece um exame cuidadoso. É incomum encontrar bactérias aderentes ao epitélio das vias aéreas. As bactérias encontram-se imediatamente ao lado da parede da via aérea única quando

o epitélio é exposto ou lesionado. Tanto a *Pseudomonas aeruginosa* quanto o *Staphylococcus aureus* estão localizados mais frequentemente no muco intraluminal. A *Pseudomonas aeruginosa* é comumente vista em microcolônias semelhantes às encontradas em biofilmes (COSTERTON, 1999).

Achados patológicos menos típicos estão associados a algumas das complicações infecciosas da Aspergilose Broncopulmonar Alérgica que é acompanhada por granulomatose broncocêntrica e infecção por micobactérias podendo levar à formação de granuloma. Em particular, atividade proteolítica tem sido relatada por meio de estudos patológicos demonstrando elastina fragmentada e elastólise.

Outra descrição bioquímica da matriz de degradação das vias aéreas na FC tem sido recentemente reportada (SCREEVER, 2001).

Monócitos e macrófagos parecem estar envolvidos na condrólise dos brônquios, resultando em bronquiectasia, embora a progressão da lesão tecidual ainda não seja totalmente conhecida.

A circulação brônquica é hipertrofiada e mais tortuosa que o normal. Se a hipóxia crônica não for tratada, a circulação pulmonar apresenta alterações compatíveis com hipertensão pulmonar, incluindo hipertrofia medial e pneumonite intersticial que ocorre em aproximadamente 10 por cento dos casos. Hemorragia pulmonar é freqüentemente observada. O trato respiratório superior na FC está associado a uma série de mudanças que mostram algumas similaridades com os pulmões. Secreções purulentas espessas estão presentes nos seios. As alterações histológicas incluem o aumento de infiltrado celular na mucosa particularmente com células CD4. Erosão óssea também pode ocorrer. Pólipos nasais ocorrem em aproximadamente 15 por cento dos pacientes. Pólipos são caracterizados por distúrbios com hiperplasia do epitélio glandular, elementos da matriz, e infiltrado inflamatório (OMOY, 1987).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O aparecimento de sintomas respiratórios na FC pode ser variável. Muitos pacientes têm sintomas e sinais respiratórios na infância, mas alguns indivíduos podem não apresentar alteração no trato respiratório até idade mais tardia. A tosse é

frequente em qualquer idade. Algumas crianças têm sibilos crônicos que podem ser resistentes à terapia (KATZNELSON, 1997).

Na infância, a tosse é muitas vezes a primeira manifestação matutina, presumivelmente devido ao acúmulo das secreções durante a noite. Quase todos os pacientes com FC produzem escarro em algum ponto, que pode ser branco, amarelo ou verde no mesmo paciente em momentos diferentes.

O escarro também pode apresentar coloração castanha quando há associação com a aspergilose broncopulmonar alérgica. Escarro tingido de sangue é frequentemente visto na doença progressiva. Em lactentes e crianças, o aumento da frequência respiratória e as retrações inspiratórias subcostais são outros sinais precoces.

A auscultação do tórax freqüentemente revela sibilos ou crepitações. Contudo, diminuição do murmúrio vesicular pode ser o único achado. À medida que a doença progride, o murmúrio vesicular torna-se se ainda mais fraco. Devido à hiperventilação secundária à obstrução das vias aéreas, o tórax pode adquirir forma de barril com aumento do diâmetro ântero-posterior.

Pacientes com doença avançada podem ter cifose proeminente. Várias outras manifestações clínicas da doença respiratória na FC são frequentemente encontradas.

Um subgrupo de pacientes com FC experimenta exacerbações pulmonares agudas caracterizadas pelo aumento da tosse e produção de escarro, diminuição da função pulmonar e perda de peso. Exacerbação pulmonar aguda pode ocorrer com a infecção viral ou sem causa identificável. Hiperreatividade das vias aéreas também é manifesto, que ocorre em até 90 por cento dos pacientes em vários momentos durante o curso da doença (SCREEVER, 2001).

À medida que a doença avança a dispnéia aos esforços é proeminente, as exacerbações são mais freqüentes e a qualidade de vida é muito prejudicada.

Sintomas no trato respiratório superior são comuns em pacientes com FC em todas as idades. Pólipos nasais podem causar obstrução nas vias aéreas e reaparecem muitas vezes até mesmo após a cirurgia.

A obstrução crônica dos seios podem levar mudanças nas características faciais, incluindo o alargamento da ponte nasal. Cefaléia é um sinal comum de sinusite. A sinusite pode ser um problema gravemente debilitante na FC.

Sinusite crônica em crianças, especialmente aos 5 anos de idade, é altamente sugestiva de FC.

As manifestações clínicas podem ser muito variáveis e ocorrer precocemente, ou na vida adulta. A distribuição multissistêmica do defeito básico de ordem genética confere à enfermidade extensa variabilidade clínica, de acordo com os órgãos ou tecidos glandulares exócrinos envolvidos.

De forma geral as áreas de manifestação são:

- 1) A área respiratória, a mais crítica em severidade e letalidade;
- 2) A área digestiva, envolvendo o pâncreas exócrino, a malabsorção pré-entérica, esteatorréia e o íleo meconial;
- 3) A área nutricional;
- 4) A anormalidade de eletrólitos no suor e desidratação aguda pelo calor;
- 5) O comprometimento do aparelho reprodutor masculino.

O acometimento do trato respiratório associa-se com maior morbidade e é causa de morte em mais de 90% dos pacientes.

A FC acomete células de vários órgãos e nem todos os indivíduos expressam respostas clínicas semelhantes. Primariamente são afetados órgãos epiteliais, principalmente o epitélio brônquico, sistema digestivo, glândulas sudoríparas e aparelho reprodutor são afetados.

O acúmulo de secreções espessas, aliado à infecção crônica, vem, em última instância, ocasionar alterações irreversíveis no tecido pulmonar, como bronquiectasias.

A esteatorréia está presente em 85% dos pacientes, secundária à obstrução dos ductos pancreáticos por secreção espessa.

A esterilidade ocorre nos homens por obliteração do epidídimo, ductos deferentes e nas mulheres pelo muco cervical espesso. Outra alteração importante consiste no elevado conteúdo de eletrólitos no suor, que é utilizado para o diagnóstico da doença, que pode determinar cirrose hepática secundária a obstrução dos ductos biliares, íleo meconial e pólipos nasais. A sobrevivência que antes era limitada aos primeiros anos de vida, hoje gira em torno de 30 anos, quando os pacientes são tratados em centros especializados (RIBEIRO, 2002).

2.4.1 Manifestações Respiratórias

No aparelho respiratório o acometimento é progressivo e de intensidade variável. O curso clínico é determinado pela presença de muco viscoso e *clearence* mucociliar diminuído, predispondo à sinusite, bronquite, pneumonia, bronquiectasia, fibrose e falência respiratória.

Os pulmões são praticamente normais intra-útero e nos primeiros meses de vida, exceto por pequenas dilatações e hipertrofia das glândulas submucosas da traquéia. As alterações se iniciam nas pequenas vias aéreas.

A colonização bacteriana secundária à retenção de secreção favorece metaplasia do epitélio brônquico, impactação mucóide periférica e desorganização da estrutura ciliar. Formam-se rolhas micropurulentas nos brônquios e bronquíolos, com infiltração linfocitária aguda e crônica. O envolvimento parenquimatoso é menos freqüente, mas podem ocorrer pneumonias de repetição, principalmente em pacientes mais jovens. Com a evolução, formam-se bronquiectasias, geralmente após o segundo ano de vida, preferencialmente nos lobos superiores, decorrentes da incapacidade do paciente de esterilizar o trato respiratório e suprimir o processo inflamatório endobrônquico (RIBEIRO, 2002).

As bronquiectasias favorecem colapsos das vias aéreas, aprisionamento do ar e áreas focais de pneumonia hemorrágica. A hipóxia leva a alterações da vasculatura pulmonar e dilatação das áreas de bronquiectasias. Estas predis põem à ocorrência de *shunt* pulmonar e a ruptura desses vasos pode levar à hemorragia pulmonar.

A manifestação respiratória mais comum é a tosse crônica persistente, que pode ocorrer desde as primeiras semanas de vida, perturbando o sono e a alimentação do lactente. Muitas crianças apresentam-se com história de bronquiolite de repetição, síndrome do lactente chiador, infecções recorrentes do trato respiratório ou pneumonias recidivantes. Com a evolução da doença, ocorre uma diminuição da tolerância ao exercício. Alguns pacientes são oligossintomáticos por vários anos, o que não impede a progressão silenciosa para bronquiectasias.

A doença pulmonar evolui em praticamente 100% dos fibrocísticos para *cor pulmonale*. Nas fases avançadas, os pacientes têm tórax enfisematoso, broncorréia purulenta, principalmente matinal, freqüência respiratória aumentada, dificuldade

expiratória, cianose periungueal e baqueteamento digital acentuado. Nessa fase, queixam-se de falta de ar durante exercícios e fisioterapia, e, posteriormente, em repouso.

As complicações incluem hemoptises recorrentes, impactações mucóides brônquicas, atelectasias, empiema, enfisema progressivo, pneumotórax, fibrose pulmonar, osteopatia hipertrófica e *cor pulmonale*.

As vias aéreas superiores são comprometidas na totalidade dos pacientes na forma de pansinusite crônica, otite média crônica ou recorrente, anosmia, defeitos de audição e rouquidão transitória.

A polipose nasal recidivante ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes e pode ser a primeira manifestação da doença (RIBEIRO, 2002).

A doença pulmonar na FC caracteriza-se pela colonização e infecção respiratória por bactérias que levam a dano tissular irreversível. Os microrganismos, na maioria das vezes, aparecem nas vias aéreas na seguinte ordem: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa mucóide*, *Pseudomonas cepacia* ou *Burkholderia cepacia*.

Geralmente, o *Staphylococcus aureus* e o *Haemophilus influenzae* são encontrados precocemente, mesmo antes do aparecimento de sintomas. A colonização por *Pseudomonas aeruginosa* é muito difícil de ser erradicada, mesmo com o uso de antibióticos.

Os indivíduos com FC não apresentam defeitos imunes, nem infecções de repetição em outros órgãos que não os do trato respiratório.

Existem duas hipóteses para a doença pulmonar na FC. A primeira hipótese baseia-se na falta ou defeito da proteína CFTR, que causaria desidratação do muco e diminuição da atividade mucociliar, favorecendo a infecção. Contra essa teoria, existe o fato observado na discinesia ciliar, que apresenta alteração mucociliar muito mais grave que na FC, mas a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* é muito menos freqüente e só ocorre tardiamente. A segunda hipótese sugere que a falta ou defeito da CFTR resulta em elevada concentração de sais nas vias aéreas, inibindo a ação de defensinas (incluindo peptídeos antibacterianos e as defensinas humanas beta 1 e 2) que destroem estas bactérias. Devido a este mecanismo não se justifica a utilização por longos períodos de soluções hipertônicas por via inalatória na FC.

Estudos *in vitro* mostram que a *Pseudomonas aeruginosa* adere com mais intensidade e facilidade nas células do epitélio das vias aéreas de pacientes com FC que nas células de indivíduos saudáveis.

Um resumo dos principais eventos que ocorrem nos pulmões decorrentes da FC está demonstrado no quadro 1 (RIBEIRO, 2002).

QUADRO 1 - CURSO DA DOENÇA PULMONAR NA FC

Mutação genética
Defeito na proteína CFTR
Transporte anormal de água e eletrólitos
Produção de secreção de muco espesso e viscoso
Colonização e infecção crônicas das vias aéreas
Acúmulo de DNA derivado de neutrófilos e de secreções ricas em elastase
Obstrução das vias aéreas e mais infecções
Doença pulmonar obstrutiva crônica progressiva

FONTE: RIBEIRO (2002)

2.4.1.1 Insuficiência respiratória

A insuficiência respiratória é a principal causa de morte em mais de 90 por cento dos pacientes com FC. É caracterizada por dispnéia, hipoxemia e elevação da PCO_2 arterial. A hipoxemia é frequentemente reativa à suplementação com oxigenioterapia. Em lactentes a insuficiência respiratória é frequentemente associada com infecções virais. A ventilação artificial tem efeito muito favorável. No passado, a ventilação mecânica não era considerada benéfica em pacientes com doença mais avançada. Hoje, com as novas técnicas de ventilação e cuidados intensivos muitos adultos com FC pode ser bem ventilados e apresentar uma boa recuperação (RIBEIRO, 2002).

2.4.1.2 Atelectasia

A atelectasia - colapso de um segmento, lobo ou todo o pulmão, alterando a relação ventilação/perfusão, provocando um *shunt* pulmonar - pode ocorrer em qualquer idade na FC. Os sinais clássicos da atelectasia são:

- deslocamento da traquéia ou mediastino homolateral à atelectasia;
- elevação do diafragma homolateral à atelectasia;
- alteração da fissura horizontal;
- pinçamento de costelas.

Na broncoscopia, em alguns casos pode ser observada, nos brônquios, a presença do muco, mas em outros casos não está evidente, sugerindo que a obstrução pelo muco é menor nas vias respiratórias. A hiperinsuflação de lobos adjacentes também pode contribuir para a atelectasia.

2.4.1.3 Pneumotórax

O pneumotórax - ar no espaço pleural - resulta da ruptura de camadas subpleurais através da pleura visceral, e ocorre anualmente, em cerca de um por cento dos pacientes com FC nos Estados Unidos.

Pacientes com pneumotórax freqüentemente queixam-se de início súbito de dispnéia e dor torácica, embora por vezes os sintomas sejam mínimos. O diagnóstico baseia-se na radiografia frontal e lateral do tórax.

2.4.1.4 Hemoptise

A hemoptise - expectoração sanguínea ou sanguinolenta originária do trato respiratório - é bastante comum e normalmente não é grave. Em cerca de 50% dos casos decorre de infecções como a bronquite aguda ou crônica. Não obstante, uma hemoptise significativa exige uma avaliação médica rápida.

A presença de estrias de sangue no escarro expectorado é um sintoma comum de pacientes mais idosos com FC. Este achado pode representar o aparecimento de uma exacerbação pulmonar, mas não exige nenhuma intervenção específica. A hemoptise maciça é definida como uma hemorragia aguda de mais de 240 ml em um período de 24 horas, ou superior a 100 ml por dia durante 3 a 7 dias

consecutivos. Ocorre anualmente, em cerca de um por cento dos pacientes com FC nos EUA. Assim como o pneumotórax, a incidência aumenta com a idade e a gravidade da doença.

A hemoptise ocorre porque uma inflamação das vias aéreas corrói ativamente uma artéria brônquica hipertrofiada. Esta complicação é mais comum em pacientes fibrocísticos com doença hepática que podem ter distúrbios nos fatores de coagulação (SCREEVER, 2001).

2.4.1.5 Aspergilose broncopulmonar alérgica

A aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) é uma infecção causada por um fungo que produz doença apenas em pessoas com antecedentes de asma ou fibrose cística.

A aspergilose é causada por um fungo (*aspergillus*) que cresce principalmente em ambientes onde há folhas mortas, em depósitos de grãos, dejetos de aves, montes de feno, esterco ou em outras vegetações em decomposição. A doença aparece em três formas: como uma reação alérgica em pessoas acometidas por asma ou fibrose cística; como uma colonização numa antiga cavidade pulmonar cicatrizada de uma condição anterior como tuberculose ou abscesso pulmonar, e na qual produz um nódulo fúngico denominado de aspergiloma; e também como uma infecção invasiva com pneumonia disseminada a outras partes do corpo através da corrente sanguínea.

A aspergilose alérgica ocorre com mais freqüência em pessoas com idades entre 20 e 40 anos e a incidência é estimada em 4 para cada 100.000 pessoas.

A doença invasiva por fungos é rara em pacientes imunocompetentes com FC, embora tenha sido descrita em pacientes recebendo corticosteróides a longo prazo ou em pacientes que são pós-transplante. Em contrapartida, a ABPA ocorre em 2-5 por cento dos pacientes. ABPA freqüentemente apresenta sibilância refratária ou um novo infiltrado na radiografia do tórax. Critérios laboratoriais de apoio incluem eosinofilia periférica, anticorpos precipitantes, um teste cutâneo de leitura imediata contra o *Aspergillus fumigatus* e elevação de IgE (150 a >1000 unidades internacionais/ml). Devido à *overlap* (superposição) entre os critérios de ABPA e os sintomas comuns da CF, o diagnóstico não deve ser

baseados achados laboratoriais, mas deve ser considerado no contexto da apresentação clínica. Há evidências crescentes de que a mesma síndrome pode servir com outros organismos fúngicos.

2.4.1.6 Microbiologia

O fracasso da defesa pulmonar na FC conduz a infecção endobrônquica crônica. Os microrganismos comumente encontrados em lactentes e crianças incluem *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. Como a doença progride, a *Pseudomonas aeruginosa* se torna o patógeno mais comumente isolado. Em vários estudos este germe predomina após dois anos de idade. Dentro de um ano, as bactérias de modo geral assumem uma aparência de muco caracterizada pela produção de um polissacarídeo. Uma vez presentes neste muco, a *Pseudomonas aeruginosa* é raramente eliminada.

Outros organismos gram-negativos, incluindo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Alcaligenes xylosoxidans* têm sido cada vez mais isolados nas vias respiratórias de pacientes com FC. Culturas de escarro na FC também são freqüentemente positivas para o fungo, especialmente *Aspergillus fumigatus* e para *Non-tuberculous mycobacter*. Técnicas microbiológicas apropriadas são necessárias para uma adequada identificação dos microrganismos.

A infecção pela *Burkholderia cepacia* é observada em cerca de 3 por cento dos pacientes. Alguns destes pacientes desenvolvem durante semanas ou meses um rápido declínio da função pulmonar associada a maior mortalidade (SCREEVER, 2001).

2.4.1.7 Complicações

O surgimento do muco pegajoso, infecção, inflamação e fibrose pulmonar na FC podem levar a uma série de complicações incluindo insuficiência respiratória, atelectasia, pneumotórax, hemoptises e aspergilose broncopulmonar alérgica.

2.4.2 Manifestações Digestivas

As manifestações digestivas são, na sua maioria, secundárias à insuficiência pancreática (IP). A obstrução dos canalículos pancreáticos por tampões mucosos impede a liberação das enzimas para o duodeno, determinando má-digestão e má absorção de gorduras, proteínas e hidratos de carbono. Causa também diarreia crônica, com fezes volumosas, gordurosas, pálidas, de odor característico e, finalmente, desnutrição calórico protéica, acentuada por outros fatores inerentes à FC (RIBEIRO, 2002).

A IP está presente em cerca de 75% dos fibrocísticos ao nascimento, em 80-85% até o final do primeiro ano e em 90% na idade adulta.

A primeira manifestação do IP na FC é o íleo meconial (obstrução do íleo terminal por um mecônio espesso), que aparece em 15-20% dos pacientes. Porém, a maioria dos casos de íleo meconial (90%) está associado à FC (RIBEIRO, 2002).

O refluxo gastroesofágico é registrado em 20 a 25% dos pacientes e contribui na desnutrição do paciente e no comportamento da afecção pulmonar. Alterações no tônus do esfíncter inferior e válvula do esôfago, por aumento da pressão intrabdominal nos episódios de tosse parecem ser a causa principal do refluxo e da esofagite persistente.

Em 20 a 25% dos pacientes pode ocorrer, no curso clínico da enfermidade, o prolapso retal, mas se apresenta freqüentemente entre 6 meses e 3 anos de idade. A diarreia crônica, a má nutrição e a hipoproteinemia concorrem para a hipotonia da musculatura esfínteriana anal. Acrescenta-se a isso o aumento da freqüência de evacuações e da pressão intrabdominal secundária à tosse e hiperinflação dos pulmões. O prolapso retal com certa freqüência pode se repetir.

Na FC aproximadamente 85 a 90% dos enfermos têm sua função exócrina severamente comprometida. Na maioria dos casos este fato ocorre na infância.

À microscopia, o padrão lobular acha-se bem demarcado pela presença de faixas fibrosas interlobulares e periductulares.

Estas faixas aumentam progressivamente provocando distorções do parênquima do órgão resultando no bloqueio das secreções que deveriam normalmente escoar no lúmen duodenal pelos ductos de Virsung e Sartorini. Esse bloqueio torna-se mais evidente em função da retenção de concreções viscosas hialinas que provocam dilatação progressiva dos ácinos, dúctulos e ductos maiores.

As células de revestimento dos ácinos tornam-se achatadas e o tecido fibroso periductular vai se entrelaçando acompanhado de variado grau de infiltração

leucocitária. Áreas de atrofia do parênquima vão sendo substituídas por tecido adiposo (DAMACENO, 1996).

As ilhotas de Langherans do pâncreas endócrino, que não são primariamente afetadas na FC pela desorganização estrutural já descrita, ficam, entretanto, muito reduzidas em 10 a 20% dos casos, sobretudo após a adolescência.

Pode-se dizer que todas as transformações pancreáticas exócrinas e endócrinas acima descritas constituem o quadro básico que sustentou, durante muito tempo, a designação da Fibrose Cística do Pâncreas.

A insuficiência das enzimas do pâncreas exócrino resulta no comprometimento da digestão de gorduras e proteínas e em menor extensão dos carboidratos. Na FC a diarreia crônica caracteriza-se, portanto, pela esteatorréia e creatorréia que são mais expressivas que em outras síndromes de malabsorção correlatas.

2.4.2.1 Pâncreas

A insuficiência pancreática exócrina (IP) está presente na maioria dos pacientes no momento do diagnóstico – mais de 80% dos casos - e é altamente correlacionada com o genótipo.

Quase a maioria dos pacientes homozigotos para a mutação $\Delta F508$ tem IP, considerando que muitos pacientes com pelo menos uma cópia de outra mutação (por exemplo, R177H, R334W, A455E) mantêm a função pancreática exócrina e são classificados como Pancreático Suficientes (PS) (KRISTIDIS, 1992).

A classificação dos pacientes em relação a apresentação de insuficiência (IP) ou suficiência pancreática (SP) é baseada na presença de esteatorréia secundária à má absorção de gordura e malabsorção.

Todos os pacientes perdem a função pancreática normal. Ao contrário, pacientes com suficiência pancreática pertencem ao grupo mais variável constituído por 50 por cento de pacientes com secreção de zimogênio normal e os outros 50 por cento remanescentes com a secreção de zimogênio anormal.

Apesar dessa variação na função pancreática, os pacientes com SP são classificados como um grupo, porque o seu curso clínico, prognóstico e genótipos são diferentes dos pacientes com IP (KEREM, 1989).

2.4.2.2 Patologia

As alterações patológicas no pâncreas são evidentes, mesmo em 32 a 38 semanas de gestação e progredem para a destruição do órgão na idade adulta, na maioria dos pacientes. As características patológicas que aparecem neste órgão levou a pesquisadora Dorothy Anderson sugerir o nome da doença para "Fibrose Cística do Pâncreas", em 1938.

Achados recentes evidenciam secreções eosinofílicas em ácinos e ductos pancreáticos, que levam a atrofia e achatamento de epitélios e dilatação de ductos e ácinos (SCREEVER, 2001).

A fibrose se torna mais evidente quando a dilatação progride. Nos casos mais avançados, o pâncreas passa a ter um tecido adiposo e grupos isolados de ilhotas. As ilhotas podem ser conservadas por muitos anos, embora não saiba se o seu número total é normal. Eventualmente, a fibrose pancreática leva a ruptura da arquitetura vascular essencial. Em contraste com a doença pulmonar, o pâncreas tem pouca resposta inflamatória, com a exceção de eosinofilia ocasional associada à ruptura dos ácinos.

2.4.2.3 Manifestações clínicas

O pâncreas exócrino é responsável pela secreção de fluidos alcalinos pancreáticos de síntese e liberação de enzimas digestivas. O epitélio ductal pancreático é igualmente o sítio de secreção de bicarbonato e água. As células acinares sintetizam, armazenam e secretam enzimas.

Na FC, a perda da função de ácinos e ductos conduz à redução de água, bicarbonato e fluidos que contém as enzimas do pâncreas que são drenadas para o duodeno. A deficiência enzimática pancreática leva a má digestão das gorduras e proteínas, produzindo distensão abdominal e freqüentemente fezes volumosas e gordurosas.

A malabsorção acarreta pobre ganho de peso e desnutrição. O crescimento linear na infância dos jovens que não recebem terapia de reposição enzimática adequada é falho.

A falha de crescimento, secundária à malabsorção, é o segundo sintoma mais comum presente nas crianças com FC, depois dos sintomas respiratórios persistentes. Nos Estados Unidos, 43 por cento dos pacientes apresentam malabsorção no momento do diagnóstico.

A perda de gorduras nas fezes pode ser tão elevada como 50 a 70 por cento do total do consumo e a malabsorção do nitrogênio também é significativa. A digestão e absorção de carboidratos não são prejudicadas gravemente nesta doença (HOFFMAN, 1987).

Embora a deficiência enzimática e a malabsorção sejam os principais contribuintes para a desnutrição, o fracasso do crescimento na FC é muitas vezes o resultado de múltiplos fatores contributivos. Deve-se também a inadequação do aporte calórico, à infecção pulmonar e inflamação, levando a um aumento da necessidade energética. Algumas crianças apresentam edema, hipoproteinemia e anemia (WILFOND, 1994).

Essas crianças podem adoecer de forma grave, exigindo intervenção nutricional agressiva e intervenção de terapia pulmonar diária. A absorção deficiente de vitaminas lipossolúveis A, E, D e K é uma manifestação comum de insuficiência pancreática na FC (WILSON, 1998).

A deficiência de vitamina A foi identificada em 21 por cento das crianças com menos de 2 meses de idade (diagnosticada pela triagem neonatal). A deficiência foi corrigida facilmente com terapia de reposição de enzima e vitamina. A deficiência de vitamina Asintomática, composta por aumento da pressão intracraniana, xeroftalmia e cegueira noturna é raramente observada atualmente, sendo apenas vista em doentes com diagnóstico tardio, insuficiência pancreática mal controlada ou doença hepatobiliar significativa.

Embora a deficiência da vitamina D tenha sido observada em 35 por cento dos recém nascidos triados, o raquitismo ocasionado pela deficiência desta vitamina é raro em pacientes submetidos à substituição enzimática. Os níveis séricos dos metabólitos da vitamina D podem estar reduzidos, embora sua relevância clínica seja desconhecida.

Um problema muito maior nos pacientes mais velhos com FC, especialmente os indivíduos do sexo feminino recebendo terapia crônica com esteróides, é a densidade mineral óssea reduzida, levando à osteoporose e fraturas patológicas subseqüentes.

A deficiência da vitamina E é bastante comum em alguns pacientes e potencialmente conducente à degeneração neuroaxonal e redução dos glóbulos vermelhos, mas é corrigida com terapia de reposição.

A deficiência da vitamina K e conseqüente redução no conteúdo de fatores de coagulação vitamina K-dependente (protrombina) podem levar a redução da coagulação e tempo prolongado da protrombina.

A doença hemorrágica grave da infância raramente é vista com a rotina de reposição de vitamina no período neonatal. Além da importante malabsorção de gorduras outros fatores contribuem para a disfunção da coagulação, como o uso crônico de antibióticos, que altera a flora intestinal necessária para o metabolismo intestinal, e disfunção hepática, com comprometimento da conversão da vitamina K para protrombina (SCREEVER, 2001).

2.4.2.4 Avaliação laboratorial

A esteatorrêia é definida como presença de gordura fecal superior a 7 por cento da gordura ingerida ou superior a 5 gramas em 24 horas. Na maioria dos casos os pacientes com insuficiência pancreática apresentam um histórico de fezes volumosas, com mau cheiro e inadequado ganho de peso. O exame microscópico das fezes demonstra gotículas de gordura neutra. A função pancreática pode ser avaliada por uma variedade de testes de apoio diretos e indiretos, dos quais nenhum é ideal (SCREEVER, 2001).

O mais usado é a pesquisa indireta de gordura nas fezes de 72h, acompanhada por uma análise simultânea de 2 horas da gordura ingerida. Como resultado este ensaio fornece informação sobre a perda diária de gordura, mas não fornece nenhuma informação sobre a reserva pancreática. Esse teste deve ser considerado para pacientes recém-diagnosticados. Além disso, estes pacientes devem também ser avaliados a fim de definir o impacto da perda de gordura e da malabsorção de proteínas sobre o estado nutricional. Esta avaliação deve incluir a revisão do crescimento linear, ganho de peso, gordura e ganho muscular, valor de albumina sérica, hematócrito e vitaminas lipossolúveis.

Para os doentes que recebem terapia de reposição enzimática, estudos periódicos do equilíbrio da gordura fecal podem ser úteis para determinar o ajuste da

dose apropriada. Nenhum outro teste laboratorial indireto é mais confiável para avaliações longitudinais.

Pacientes sem evidências de esteatorréia quer pela microscopia das fezes ou história de que são suficientes pancreáticos, devem ser submetidos à avaliação funcional da reserva de enzima pancreática e da capacidade secretória. Essa avaliação requer a coleta de secreções pancreáticas duodenais sob estimulação utilizando secretina ou colecistoquinina.

A natureza invasiva deste teste se opõe a sua utilização rotineira para acompanhamento periódico do paciente suficiente pancreático. Assim, a maioria dos clínicos acompanha o crescimento, estado nutricional do paciente e relato do aparecimento de esteatorréia.

2.4.2.5 Curso clínico

Os pacientes classificados como portadores de insuficiência pancreática geralmente apresentam esteatorréia dentro do primeiro ano de vida. As seqüelas da malabsorção de gordura e proteína são rapidamente aparentes, mas podem ser corrigidas com a ingestão adequada de alimentos.

Como a esteatorréia representa perda de mais de 98 por cento da função exócrina do pâncreas, uma vez estabelecida, há pouca alteração na sintomatologia para o resto da vida do paciente. No entanto, pode haver variações, dependendo da ingestão alimentar, padrões de crescimento, atividade física entre outros fatores. Pacientes com suficiência pancreática e bom estado nutricional freqüentemente apresentam, na idade avançada, um mínimo de manifestações gastrointestinais. Eles podem desenvolver esteatorréia mais tardiamente, mas na sua maioria nunca exigem terapia de reposição enzimática. Pacientes com suficiência pancreática são mais susceptíveis do que os doentes insuficientes para desenvolver pancreatite durante a vida.

2.4.2.6 Pancreatite recorrente

Pancreatite é uma condição incomum entre os pacientes com insuficiência pancreática que ocorre mais frequentemente em adolescentes e doentes idosos com FC, que conservaram a função exócrina do pâncreas.

A pancreatite apresenta-se com grave dor epigástrica no quadrante superior esquerdo, anorexia e vômitos associados com elevados níveis de amilase e lipase no sangue. Pode ser crônica ou recorrente, e, às vezes, pode ser associada com estreitamento do ducto pancreático ou cálculos biliares retidos. Uma associação entre as mutações do gene CFTR e pancreatite crônica idiopática foi identificada (SCREEVER, 2001).

Ambos os estudos identificaram um aumento da frequência de mutações CFTR em qualquer um ou ambos os alelos em pacientes com pancreatite crônica.

Embora nenhum destes indivíduos apresentasse manifestações pulmonares da FC ou teste do suor anormal, alguns demonstraram anormalidades do transporte de íons no epitélio nasal. Estes casos enfatizam que a disfunção do gene CFTR provavelmente tem uma ampla gama de manifestações fenotípicas além da clássica apresentação da FC.

2.4.2.7 Diabetes mellitus

Ao longo da vida os pacientes com FC têm uma probabilidade elevada de apresentar deficiência de insulina que podem levar à manifestações clínicas na segunda ou terceira década em alguns pacientes, com uma média entre 18 a 21 anos (LANNG, 1996). A base fisiopatológica da CFRDM (*Cystic Fibrosis-Related Diabetes Mellitus* (*Diabetes mellitus* Relacionada à FC) não está claramente definida. Acreditava-se amplamente que a deficiência de insulina era primariamente um resultado de uma perda de células beta devido a fibrose e infiltração de gordura no pâncreas exócrino, levando à perda de células normais da arquitetura e suprimento vascular. O número total de ilhotas diminui e a composição celular é alterada com diminuição da percentagem de polipeptídeo alfa e beta das células e aumento das células delta (SCREEVER, 2001).

Em geral, os pacientes com CFRDM têm um maior número de células beta do que ocorre com a Diabetes Mellitus tipo 1.

Assim, é provável que outros fatores, como a insensibilidade à insulina, contribuam para a manifestação clínica da CFRDM. Pacientes com má função pulmonar e inflamação associada com a infecção crônica têm maior resistência à insulina. O impacto negativo da *Diabetes mellitus* insulino-dependente na morbidade e mortalidade dos doentes é motivo de consenso. Em um relatório de um grande centro de FC, 25% dos pacientes sobreviveram à CFRDM com 30 anos de idade, em comparação com 60% dos pacientes sem diabetes. A CFRDM pode também estar associada com menor crescimento, ganho de peso e pior função pulmonar, embora o tratamento adequado possa diminuir esses efeitos negativos.

Indivíduos com FC também estão em risco de complicações retinovasculares, incluindo retinopatia (5% a 16%), nefropatia (de 3% a 16%) e neuropatia (5% a 21%) (LANNG, 1996).

A CFRDM tem uma apresentação clínica própria que é facilmente distinguida das diabetes tipos I e II.

A Associação Americana de Diabetes classifica a CFRDM na categoria de "outros tipos específicos de Doenças do Pâncreas exócrino" (MORAN, 1999).

Embora alguns pacientes possam apresentar a clássica constelação de polidipsia, poliúria, polifagia e perda de peso, a apresentação, na maioria dos pacientes é muito mais insidiosa.

Os sintomas frequentes que podem indicar a CFRDM são ausência de ganho de peso, puberdade atrasada com mau crescimento linear e um declínio na função pulmonar de causa desconhecida. Uma homeostase da glicose anormal (que consiste na ausência, absoluta ou relativa, da produção de insulina) pode ser intermitente em alguns pacientes com FC e exacerbada pelo estresse tal como infecções pulmonares ou administração de glicocorticosteróides via oral. Devido ao início insidioso e muitas vezes assintomático da CFRDM e significativo aumento da morbidade em pacientes com FC com diabetes, um consenso mais recente da Fundação de Fibrose Cística norte americana (MORAN, 1999) recomenda a triagem anual de doentes com elevação casual dos níveis de glicose. Se este nível for superior a 126 mg/dl, em jejum, é diagnóstico para CFRDM, mas deve ser confirmado por uma segunda amostra. Com um resultado alterado de glicose em estado de jejum em uma ocasião, um teste oral de tolerância à glicose deve ser considerado em situações individuais com uma duração normal e mesmas condições de jejum (MORAN, 1999).

Sintomas, tais como diminuição no ganho de peso ou velocidade no crescimento anormal, valores alterados da hemoglobina glicosilada A1C são sinais para o diagnóstico de CFRDM (FINKELSTEIN, 1988).

2.4.2.8 Trato Gastrointestinal

a) Patologia

As alterações do trato intestinal não são proeminentes. Há pouco ou nenhum achado histológico primário no esôfago, estômago ou mucosa do pequeno trato intestinal. Dessas alterações o achado que mais se destaca é a dilatação e hiperplasia submucosa das glândulas em toda a grande e pequena extensão intestinal associada com acúmulo de secreções eosinofílicas e preenchimento do lúmen. Estes achados são mais salientes nas glândulas de Brunner do duodeno. O apêndice também exhibe no epitélio hiperplasia das células caliciformes e acúmulo de secreções no interior da cripta e no lúmen. Mucocelos podem ser observadas no apêndice e esôfago. Anomalias anatômicas, incluindo atresia ileal e jejunal, estenose, reduplicação, onfalocele e defeitos mesotônicos podem ser vistas. Esses defeitos são observados em quase metade das crianças com íleo meconial (SCREEVER, 2001).

b) Íleo meconial

O íleo meconial está presente em aproximadamente 10 a 20 por cento dos pacientes com FC ao nascimento e é muitas vezes o primeiro sinal da doença. Em 1998, 18,6% dos diagnósticos de FC nos Estados Unidos foram baseados na evidência de íleo meconial ao nascimento. Essas crianças, nos primeiros dias de vida não conseguem eliminar mecônio, em associação com distensão abdominal e vômitos biliosos. Perfuração intestinal pode ocorrer tanto antes ou após o nascimento. A perfuração intra-útero pode estar associada com calcificações intra-abdominais e anomalias anatômicas, tais como estenose ileal ou atresia jejunal. Radiografias abdominais revelam níveis de ar no líquido do intestino delgado, aparência de "vidro fosco" no quadrante inferior direito e ausência de gás no cólon.

Enema contrastado com Hypaque® ou Gastrografin® é diagnóstico e terapêutica freqüente. Observa-se um pequeno microcolon não utilizado e o ponto de obstrução ileal pode ser identificado.

O íleo meconial é fortemente associado à insuficiência pancreática e a mutação DF508 (KEREM, 1989). Deve ser distinguido da Síndrome do *Plug Meconial* que envolve a obstrução do cólon no recém nascido. A Síndrome do *Plug Meconial* é menos específica para a FC e outros diagnósticos etiológicos devem ser considerados (SCREEVER, 2001).

c) Síndrome de obstrução intestinal distal

A Síndrome de Obstrução Intestinal Distal (DIOS) do inglês *Distal Intestinal Obstruction Syndrome*, é uma obstrução do intestino delgado que pode ocorrer repetidamente em pacientes com FC ao longo das suas vidas (RUBINSTEIN, 1986).

Aproximadamente 10 a 20 por cento dos pacientes apresentam episódios de dor no quadrante direito associada com diminuição da defecação. Os episódios agudos podem ter uma apresentação com obstrução completa e vômitos biliosos, ou então pode ocorrer uma sintomatologia mais crônica, com apresentação intermitente durante semanas a meses. À semelhança do íleo meconial do recém nascido a obstrução ocorre no íleo terminal e é associada com conteúdo intestinal volumoso e semi-sólido parcialmente digerido. Uma massa fecal é geralmente palpável no quadrante direito inferior.

d) Dor Abdominal

Dor abdominal crônica é um sintoma comum nos indivíduos com FC e o diagnóstico diferencial é sempre necessário. Na década de 1990 houve relatos de alguns pacientes com FC crônica que experimentaram dor abdominal e que posteriormente foi encontrada, no exame patológico, a presença de estreitamentos e fibrose sigmóide, com enema opaco evidenciando estreitamento e falta de distensibilidade do cólon direito. Alguns indivíduos submetidos à ressecções intestinais parciais e subseqüente exame patológico de intestino ressecado revelou

superfície desnuda do epitélio, ruptura intermitente da mucosa muscular, com inflamação e fibrose da submucosa.

Fitzsimmons *et al.* (1997), sugeriram que a colonopatia fibrosante está associada com uma média diária maior de doses de enzimas pancreáticas (superior à 24.000 lipase unidades/kg/dia) em pacientes jovens. Com base nestes achados, um consenso recomendou que a dose diária de enzimas pancreáticas para a maioria dos pacientes deve permanecer mais baixa (2500 unidades de lipase por quilograma por refeição, 10.000 unidades/kg/dia) (SCREEVER, 2001).

f) Prolapso retal

O prolapso retal ocorre em aproximadamente 20 por cento dos pacientes jovens com um pico de incidência entre os 12 e os 30 meses de idade (SCREEVER, 2001).

Freqüentemente começa na fase inicial quando a criança está aprendendo a utilizar o banheiro e costuma ter solução na idade escolar.

A etiologia do prolapso não é totalmente compreendida, mas os fatores que contribuem incluem fezes volumosas, secundário à insuficiência pancreática, retenção ao uso do banheiro, estado nutricional pobre, aumento da pressão intra-abdominal secundária a tosse e/ou defecação. Na maioria dos casos, uma redução da pressão com movimento suave da mão é suficiente. O ajustamento de enzimas para reduzir o volume de fezes normalmente previne recidivas. A necessidade de intervenção cirúrgica é muito rara.

g) Outras complicações

Várias outras complicações gastrointestinais têm sido relatadas em pacientes com FC. O apêndice é freqüentemente preenchido com uma secreção espessa e seca, o que pode levar a uma grande distensão sem inflamação no quadrante inferior direito e diverticulose. Curiosamente, a incidência de apendicite aguda não está aumentada na FC. De fato, os doentes podem apresentar mais tarde, com frequência, quer sintomas crônicos ou abscessos próximos ao apêndice, talvez devido à sua tolerância à dor abdominal recorrente.

2.4.3 Manifestações Hepatobiliares

O acometimento hepatobiliar é reconhecido desde a primeira descrição da FC, e está presente em mais de 50% das necropsias. Em estudos prospectivos, 25% dos pacientes apresentam alterações laboratoriais, cerca de 5% são sintomáticos e 2% morrem por doença hepatobiliar. A secreção anormal de íons pelo epitélio das vias biliares leva ao aumento da viscosidade, com diminuição do fluxo biliar, predispondo à obstrução biliar e à reação inflamatória, culminando com fibrose biliar (RIBEIRO, 2002).

2.4.3.1 Doença hepatobiliar

A doença hepática é muitas vezes clinicamente silenciosa até o aparecimento de complicações secundárias relacionadas à hipertensão portal. Por esta razão, a importância do envolvimento do fígado e vias biliares na morbidade global da FC tem recebido menos atenção do que as manifestações pulmonares e pancreáticas. A maior expectativa de vida aumentou a frequência e duração do surgimento das complicações hepáticas. Além disso, a elucidação da função da CFTR no epitélio biliar tem proporcionado uma melhor compreensão científica da patogênese da doença hepática, o que pode levar a intervenções terapêuticas mais específicas no futuro.

A fisiopatologia da doença hepatobiliar na fibrose cística, ao contrário das demais desordens hereditárias do fígado, afeta principalmente as células epiteliais dos ductos biliares, ao invés dos hepatócitos. O gene CFTR é expresso em todo o epitélio biliar intra e extra-hepático, com localização das proteínas na superfície apical.

A expressão nos hepatócitos não é evidente. As mutações genéticas da CFTR podem levar à redução ou ausência da função mediadora do cAMP no canal Cl⁻ das células epiteliais biliares, semelhante aos outros órgãos afetados.

A perda do fluxo de Cl⁻ provavelmente leva à alteração no movimento da água e Na[±] resultando em alterações na composição e hidratação biliares. As secreções anormais biliares levam à produção de um material seco, semi-sólido e eosinofílico nos ductos biliares portais secundários, com inflamação crônica.

Uma maior proporção de ácidos biliares hidrofóbicos do que hidrofílicos aumenta o ressecamento no trato biliar. Com pouca mobilidade, os ácidos biliares hidrofílicos são citotóxicos para as células do epitélio circulante resultando em liberação de citocina e inflamação, progredindo para lesão e morte tecidual levando à deposição de colágeno e fibrose periportal.

A lesão mais específica associada a este processo é a cirrose biliar focal que pode ser encontrada até mesmo no início da infância e na maioria dos adultos na autópsia. A lesão focal progride lentamente para cirrose multilobular hepática ao longo de muitos anos.

2.4.3.2 Manifestações clínicas

As manifestações da doença hepatobiliar na FC são bastante amplas, variando de assintomática à elevação das enzimas hepáticas, até cirrose hepática.

A prevalência da doença é difícil de determinar devido à baixa sensibilidade dos marcadores diagnósticos, tais como as enzimas séricas e da falta de uma definição coerente de significância clínica da doença hepática. Como resultado, relatos publicados fornecem uma grande variação na prevalência, dependendo da faixa etária estudada e da fonte de dados (autópsia ou achados laboratoriais).

Em 1997 a Fundação de Pacientes com Fibrose Cística dos EUA registraram uma prevalência global de cirrose hepática com hipertensão portal de 1%, variando de 0,1 % em pacientes com menos de 5 anos para 1,7 % naqueles com mais de 18 anos. Uma retrospectiva de um estudo inglês de 1.100 pacientes relataram uma maior prevalência variando de 0,3% em pacientes com menos de 5 anos para 8,7% em pacientes de 16 a 20 anos.

A elevação das enzimas hepáticas no soro é muito mais comum. Em vários estudos prospectivos, os níveis de aspartato transferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) os níveis variaram de 15 a 50%, com início no período neonatal e continuando na vida adulta. Elevações enzimáticas são quase sempre assintomáticas, não associadas à elevação da bilirrubina e freqüentemente transitórias. Em longo prazo o significado clínico destes achados laboratoriais é mais bem definido (SCREEVER, 2001).

Estudos de mutações genéticas revelaram uma associação significativa entre genótipos específicos e a ocorrência de doença no fígado. No entanto, a prevalência elevada das enzimas hepáticas, AST, e AP, foi maior (46%) em pacientes com insuficiência pancreática homozigotas para $\Delta F508$, em comparação com suficiência pancreática em pacientes com mutações missense (sentido trocado) leves (22%). (DUTHIE, 1992)

Existe também uma associação de íleo meconial e Síndrome de Obstrução Intestinal Distal (DIOS) do inglês *Distal Intestinal Obstruction Syndrome*, com subsequente doença de fígado.

A primeira manifestação da doença hepática é a colestase neonatal que ocorre em aproximadamente 5 por cento dos recém-nascidos com FC.

A FC deve ser sempre considerada no diagnóstico diferencial de qualquer criança com hiperbilirrubinemia significativa. Muitos dos lactentes (25 a 50%) também têm íleo meconial (SCREEVER, 2001).

O diagnóstico de atresia biliar deve ser considerado. No entanto, a icterícia colestática na FC é autolimitada, geralmente com resolução aos 2 meses de idade. Antes do início da terapia nutricional agressiva, a esteatose hepática ou "fígado gordo" era uma manifestação comum e um achado nas autópsias. É freqüentemente associada com a desnutrição e se apresenta assintomática, com fígado aumentado sem esplenomegalia. O tratamento do estado nutricional corrige a hepatomegalia e não há provas diretas de que esteatose progride para cirrose. O diagnóstico precoce e início precoce da intervenção nutricional reduz a prevalência desta manifestação clínica da doença hepática na FC. Diferente da esteatose, o fígado é nodular. Elevação das enzimas hepáticas, AST, ALT, antigamente denominada de TGO, AP e GGT são normalmente identificadas na rotina de triagem anual, mas raramente a bilirrubina está elevada. Outra constatação comumente associada é um tempo de protrombina prolongado secundário à doença hepática e deficiência de vitamina K.

Na doença mais grave, com hipertensão portal, varizes esofágicas ou gástricas se manifestam com início súbito de hematêmese ou melena. O hiperesplenismo freqüentemente leva a trombocitopenia, neutropenia, embora a esplenectomia raramente seja necessária. A insuficiência hepática e encefalopatia são achados muito tardios e raros.

É fundamental que na FC a doença hepática seja verificada, com exame físico cuidadoso do abdômen, avaliação da textura e tamanho do fígado e baço em cada consulta e triagem anual da função hepática por meio de testes específicos. Estes testes devem incluir dosagens séricas da AST, alanina aminotransferase, ALT, AP, GGT e bilirrubinas. Qualquer valor superior a 1,5 vezes o limite superior do normal deverá ser repetida em 3 a 6 meses.

Particularmente, em associação com os achados físicos de hepatomegalia, outras avaliações devem incluir investigação da função da síntese hepática (albumina sérica e tempo da protrombina) e rastreio de outras etiologias de elevação de enzimas, incluindo infecções, drogas e toxinas. A ultra-sonografia do fígado, vias biliares, vesícula biliar, baço, fígado e vasculatura é o mais útil estudo não invasivo de imagem (SOKOL, DURIE, 1999).

Estes estudos podem determinar a presença de litíase biliar, ascite ou dilatação das veias hepáticas. Ultrasonografia com Doppler pode detectar padrões do fluxo hepático, o que é útil na avaliação da hipertensão portal. Outras técnicas de imagens, tais como tomografia computadorizada e ressonância magnética, que são úteis em algumas definições, não têm sido amplamente validadas em estudos controlados, como método de rastreio. A cintilografia hepatobiliar é a melhor técnica para avaliar o fluxo biliar, bem como a função dos hepatócitos (SCREEVER, 2001). Existe uma necessidade de desenvolver melhores técnicas semiológicas, exames bioquímicos e marcadores de imagem da lesão hepática, de modo que as primeiras células epiteliais biliares lesadas possam ser detectadas. Essa detecção precoce pode permitir a prevenção da doença de forma mais significativa, permitindo intervenção terapêutica.

2.4.3.3 Glândulas sudoríparas

a) Patologia

A alteração funcional mais consistente na FC tem sido as concentrações elevadas de Cl^- , Na^+ e K^+ no suor. Esta anormalidade está presente ao nascimento e ao longo da vida do paciente. De forma interessante não há uma correlação morfológica com a anormalidade fisiológica na FC.

As glândulas sudoríparas na FC parecem ter morfologia macroscópica e microscópica normal, bem como seu número. Diferenças sutis na morfologia subcelular com significado fisiológico desconhecido têm sido observadas por microscopia eletrônica. Não se observam obstruções glandulares em outros órgãos afetados, devido à falta de secreção de muco presente nas glândulas écrinas. Em contraste, as glândulas sudoríparas apócrinas estão normalmente dilatadas e preenchidas com secreções retidas quando comparadas com as glândulas de indivíduos sem FC (SCREEVER, 2001).

b) Manifestações clínicas

As conseqüências clínicas da disfunção da glândula resultam da excessiva perda de água e eletrólitos. Com sudorese profusa, todos os pacientes podem desenvolver "sabor salgado" no suor e também apresentar cristais de sal em sua pele.

Estes períodos de perda de sal provocam tanto a liberação de aldosterona como retenção de sal pelos rins. Indivíduos com FC também são propensos a prostração aguda com calor excessivo ao exercício. Devido ao fato das crianças terem um aumento da superfície corporal em relação ao volume, elas podem ser mais suscetíveis.

A prostração pelo calor deve ser considerada como emergência, pois pode levar ao rápido colapso cardiovascular. Pode ser evitada por meio de informação correta aos pacientes e familiares sobre a hidratação adequada e ingestão de sal durante os períodos de exercício ou estresse térmico.

Outra manifestação de perda crônica de sal apresenta-se como alcalose hipoclorêmica em lactentes com FC. As crianças muitas vezes têm história de vômitos, letargia, perda de peso e diarréia. Estes sintomas podem ser a apresentação inicial da FC em crianças sem diagnóstico.

Em 1998, 5,3% dos pacientes recém-diagnosticados com FC manifestaram anormalidade nos eletrólitos secundária à perda de sal de acordo com dados registrados pela fundação norte americana *Cystic Fibrosis Foundation*, por meio do registro de pacientes.

Suplementação oral de sal é eficaz na correção da anormalidade metabólica e a reposição intravenosa é raramente indicada.

c) Aparelho geniturinário

- Homens

Cerca de 97% dos indivíduos do sexo masculino com fibrose cística são inférteis devido a azoospermia atribuída a ausência congênita bilateral dos vasos deferentes. As alterações patológicas ocorrem exclusivamente nas estruturas do ducto Wolff ou mesonefrons, enquanto as estruturas metanefrons, tais como os rins e broto uretérico, são normais, sugerindo que o prejuízo para o desenvolvimento do sistema de ductos ocorre após a oitava a décima segunda semana de gestação (SCREEVER, 2001).

A anormalidade anatômica primária é a ausência, atrofia ou obstrução dos ductos deferentes, cauda e corpo do epidídimo (*globus menor*) e vesícula seminal. A cabeça do epidídimo (*globus principais*), que consiste na rede testicular e ductos eferentes, é poupado na maioria dos casos. Estas alterações anatômicas explicam a ausência de espermatozóides no sêmen ejaculado, apesar da espermatogênese normal. A próstata é geralmente normal. As vesículas seminais estão ausentes ou atroficas e fibróticas, freqüentemente associadas à cistos cheios de muco. Macroscopicamente, os testículos podem ser normais ou levemente diminuídos de tamanho.

Outras manifestações que podem ocorrer mais frequentemente em homens com FC são hérnia inguinal, hidrocele ou criptorquidia. É uma condição observada em recém-nascidos do sexo masculino, quando um ou ambos testículos não são conduzidos para o saco escrotal. Trinta por cento dos casos são bilaterais. Criptorquidismo é mais comumente visto em prematuros, porque os testículos não descem do abdome para o saco escrotal até o sétimo mês de desenvolvimento fetal.

O exame físico dos testículos é normal. No entanto, o crescimento dos testículos ou outros caracteres de desenvolvimento puberal apresentam frequentemente um atraso em 2 a 4 anos com defasagem do hormônio luteinizante e folículo estimulante. Este atraso pode refletir no estado pulmonar e desnutrição uma vez que o defeito é primário.

Na pós-puberdade, no sexo masculino, a função sexual é a menos prejudicada pelo estado geral de saúde.

Aos homens nesta fase deve ser dada a possibilidade de investigação para avaliar a fertilidade do sêmen. Na maioria dos casos, o volume do ejaculado é reduzido com ausência completa de espermatozóides e alteração da composição química, incluindo a diminuição de frutose e ácido cítrico e aumento da fosfatase ácida.

A infertilidade pode ser uma apresentação inicial de pacientes do sexo masculino com uma doença transitória. Assim, a FC deve ser considerada no diagnóstico diferencial de qualquer indivíduo do sexo masculino que apresente azoospermia obstrutiva (SCREEVER, 2001).

- Mulheres

A mulher com FC também tem fertilidade reduzida, embora o fenômeno não tenha sido exaustivamente estudado. Os ovários e trompas de Falópio parecem normais ao exame anatômico e microscopia. Há a hipótese de que a redução da fertilidade é atribuída ao muco espesso desidratado no colo do útero durante a ovulação.

Outro fato contribuidor e que pode reduzir a fertilidade são a amenorréia primária e secundária e ciclos anovulatórios, que podem estar relacionadas, de uma forma geral, com a condição pulmonar e nutricional (SCREEVER, 2001).

À medida que mais mulheres com FC chegam à idade reprodutiva, aumenta a freqüência de concepção e gravidez bem sucedidas.

Insuficiência nutricional e *cor pulmonale* antes da gravidez estão associadas com a ocorrência freqüente de prematuridade fetal e baixo peso ao nascimento.

A gravidez também pode causar impacto negativo na saúde e sobrevivência das mulheres com doença pulmonar grave, embora a maioria dos relatos publicados falha em apresentar uma população controle de mulheres não grávidas para

determinar se a gravidez em si ou a história natural da doença é o principal fator de contribuição (KNOWLES, 1983).

d) Osteoporose

A osteoporose e suas sequelas, como fraturas e cifose, tornaram-se uma importante causa de dor e deficiência na vida adulta.

A osteoporose é definida como baixa densidade óssea e fragilidade óssea à fraturas. A osteoporose na FC é bem documentada em adultos. Crianças podem demonstrar baixa densidade mineral óssea na primeira década de vida, que piora com o aumento da idade (HENDERSON, 1996).

Essa baixa densidade óssea é medida por (DEXA) *Dual-emission X-ray absorptiometry* radioabsorciometria de feixes duplos, que é um método de avaliação nutricional que serve para analisar a composição corpórea. A quantidade de massa magra ou gorda do organismo é medida pelo densitômetro, que traduz para porcentagens as imagens obtidas por um tipo especial de raio-x dos diferentes compartimentos do corpo: tecido ósseo, muscular, de gordura e fluidos. Mas é um método cuja acurácia até hoje era considerada limitada para avaliação de pessoas muito magras (em que a proporção de ossos é maior em relação à de tecidos moles), com desnutrição crônica ou em uso de nutrição parenteral (NP) prolongada. No entanto, gastroenterologistas dinamarqueses demonstraram experimentalmente que mesmo o baixo peso não compromete a precisão do método (SCREEVER, 2001).

Vários estudos, que medem a densidade óssea da coluna lombar por DEXA em pacientes com idades de 2 anos para a idade adulta, demonstraram sérias diminuições na densidade óssea média de 1 a 2,5 desvios-padrão abaixo da faixa normal, mesmo após a correção para o tamanho menor do osso destes doentes comparados com controles pareados por idade.

Existem vários fatores de risco que contribuem para perda mineral óssea e osteoporose em FC. Estes fatores incluem insuficiência pancreática e malabsorção, estado nutricional pobre, redução da absorção gastrointestinal do cálcio e vitamina D, redução de exercício físico, atraso e diminuição da produção de esteróides sexuais (por exemplo, estrógeno e andrógenos), uso freqüente de corticóide e

inflamação crônica das vias aéreas, levando a citocinas que circulam ativando os osteoclastos (por exemplo, fator de necrose tumoral e interleucina-1 β). Osteoclastos são células que reabsorvem tecido ósseo antigo. Assim, a osteoporose na FC é provavelmente uma combinação de ambas: diminuição da formação óssea e aumento da reabsorção, que pode explicar o seu aparecimento em tão tenra idade (ARIS, ONTJES, 1998).

As seqüelas clínicas da osteoporose, aumento do risco de fratura e cifose, foram documentadas em adultos e crianças. Estes sintomas são bastante freqüentes em pacientes com envolvimento pulmonar grave que aguardam transplante de pulmão (SCREEVER, 2001).

Estes achados são de especial interesse no contexto do transplante de órgãos, sempre que o uso crônico de corticosteróides e outros agentes imunossupressivos pós-transplante estão associados com perda óssea acelerada em alguns pacientes.

Em uma parcela de pacientes com FC deve ser considerado o risco de perda mineral óssea e estes devem ser cuidadosamente monitorados com relação ao estado nutricional global e adequada ingestão de cálcio e vitamina D.

As crianças devem ser monitoradas em relação ao crescimento linear e os adolescentes para o crescimento puberal.

Pacientes de alto risco incluem os indivíduos com baixa estatura, estado nutricional pobre, puberdade atrasada, doença pulmonar grave e uso freqüente ou contínuo de corticosteróides.

Nestes indivíduos, a investigação diagnóstica deve incluir níveis de vitamina D (25 OH-D), hormônio paratireóide e níveis de esteróides sexuais em jovens e adultos, DEXA varredura e, em casos graves, o levantamento de fraturas ósseas.

Em curto prazo, terapia antiinflamatória e terapia sintomática aliviam, mas não alteram a duração da artropatia, que eventualmente se resolve espontaneamente.

2.4.4 Manifestações Nutricionais

As manifestações nutricionais e metabólicas mais freqüentes estão representadas no quadro 2. Outras manifestações incluem atraso puberal, azoospermia, baqueteamento digital, hérnia inguinal, osteopatia hipertrófica, suor

salgado e vasculite, que são conseqüências do defeito básico, secundários à sua evolução ou às complicações da doença e, até mesmo, do tratamento.

QUADRO 2 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA FC

PULMONARES	Asma, síndrome do lactente chiador, DPCO, AIDS, tuberculose, pneumopatias crônicas de etiologia não definida, pneumonias recidivantes, bronquite crônica não atópica, bronquiectasia, atelectasia, bronquiolite obliterante.
DIGESTIVAS	Síndromes de má absorção, prolapso retal, íleo meconial, edema, icterícia prolongada no período neonatal, doença do refluxo gastroesofágico.
NUTRICIONAIS	Baixo ganho pondero-estatural, desnutrição, baixa estatura.
OUTROS	Infertilidade

FONTE: RIBEIRO (2002)

2.5CFTR

A FC é conseqüência da mutação de um gene que codifica uma proteína (CFTR) que pertence ao grupo de proteínas transportadoras e cuja principal função é atuar como canal de cloro. Localiza-se no pólo apical das células e participa do transporte iônico regulando, portanto, o fluxo de água transmembrana. Outras funções incluem:

- Ação no canal intracelular de cloro intervindo na acidificação de endossomas. Sua alteração produz disfunção das sialoproteínas que fazem parte do muco.
- Regulação do tráfego intracelular de vesículas (endo e exocitose).

A presença de dois alelos com mutações no gene da FC provoca ausência de atividade ou funcionamento parcial da proteína CFTR. A disfunção acarreta em redução na excreção do cloro e aumento da eletronegatividade intracelular, resultando em maior fluxo de Na^+ para preservar o equilíbrio eletrolítico e secundariamente, de água para a célula por ação osmótica.

Ocorre então, desidratação das secreções mucosas e aumento da viscosidade, tornando-as mais espessas, favorecendo a obstrução dos ductos, que se acompanha de reação inflamatória e posterior processo de fibrose (RIBEIRO, 2002). Este processo está esquematizado na figura 4.

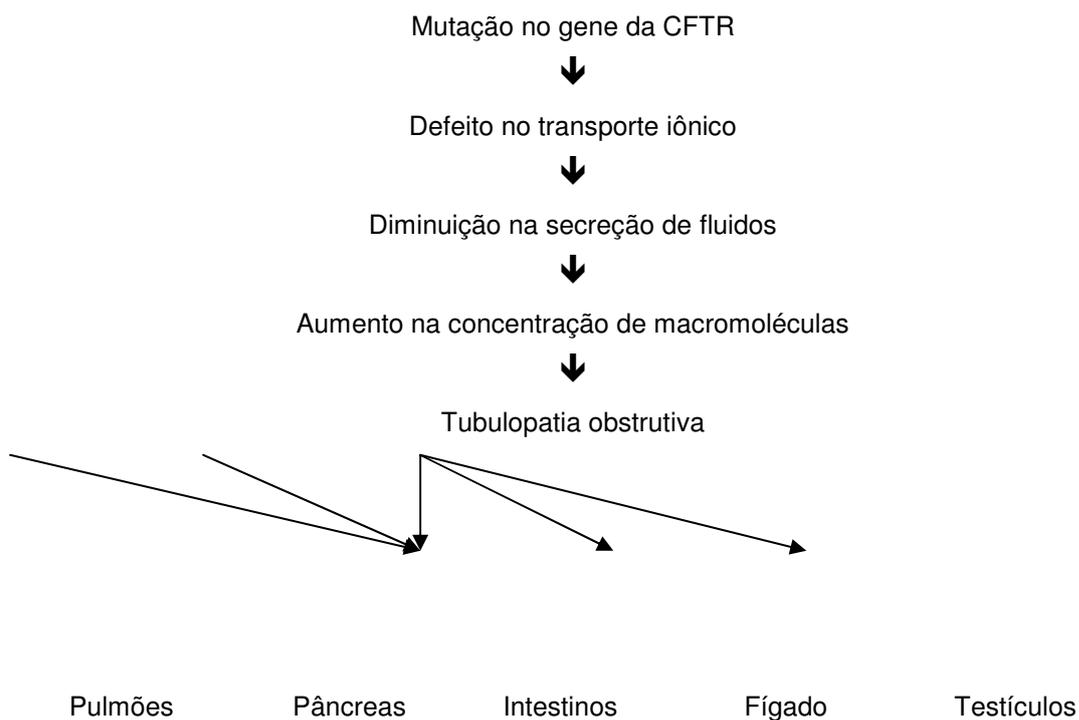


FIGURA 4 – FISIOPATOLOGIA DA FC

FONTE: RIBEIRO (2002)

O transporte anormal de Cl^- nas células das glândulas sudoríparas e sua manifestação possibilitam o diagnóstico da FC.

A obstrução dos vasos deferentes traz como conseqüência a infertilidade masculina. Já a obstrução dos ductos pancreáticos, a ativação de proenzimas e conseqüente insuficiência pancreática pela autodigestão, podem acarretar, com o tempo, *Diabetes Mellitus*.

No pulmão há obstrução bronquial, com infecção crônica posterior, bronquiectasias e finalmente insuficiência respiratória.

No fígado a obstrução dos canalículos biliares pode conduzir à cirrose biliar focal, patognomônica da enfermidade (SÁNCHEZ-SOLIS, 1999).

2.5.1 Mutações no Gene CFTR

Mais de mil variações na seqüência do gene CFTR foram reportadas pelo FC *Genetic Analysis Consortium* (CFGAC) de dados a partir de setembro 1999. A nomenclatura para as mutações do CFTR seguem uma convenção padrão.

Na tabela 1 estão listadas as 22 mutações mais comuns na FC.

A mutação mais freqüente é a Delta F 508 encontrada em 47% dos pacientes com fibrose cística no Paraná e classificada como grau II (RASKIN, 2001), conforme apresentado na tabela 2.

Cerca de 83% das alterações na seqüência do gene CFTR estão associadas com a doença, enquanto as restantes são classificadas como polimorfismos. A grande maioria das doenças resultantes de mutações associadas envolve alteração de um ou poucos nucleotídeos. Somente 1% são rearranjos genômicos maiores, como as deleções ou inserções que afetam centenas ou milhares de pares de base.

Substituições de aminoácidos (*missense* ou sentido contrário) respondem a 44% das doenças de mutações associadas, enquanto *frameshift* (com mudança da matriz de leitura)(22%), *splice site* (no sítio de processamento) (16%), *nonsense* (sem sentido)(14%) e deleções *in-frame* (sem mudança da matriz de leitura)(2%) incluem a maior parte das mutações restantes.

Cerca de 1% das mutações são propostas como mutações promotoras, uma vez que elas ocorrem na região 5 'do gene CFTR.

Realmente, há uma falta de correlação funcional para uma grande fração da doença associada às mutações; a maioria tem sido descrita apenas no nível do DNA.

Por último, a maioria dos relatos não indica se todo um gene foi seqüenciado, e se foi identificada uma única variação na seqüência. Apesar destas deficiências, a lista de mutações na base de dados do CFGAC oferece um manancial de informação para a investigação da estrutura e função, correlação genótipo e fenótipo, e epidemiologia genética.

TABELA 1 - MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES DA FC

Mutação	% DE ALELOS DA FC		
	Mundial (n=43.849)	EUA (n=25.030)	Europa (n=27.177)
G85E	0,15	0,17	0,21
R117H*	0,30	0,67	0,29
621 \pm 1G -->T	0,72	0,90	0,54
711 \pm 1G -->T	0,11	< 0,1	0,11
1078del T	0,13	< 0,1	0,13
R334W	0,12	0,22	0,16
R347P	0,24	0,24	0,20
A455E*	0,14	0,12	0,20
Δ I507	0,21	0,31	0,23
Δ F508	66,0	68,8	66,8
1717-1G -->T	0,65	0,28	0,83
G542X	2,42	2,43	2,64
G551D	1,64	2,12	1,50

R553X	0,73	0,90	0,75
R560T	0,15	0,19	1,18
1898 \pm 1G \rightarrow A	0,12	< 0,1	0,22
2789 \pm 5G \rightarrow A*	0,12	0,31	0,11
R1162X	0,29	0,22	0,51
3569delC	0,12	0,17	0,14
3849 \pm 10 kbC \rightarrow T*	0,24	0,67	0,15
W1282X	1,22	1,41	1,0
N1303K	1,34	1,25	1,64
TOTAL	77,16	81,48	78,54

NOTA: O asterisco indica a mutação que pode estar associada com valor normal ou limítrofe de CI no suor.

FONTE: SCREEVER, 2001

TABELA 2 - FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES CFTR DETECTADAS EM INDIVÍDUOS AFETADOS, POR GRUPO CONTINENTAL E ESTADO DE NASCIMENTO

MUTAÇÕES	EURO-BRASILEIROS								AFRO-BRASILEIROS		TOTAL		
	RS	SP	SC	PR	MG	Total ⁽¹⁾		SC, PR, MG ⁽²⁾		n	%		
	n	n	n	n	n	n	%	n	%				
DF508	52	57	53	39	54	255	48,7	146	47,1	8	10,5	263	43,8
G542X	3	11	6	9	8	37	7,16	23	7,4	1	1,3	38	6,3
R1162X	NT	NT	9	2	4	15	4,8	2	2,6	17	4,4
N1303K	4	0	5	5	0	14	2,7	10	3,2	0	0	14	2,6
R334W	NT	NT	5	1	4	10	3,2	0	0	10	1,7
G85E	NT	NT	2	2	4	8	2,6	1	1,3	9	2,3
1717-1G \rightarrow A	NT	NT	1	3	2	6	1,9	0	0	6	1,6
W1282X	NT	NT	4	1	1	6	1,9	0	0	6	1,6
3849 \pm 10kbC \rightarrow T	NT	NT	1	3	1	5	1,6	0	0	5	1,3
R553X	0	2	0	2	0	4	0,8	2	0,7	0	0	4	0,7
1812-1G \rightarrow A	NT	NT	0	1	3	4	1,3	1	1,3	5	1,3
2183AA \rightarrow G	NT	NT	2	1	0	3	1,0	0	0	3	0,8
3120 \pm 1G \rightarrow A	NT	NT	0	0	2	2	0,7	2	2,6	4	1,0
Y1092X	NT	NT	0	1	1	2	0,7	1	1,3	3	0,8
G551D	0	1	0	0	0	1	0,2	0	0	0	0	1	0,2
W1089X	NT	NT	0	0	1	1	0,3	0	0	1	0,3
621 \pm 1G \rightarrow T	NT	NT	0	1	0	1	0,3	0	0	1	0,3
Q1238X	NT	NT	0	1	0	1	0,3	0	0	1	0,3
711-1G \rightarrow T	NT	NT	0	1	0	1	0,3	0	0	1	0,3
R347P	NT	NT	1	0	0	1	0,3	0	0	1	0,3
1898 \pm 1G \rightarrow A	NT	NT	1	0	0	1	0,3	0	0	1	0,3

S549R	NT	NT	1	0	0	1	0,3	0	0	1	0,3
I507	NT	NT	0	0	1	1	0,3	0	0	1	0,3
SUBTOTAL	59	71	91	73	86	311	59,4	250	80,7	16	21,1	397	
Mutações não- detectadas	47	37	5	27	28	213	40,7	60	19,4	60	79,0		
TOTAL GERAL	106	108	96	100	114	524	100,0	310	100,0	76	100,0	600	100,0
TAXA DE DETECÇÃO (%)													
5 mutações	50,9	65,7	66,7	55,0	54,4	59,4		58,4		13,2			
70 mutações	NT	NT	94,8	73,0	75,4	NT		80,7		21,1			

NOTA: NT - não-testadas

(1)- Frequências referentes apenas às 5 mutações assinaladas em negrito, testadas nos cinco Estados.

(2) - Frequências referentes às 23 mutações detectadas das 70 testadas nesses três Estados. As seguintes mutações foram testadas mas não detectadas nas amostras: A455E, A559T, C524X, D1270N, E60X, G178R, G330X, 2307insA, I148T, K710X, P574H, Q493X, Q890X, R1158X, R117H, R347H, R352Q, R560T, S1196X, S1255X, S364P, S549N e V520.

FONTE: RASKIM (2001)

2.5.2 Epidemiologia da Fibrose Cística

A FC tem sido tradicionalmente considerada como uma das mais comuns doenças hereditárias ameaçadoras à vida em caucasianos. Estudos epidemiológicos retrospectivos indicam que a frequência de FC na maioria dos europeus e populações derivadas de europeus varia entre 1 para 2000 e 1 em 4000 nascidos vivos.

As estimativas dos programas de triagem neonatal e de detecção de portadores na população apóiam estes números.

A maior incidência de FC tem sido relatada em alguns grupos, tais como os celtas que vivem na Bretanha, França (1 em 377), africanos que vivem no sudoeste da África (1 em 622), e franco-canadenses que vivem na região Sauguenay-Lac St. Jean (1 em 895) (SCREEVER, 2001).

A FC é menos freqüente em nativos da Ásia, populações africanas e americanas, embora os valores não sejam confiáveis (SCREEVER, 2001).

A FC também tem sido relatada em indivíduos libaneses, indianos, árabes, coreanos e chineses. Mutações deletérias no gene CFTR foram descobertas em todas as populações humanas.

As alterações no CFTR causadoras de doença apresentam-se em três categorias de frequência: a mutação comum ($\Delta F508$); mutações menos comuns e mutações raras.

A mutação $\Delta F508$ foi a primeira mutação identificada e representa cerca de 70% nas populações europeias de origem caucasiana.

A mutação é praticamente ausente em nativos Africanos e da Ásia, embora atinja uma apreciável frequência em grupos, com considerável miscigenação caucasiana, como afro-americanos.

A frequência da mutação $\Delta F508$ varia muito entre as populações europeias com um aparente aumento do gradiente da frequência do noroeste ao sudeste da Europa (30% na Turquia e Israel, 40 a 50% na Itália meridional, 70% na Europa central, de 85 a 88% na Dinamarca e partes das ilhas britânicas) (SCREEVER, 2001).

A alta frequência da mutação $\Delta F508$ indica que cerca de metade dos pacientes caucasianos com FC serão homocigotos para essa mutação.

Com efeito, na ausência da mutação $\Delta F508$, a FC seria um distúrbio genético relativamente raro na raça branca, e que ocorreria em uma frequência inferior à 1 em 10.000.

Tem sido sugerido que a elevada frequência de FC em caucasianos possa ser devido a uma vantagem da FC heterocigota. Para apoiar essa teoria da vantagem seletiva, foi demonstrado que camundongos transportando uma única mutação FC são mais resistentes à diarreia secretória causada pela infecção por cólera. Mas esta observação tem sido modificada, pois a cólera secretória e diarreia ocorrem em toda a população humana e, portanto, não está claro como este mecanismo permitiria aumentar a frequência de alelos da FC em apenas uma raça, mas não em outras.

Além disso, especulam que qualquer mutação que reduz a função CFTR poderia conferir resistência. Há também a observação de que entre as diferentes mutações, a W1282X é a mutação mais comum na população Ashkenazi. Outras vantagens, propostas nos heterocigotos, incluem maior fertilidade, taxas reduzidas de asma e resistência a uma variedade de doenças por agentes infecciosos. No entanto, cada proposta carece de provas de confirmação (ALBELIOVICH, CUTTING, 1992; SCREEVER, 2001).

Um mecanismo completamente diferente da seleção heterocigota foi sugerido pela observação de que não só a $\Delta F508$, mas um número de mutações menos comuns em caucasianos têm surgido sobre o mesmo pano de fundo cromossômico. Assim, alelos da FC podem ter sido selecionados com base em uma variação em

qualquer lugar perto do gene. Este fenômeno foi denominado de efeito *hitch-hiking* (carona) e tem sido sugerido como um mecanismo para a alta frequência de FC. Análise de haplótipos criados por marcadores de DNA do gene CFTR em jovens e idosos, a partir de uma população européia estável, revelou que mulheres com o mesmo haplótipo encontradas com a mutação comum, $\Delta F508$, e outros alelos da FC tinham uma maior taxa de sobrevivência. Estudos de outra população caucasiana estável sugeriram que uma seqüência perto do gene CFTR confere uma sobrevivência para as mulheres (KEREM, 1989).

Assim, a elevada frequência de FC e, em especial, a do número de mutações na população caucasiana permanece um mistério.

Atribui-se a Tsui, Riordan e Collins a identificação mais detalhada do pequeno fragmento onde o gene responsável pela FC está localizado no cromossomo 7. Os mesmos autores analisaram o seu produto de síntese, a proteína CFTR. Numa primeira fase, por meio de variados marcadores e graças à reação em cadeia potenciada pela Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), que permite – a partir de quantidades mínimas de material genético, reproduzir milhões de cópias de moléculas de DNA, foi possível constatar, conforme Tsui, que especificamente o gene da FC alcança uma extensão de aproximadamente 250 kilobases de DNA. Este segmento acha-se subdividido em muitas regiões codificadoras (exons), que em conjunto, regem a síntese de uma volumosa proteína constituída por uma seqüência linear de 1480 aminoácidos.

Esta proteína filamentar, conhecida como CFTR (*CF Transmembrane Conductance Regulator*), sintetizada segundo as codificações do respectivo gene da FC, é transportada do local de síntese (núcleo e/ou complexo de Golgi) para a membrana celular apical, direcionada através de retículo endoplasmático. Ancora-se na estrutura bilipídica da membrana em áreas hidrofílicas e hidrofóbicas afins, conforme ilustrado na figura 5.

O longo filamento da CFTR, numa adaptação conformacional, por aposição em alças, forma um verdadeiro canal.

Nessa disposição, transmembrana, esse canal direciona e regula os fluxos bidirecionais de água e cloro no sentido do ambiente intracelular para o extracelular e vice-versa. Entre os incontáveis canais iônicos, normalmente existentes na membrana, este é o chamado canal de cloro, ligado à CFTR e, cuja regulação

também bidirecional; sua abertura e fechamento são ativados por fosforilação e mediados pelo AMP-cíclico na presença de ATP.

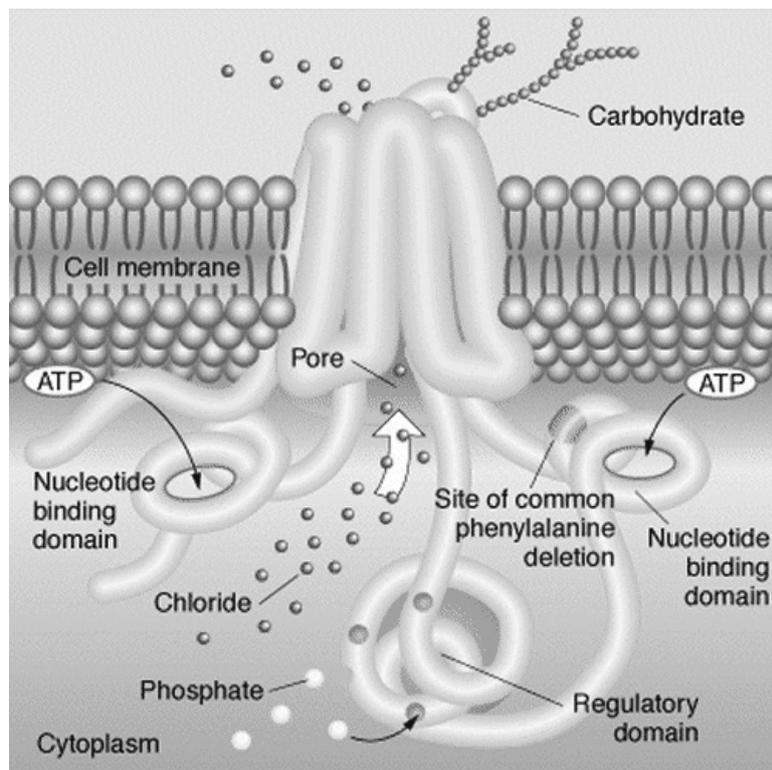


FIGURA 5 - CFTR – PROTEÍNA REGULADORA DA CONDUTÂNCIA IÔNICA TRANSMEMBRANA DA FIBROSE CÍSTICA

FONTE: <http://www.cfgenetherapy.org.uk/images/CFTRlarge.gif>

Quanto à secreção de suor na FC, Quinton constatou que a disfunção, ou seja, a falta da captação eficiente pelo canal de cloro, acompanhada por proporcional interferência no transporte de sódio, situa-se no bordo apical das

células epiteliais que recobrem os ductos finos das glândulas sudoríparas. A secreção fluída, serosa que partiu hipertônica da parte mais profunda da glândula, devido à falta da captação ativa do cloro, compromete a transferência facilitada do sódio ao passar pela área tubular; ao invés do suor tornar-se hipotônico, praticamente desionizado, levemente salino, acaba atingindo a superfície da pele com taxas iônicas elevadas. Este fato explica o fato dos indivíduos com FC apresentarem o suor salgado e serem frágeis à desidratação pelo calor e quando expostos ao sol (QUINTON, 1990).

Vale lembrar que a glândula sudorípara, em condições normais, controla a composição de sua secreção como o nefron utiliza ajustamentos, através de mecanismos bidirecionais, aliás, também registrados na dinâmica dos fluxos entéricos.

Quanto à secreção brônquica, do tipo mucoso, Knowles *et al.* demonstraram que, na FC, o transporte direcional do cloro, da membrana apical das células epiteliais para a superfície do lúmen, acha-se diminuído. Entretanto, a captação de sódio acha-se potenciada no sentido oposto. Haveria uma compensação direcional em sentido oposto, isto é, a condução de sódio e água para o interior da célula visando a eletroneutralidade (KNOWLES, 1983).

A redução da água do fluido periciliar ou peri-microvilositário das camadas de superfície conduziria ao espessamento do muco característico da FC.

Somente a mutação do gene da CFTR resulta na síntese de uma proteína com estrutura molecular anômala, responsável pela enfermidade, entretanto, a patogenicidade varia de acordo com a mutação. Em cerca de 1500 mutações, até agora descobertas, não mais de 6 ou 7 são aquelas que potenciam um comportamento clínico evidente e grave, e que predominam em certos grupos populacionais.

No norte da Europa e nos Estados Unidos 70% dos cromossomos com mutação no gene da FC correspondem à mutação $\Delta F508$, cujo defeito gênico depende da deleção de três nucleotídeos que acarretam a perda de um aminoácido, a fenilalanina, na posição 508 da estrutura protéica.

No momento, a triagem genética tem aplicação restrita às populações nas quais predomina a mutação $\Delta F508$. É possível que no Brasil essa mutação seja responsável por apenas uma parte do espectro total da doença, assim como ocorre no sul da Europa.

Um estudo genético de 81 crianças caucasianas brasileiras com FC revelou a ocorrência da mutação $\Delta F508$ em 49% dos indivíduos analisados. Destas 81 crianças, um total de 15 crianças foi identificado como homozigóticos, 48 como heterozigóticos e em 18 a mutação estava ausente (RASKIN, 1993).

O estudo de 20 crianças com FC, de um registro da Santa Casa de São Paulo, revelou a ocorrência da mutação $\Delta F508$ em 60% dos indivíduos analisados, sendo que 3 crianças (15%) eram homozigóticos, 10 (50%) heterozigóticos e 7 (35%) não apresentavam a mutação (MARTINS, 1993).

Outro estudo analisando 70 crianças na região de Campinas encontrou a presença da mutação $\Delta F508$ em 50% dos 140 alelos analisados (CORREIA, 2005).

Segundo Tsui a mutação $\Delta F508$ é uma das mais graves em termos da função pancreática (TSUI, 1991).

Os grandes esforços realizados em todo o mundo na busca de mutações que causam a FC, com cerca de 80 laboratórios em 1993, levaram à formação do *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium*, coordenado pelo Dr. Lap-Chee Tsui, em Toronto.

2.5.3 Diagnóstico Clínico

Até recentemente o diagnóstico de fibrose cística tem sido baseado em critérios clínicos pré estabelecidos e rigorosa análise dos níveis do Cl^- no suor.

A disponibilidade, na última década, da análise mutacional, envolvendo o locus do gene FC e avaliação da propriedade bioelétrica dos epitélios respiratórios através da medida da diferença do potencial elétrico transepitelial nasal, têm alargado o espectro clínico da FC para incluir indivíduos com apresentações fenotípicas menos graves. Para abordar a evolução do diagnóstico dessa doença genética, um grupo de especialistas clínicos e genéticos em 1997 definiu em consenso que para o diagnóstico de FC deve-se incluir a presença de uma ou mais características fenotípicas (Quadro 4), uma história de FC em um irmão ou um resultado positivo na triagem neonatal, além de evidência laboratorial de uma anormalidade no CFTR documentada pela elevação da concentração de cloro no suor, ou identificação de mutações no gene CFTR conhecidas por causar FC (em ambos os alelos), ou demonstração *in vivo* de anormalidades no transporte do íon

em todo o epitélio nasal. A maioria dos pacientes ainda é diagnosticada devido à presença de características clínicas (Quadro 3).

A constelação dos sintomas clássicos inclui doenças crônicas supurativas sinopulmonares e insuficiência pancreática. A apresentação clínica mais comum no momento do diagnóstico inclui sintomas respiratórios persistentes (51,2%), falha de crescimento (43,0%), esteatorréia (35,1%) e íleo meconial (18,6%).

Existem vários contextos em que o diagnóstico da FC pode ser determinado agora, na ausência de características clínicas.

QUADRO 3 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS COMPATÍVEIS COM O DIAGNÓSTICO DA FC

1. *Doença sinopulmonar crônica manifestada por:*
 - a. *Colonização e infecção persistente com típicos patógenos da FC incluindo Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, mucóide e não mucóide, Pseudomonas aeruginosa, e Burkholderia cepacia*
 - b. *Tosse crônica com expectoração*
 - c. *Persistentes anormalidades na radiografia torácica (por exemplo, bronquiectasia, atelectasia, infiltrados, hiperinsuflação)*
 - d. *Obstrução respiratória manifestada por chiado e aprisionamento aéreo*
 - e. *Pólipos nasais; anormalidades radiográficas ou na tomografia computadorizada dos seios paranasais*
 - f. *Baqueteamento digital*
2. *Anormalidades gastrointestinais e nutricionais incluindo:*
 - a. *Intestinal: íleo meconial, Síndrome da obstrução intestinal distal, prolapso retal*
 - b. *Pancreático: Insuficiência pancreática, pancreatite recorrente*
 - c. *Hepática: doença hepática crônica manifestada pela evidência clínica ou histológica de cirrose biliar ou cirrose multilobular*
 - d. *Nutricional: falha de crescimento (desnutrição protéico-calórica), hipoproteinemia e edema, complicações secundárias à deficiência de*

vitaminas lipossolúveis

3. *Síndrome da perda de sal: Depleção aguda de sal, alcalose metabólica crônica.*
4. *Anormalidades Urogenitais masculinas, resultando em azoospermia obstrutiva.*

FONTE: SCREEVER (2001)

O rastreio de tais indivíduos com a análise mutacional (se ambas as mutações são identificadas no indivíduo afetado) ou o teste do suor é adequado na ausência de sintomas clínicos.

O diagnóstico intra-útero, baseado em evidências para duas mutações da FC, tornou-se cada vez mais comum e é responsável por 1% dos novos diagnósticos nos Estados Unidos desde 1997.

O teste do suor continua a ser o teste confirmatório mais amplamente utilizado na FC, e a concentração do Cl^- no suor diagnostica com uma precisão superior a 90% dos casos (SCREEVER, 2001).

As orientações para a realização adequada do teste de suor por meio de iontoforese por pilocarpina foram publicados pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (Comitê Nacional de Padronização em Laboratório Clínico dos EUA) (NCCLS, 2000).

O teste envolve coleta de suor pela iontoforese com pilocarpina com determinação química da concentração de Cl^- . Um volume mínimo aceitável (10 μl no sistema de serpentina microtubo Wescor®) ou o peso do suor (75 mg) deve ser recolhido durante um período de 30 minutos para assegurar uma taxa de suor de, pelo menos, 1 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{min}$. O nível de Cl^- superior à 60 mMol em duas determinações distintas é considerado diagnóstico. Nível superior a 160 mmol/l não é fisiologicamente possível e deve ser considerado um erro técnico. A medida da concentração de Na^+ não fornece informações complementares de diagnóstico.

2.5.4 Diagnóstico Precoce

A maioria dos indivíduos com FC só são diagnosticados após o surgimento dos sintomas. Estes sintomas são frequentemente acompanhados de condições que não podem ser reversíveis, incluindo a deficiência do crescimento e infecção respiratória crônica. Além disso, muitas vezes o diagnóstico é tardio.

Relatos da Fundação de Fibrose Cística nos EUA registram a mediana de idade superior a um ano. Um quarto de todos os pacientes é identificado após três anos de idade. Vários problemas estão associados com o atraso no diagnóstico. Os pacientes podem ter tratados dos sintomas por meses ou durante anos, antes de serem diagnosticados. Os pais são freqüentemente sobrecarregados com rotinas que conduzem a frequentes contatos e muitas hospitalizações.

A triagem neonatal também possui benefícios potenciais para o diagnóstico precoce que incluem: prevenção de complicações da doença, relacionadas ao diagnóstico tardio, ou aquele realizado na fase sintomática da doença, redução da ansiedade familiar antes do diagnóstico ser feito e uma maior possibilidade de planejamento familiar.

Antes da triagem neonatal o diagnóstico precoce da FC era considerado como política de saúde pública, porém importantes questões éticas devem ser abordadas. A pergunta mais importante é saber se o diagnóstico precoce por meio dos resultados de triagem neonatal tem um benefício direto para os indivíduos com FC.

A maioria dos programas de rastreio neonatal da FC começam com a determinação da tripsina imunorreativa ou tripsinogênio imunorreativo (IRT), um marcador para presumir a disfunção pancreática, realizado no sangue seco coletado por punção do calcanhar poucos dias após o nascimento (WILCKEN, 1993).

Em geral as crianças com FC têm elevações do IRT (hipertripsinogenemia) quando comparado aos lactentes normais. Embora a fisiopatologia da hipertripsinogenemia não seja totalmente compreendida, pensa-se que os ácinos pancreáticos em lactentes com FC são capazes de produzir IRT, mas os ductulos estão bloqueados levando à fuga para a circulação.

Com o aumento da idade dos indivíduos com FC, o IRT diminui e muitas vezes está abaixo do valor normal indicando que os ácinos pancreáticos não estão funcionando o suficiente para produção das enzimas. Assim, a IRT é útil na seleção para a FC apenas na infância.

A simples elevação da IRT logo após o nascimento não é específica para a FC, uma vez que muitos bebês normais irão apresentar elevações transitórias.

Crianças com elevação persistente de IRT, nos programas de detecção precoce, são submetidas a uma segunda determinação da IRT em poucas semanas de idade para aumentar a especificidade.

O teste do suor foi então introduzido para estabelecer o diagnóstico da FC. Um número de programas de triagem neonatal demonstrou que pela medida de dois níveis de IRT, ou seja, duas determinações distintas (IRT/IRT) complementadas pelo teste do suor a sensibilidade aumenta em 95% na população-alvo (WILCKEN, 1993).

A abordagem IRT/IRT identifica indivíduos lactentes com ou sem suficiência pancreática. Também se tornou evidente que nos programas de rastreio o teste de suor é facilmente realizado, na grande maioria das crianças, após um prazo de uma semana de idade, ao contrário do que se conceituava que os testes de suor não poderiam ser realizados até pelo menos vários meses de idade (FARRELL, 1996).

Existem duas grandes dificuldades com a abordagem IRT/IRT. A elevada taxa de falsos positivos na primeira amostra e a ansiedade em um grande número de pais de crianças que não vão confirmar o diagnóstico de FC.

A incorporação da análise de mutação na triagem em recém nascidos para FC lida com os dois principais problemas da abordagem IRT/IRT e, por conseguinte, é utilizada pela maioria dos programas de triagem. Com esta abordagem, os pacientes são identificados por meio de IRT elevados e têm a análise da mutação realizada sobre o mesmo sangue no papel filtro (abordagem IRT/DNA).

Se a criança for encontrada transportando duas mutações da FC então o diagnóstico é feito e apoiado por um teste suor. Se a criança apresenta apenas uma mutação da FC então o teste do suor é necessário para diagnóstico. Se não forem detectadas mutações, presume-se que a criança não tenha a FC.

A sensibilidade desta abordagem depende da frequência de mutações em uma dada população e do número de mutações testadas. Em populações onde a incidência da mutação $\Delta F508$ é maior que 70% dos alelos, uma sensibilidade acima de 90% pode ser obtida pela pesquisa apenas desta mutação isolada.

Vários programas têm incrementado a pesquisa incluindo outras mutações. Existem dois problemas com essa abordagem. Um dos problemas é a taxa de falsos negativos que obrigatoriamente surgem a partir da limitação do número de mutações testadas. O segundo problema é que os portadores das mutações da FC freqüentemente demonstram hipertripsinemia.

A abordagem IRT/DNA detecta portadores em aproximadamente três vezes mais que a taxa de detecção de crianças com FC, aumentando a necessidade do aconselhamento genético nos programas de triagem.

A maioria dos programas com a abordagem IRT/DNA vê como efeito indesejado a detecção de portadores.

Tem havido uma preocupação de que a triagem neonatal acarretaria risco de dano psicológico às famílias de crianças que são falsos positivos ou pré-sintomáticas para FC, mas o peso dessas provas atualmente é que o rastreamento não causa efeitos psicológicos indevidos com danos às famílias (BARONI, 1997).

2.5.5 Curso Clínico de Crianças com FC Identificados Pela Triagem Neonatal

O seguimento das crianças identificadas pela triagem neonatal tem fornecido informações importantes sobre a história natural da FC, bem como suposições precoces sobre a fisiopatologia. A maior parte das crianças tem sintomas gastrointestinais ao diagnóstico (GIGLIO, 1997).

Um crescimento reduzido pode ser observado aos dois meses de idade. Sessenta por cento dos bebês têm significativa má absorção de gordura para a idade o que sugere que o grau do início da malabsorção está relacionado com o crescimento reduzido (BRONSTEIN, 1992).

Uma variedade de marcadores bioquímicos de desnutrição encontra-se anormalmente baixa aos dois meses de idade em cerca de um terço das crianças. Eles incluem vitaminas lipossolúveis, o K^+ corporal total, ácidolinoléico, albumina, pré-albumina e traços de elementos. Isto posto, não é surpreendente que as crianças com FC diagnosticadas convencionalmente possam ter grave deficiência vitamínica ou de proteína e desnutrição calórica levando a edema e hipoproteinemia (SCREEVER, 2001). Além disso, as alterações nutricionais em crianças com FC identificadas por meio de triagem neonatal freqüentemente têm evidências de acentuada inflamação das vias aéreas, sugerindo que a infecção e a doença pulmonar em lactentes é semelhante à de adultos e crianças mais velhas. Conjuntamente, o aparecimento precoce destas anormalidades sugere fortemente a necessidade de intervenção terapêutica precoce.

2.5.6 Efeitos em Longo Prazo da Primeira Infância – Resultados nos Bebês Recém, Identificados nos Programas de Triagem Neonatal

Vários estudos observacionais têm sugerido uma melhora no crescimento e na função pulmonar e diminuição da morbidade em crianças identificadas por meio da triagem neonatal.

No entanto, as provas mais convincentes desses benefícios do diagnóstico precoce vieram a partir do estudo em Wisconsin (FARRELL, 1997). Neste estudo, crianças nascidas em Wisconsin foram triadas ao longo de um período de dez anos, mas somente a metade das famílias foi informada do diagnóstico logo após o nascimento. A outra metade das famílias foi informada em quatro anos, isso se a criança não tivesse sido diagnosticada clinicamente antes dessa idade.

Este estudo mostrou claramente que o crescimento foi melhorado, pelo menos em dez anos de idade por meio do diagnóstico precoce. Dada a extensão do início da malabsorção, não foi de se estranhar que os primeiros tratamentos com enzimas pancreáticas e acompanhamento do crescimento, como executado no estudo de Wisconsin, levaria a um melhor resultado.

2.5.7 Controvérsias Atuais na Triagem de Recém-Nascidos Para FC

Um recente seminário do CDC (*Center for Disease Control*), nos EUA, passou em revista o estado atual da triagem neonatal para FC no que diz respeito ao laboratório e questões médicas.

Este seminário chegou à conclusão de que a demonstração do aumento do crescimento não foi suficiente para recomendar a triagem neonatal como uma política de saúde pública. Mais provas foram necessárias no que se refere à função pulmonar ou ao resultado do neurodesenvolvimento antes da autenticação da triagem. O resultado neurológico é importante porque, pelo menos dois estudos demonstraram diminuição da circunferência craniana em algumas crianças com FC que podiam estar relacionadas com um crescimento precoce prejudicado (CHENG, 1991; GHOSAL, 1996).

É geralmente reconhecida que a melhora no tratamento pulmonar pode conduzir à sedimentação da triagem neonatal e diagnóstico precoce. Se for

verificado que a colonização por *Pseudomonas aeruginosa* pode atrasar o desenvolvimento da doença pulmonar, então é provável que o rastreio seja mais amplamente adotado.

2.5.8 Função do CFTR no epitélio e patogênese da doença

Os órgãos e tecidos clinicamente envolvidos na FC são todos compostos de epitélio. Nestes epitélios, o transporte defeituoso de eletrólito, particularmente o transporte defeituoso do Cl^- , é a característica que o distingue dos epitélios em indivíduos sem FC. Nesta secção as atuais hipóteses da patogênese e fisiologia dos órgãos afetados serão discutidas com maior enfoque nas glândulas sudoríparas, que é o foco do trabalho.

2.5.8.1 Glândula sudorípara

As anormalidades no transporte de eletrólitos pelas glândulas sudoríparas fornecem o mais útil teste clínico para a FC. Estudos de transporte de íons pelas glândulas sudoríparas foram também os primeiros a envolver transporte anormal de Cl^- nos epitélios da FC tornando-se base para a primeira hipótese unificadora sobre o defeito na FC.

A glândula sudorípara é composta de duas regiões diferentes, a bobina secretora e o ducto de reabsorção (Figura 6).

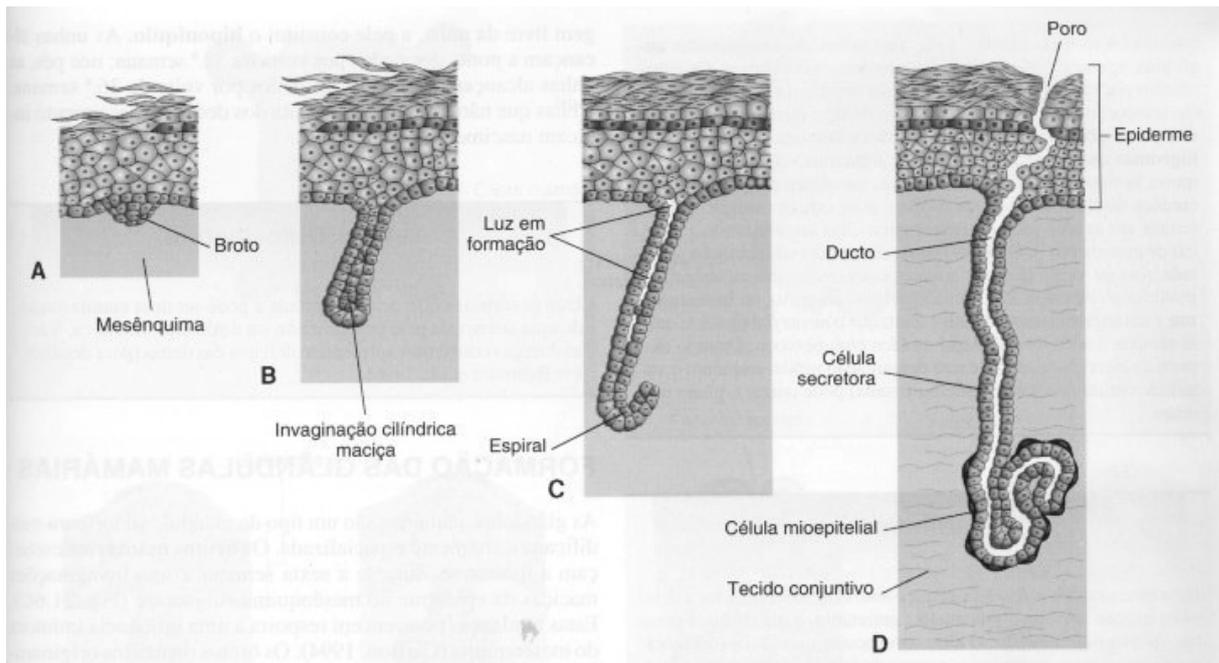


FIGURA 6 – EMBRIOLOGIA DA GLÂNDULA SUDORÍPARA

FONTE: www.forp.usp.br/mef/embriologia/pele_anexos.htm

A bobina secretória produz NaCl isotônico. Então, como o suor passa através dos ductos impermeáveis à água, o NaCl é absorvido, deixando um líquido com uma baixa concentração de NaCl a emergir na superfície da pele.

a) Ducto das Glândulas Sudoríparas

A observação clínica de que as concentrações de Cl^- e Na^+ estão aumentadas no suor na FC levou Quinton *et al.* a examinarem as propriedades do transporte dos íons nos ductos do suor (QUINTON, 1990; QUINTON, 1999).

Eles encontraram que os ductos na FC, tanto *in vivo* e como *in vitro* tinham uma maior tensão transepitelial do que os ductos normais. Uma vez isolados, o perfusado dos ductos normais geravam uma tensão de cerca de -7 mV, enquanto os ductos da FC têm uma tensão de cerca de -75 mV (lúmen voltagem que diz respeito à superfície intersticial).

Quando a concentração do Cl^- luminal (ou NaCl) é reduzida nos ductos normais, a tensão (voltagem) luminal torna-se mais negativa, indicando que o transporte de Cl^- é eletricamente condutor.

Em contraste na FC, quando Cl^- luminal está reduzido nos ductos, a tensão transepitelial torna-se mais positiva. Estes resultados indicam que o ducto de suor na FC é impermeável ao Cl^- e sugere que o aumento da tensão transepitelial resulta do mecanismo de absorção de Na^+ na ausência da permeabilidade do Cl^- .

Estudos posteriores confirmaram e ampliaram este trabalho. A absorção do Na^+ nos ductos do suor ocorre pela entrada de Na^+ na célula através da membrana apical, impulsionado por um gradiente eletroquímico favorável (Figuras 7 e 8).

Em seguida o Na^+ sai todo da membrana basolateral e é trocado por K^+ sob a atuação da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ adenosina-trifosfatase (ATPase). O K^+ que entra na célula é predominantemente reciclado via canal de H^+ na membrana basolateral. Estes processos são os mesmos tanto na FC como em condições normais.

O transporte Na^+ estabiliza a concentração do íon e o gradiente de tensão conduz a absorção passiva do Cl^- .

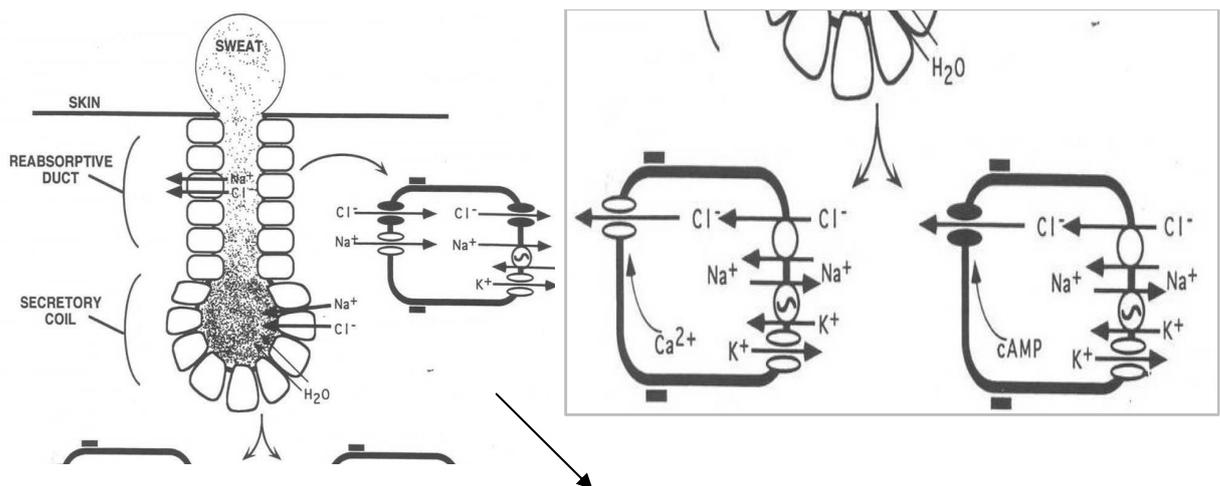


FIGURA 7 - MECANISMO DE TRANSPORTE IÔNICO NA GLÂNDULA SUDORÍPARA
 NOTA: Representação esquemática da produção de suor e do transporte de eletrólitos pela glândula sudorípára. A reabsorção nos ductos e a bobina secretória estão indicadas. Inserções

mostram o mecanismo celular de transporte de eletrólitos pelos ductos e a bobina nas células epiteliais. Observa-se que a secreção de Ca_2^+ e Cl^- dependente de cAMP parece ocorrer nos dois tipos diferentes de células na bobina secretória. O Canal CFTR de Cl^- está indicado em símbolo fechado, enquanto que outros canais, transportadores e bombas estão indicadas em símbolos abertos.

FONTE: SCREEVER (2001)

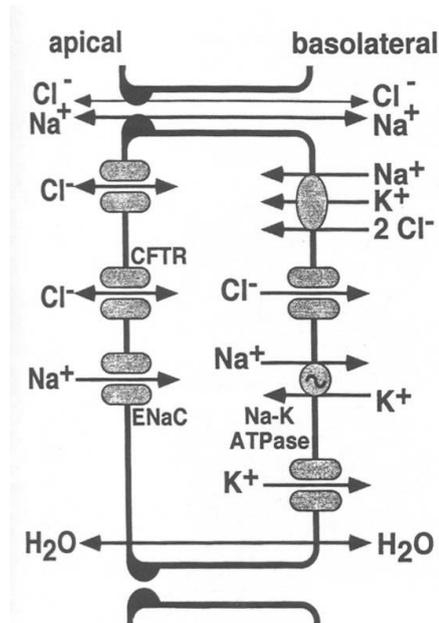


FIGURA 8 - MODELO DE TRANSPORTE DE ELETRÓLITOS NO EPITÉLIO DAS VIAS RESPIRATÓRIAS

FONTE: SCREEVER (2001)

Nos ductos normais o Cl^- flui através das células passando através dos canais Cl^- CFTR localizados em ambas as membranas, apical e basolateral (SCREEVER, 2001).

Sob condições basais o canal CFTR, em ambas as membranas, está ativo, o que parece estar relativamente relacionado aos altos níveis basais de AMPc ou a pouca atividade específica da fosfatase específica que deixa a CFTR em um estado fosforilado ativo (RAM, 1990).

A perda do CFTR nos ductos explica a fisiopatologia da FC, onde o Cl^- não segue a absorção do Na^+ , daí a absorção do NaCl é impedida, aumentando as concentrações de Na^+ e Cl^- no suor, e a perda da condutância do Cl^- aumenta a tensão transepitelial.

b) Bobinas Secretórias das Glândulas Sudoríparas

Na bobina secretória os agonistas colinérgicos (muscarínicos) aumentam a concentração intracelular de Ca^{2+} e estimula a produção do suor pela abertura do canal de Cl^- na membrana apical, ativado pelo Ca^{2+} .

Este processo não é afetado na FC, e conseqüentemente o volume do suor em resposta a agonistas como a pilocarpina é normal na FC.

Os agonistas β adrenérgicos também estimulam a transpiração, embora o volume de suor produzido é uma fração do que o gerado por agonistas colinérgicos.

Os agonistas β adrenérgicos aumentam os níveis de AMPc celular e abrem o canal CFTR Cl^- da membrana apical nas bobinas secretórias das células. Nos pacientes com FC, a secreção do suor estimulada pelo cAMP é perdida.

Defeitos na produção de suor pela indução de β agonista- proporciona uma anormalidade mais evidente a qual pode ser demonstrada em portadores. Heterozigotos para mutações da FC produzem aproximadamente metade da quantidade normal de suor dos indivíduos normais em resposta aos a agonistas β adrenérgicos.

2.5.8.2 O epitélio das vias aéreas

A FC provoca um efeito local de defesa pulmonar. Infecções recorrentes das vias aéreas são a marca da doença pulmonar na FC. Várias observações indicam que um defeito no sistema de defesa local dos pulmões promove repetidas infecções:

- As infecções são restritas ao pulmão, os outros órgãos não são infectados;
- Quando os pulmões de um indivíduo sem FC são transplantados para um indivíduo com FC, eles não se tornam infectados;

- Tratamento antibiótico, incluindo os aerossóis, são atualmente os mais eficazes;
- O defeito é sutil com um período prolongado de baixo grau de colonização bacteriana.

As infecções recorrentes e as inflamações exuberantes na FC envolvem tanto as vias aéreas superiores e inferiores. O epitélio das vias aéreas proximais é um epitélio pseudoestratificado colunar, composto por células ciliadas, células caliciformes e células basais.

O epitélio das vias aéreas distais é predominantemente composto por epitélio bronquiolar ciliado e células não ciliadas (células de Clara).

Além disso, o epitélio proximal contém glândulas submucosas contendo células serosas e mucosas, e composto por um ducto cuboidal ciliado e células não ciliadas (SCREEVER, 2001).

a) Patogênese das infecções nas vias aéreas

Tem sido difícil estabelecer uma relação entre a perda da função da CFTR e propensão para a infecção das vias aéreas. Várias hipóteses sobre a patogênese têm sido propostas. Muitas das hipóteses não são mutuamente exclusivas, na verdade, a doença respiratória na FC pode resultar do efeito concentrado de vários defeitos funcionais que produzem um único quadro clínico.

Antes de considerar hipóteses específicas, é necessário fazer uma distinção entre a doença precoce e tardia. Os defeitos iniciais nas vias aéreas da FC que predispõem à doença podem ser significativamente diferentes dos fatores que perpetuam e mantêm o curso tardio.

Em outras palavras, a patogênese pode ter importantes diferenças em relação à fisiopatologia. Uma analogia seria uma infecção viral das vias aéreas que põe em marcha um comboio de eventos conducentes a bronquiectasias bacterianas crônicas. Essa doença parece muito diferente no início e final no seu curso. Esta distinção tem importantes implicações. Ela sugere que o estudo de pacientes e de vias aéreas com a doença bem estabelecida não pode dar suposições sobre a patogenia. Além disso, a prevenção da doença pulmonar pode exigir intervenção muito precoce. Também pode ser que a manobra preventiva possa ser diferente das

intervenções utilizadas para tratar a doença estabelecida no pulmão. Finalmente para desenvolver novos tratamentos e prevenções, é necessário compreender a doença nos seus diversos estágios.

b) Correlações genótipo-fenótipo

A variabilidade de uma desordem hereditária pode ser atribuída a três fatores: a natureza do defeito em resposta ao gene, o contexto no qual o gene funciona e a influência do meio ambiente. Entendendo esses fatores, a relação entre genótipo CFTR e o grau em que ele determina o fenótipo, tem sido uma área de intenso estudo, desde a clonagem do gene.

Dois temas gerais têm surgido. A primeira é que a correlação entre genótipo e o grau de severidade da doença varia de acordo com o sistema de órgãos afetados.

Uma estreita associação é observada entre o genótipo CFTR e o *status* pancreático.

Uma clara, mas menos robusta correlação existe entre as mutações e o grau de anormalidade do cloreto no suor, a gravidade da doença nos sinus, bem como a ocorrência de íleo meconial.

O genótipo CFTR tem alguma influência sobre a gravidade do fenótipo pulmonar. Finalmente, anormalidades no desenvolvimento do trato reprodutivo masculino parecem estar correlacionadas com a natureza das mutações no CFTR.

O segundo tema é que os diferentes tecidos epiteliais exigem diferentes níveis de CFTR para a função normal.

A combinação tentadora desses temas pode levar a conclusão de que os tecidos com a mais baixa exigência de CFTR funcional mostrará uma maior correlação com o genótipo.

Uma melhoria no quadro pancreático, portanto, se correlaciona com mutações específicas, enquanto a relação com a doença pulmonar deveria ser menos robusta.

Poderia se prever que a correlação entre genótipo CFTR e a doença pulmonar poderia ser evidente apenas para mutações que conservam uma função substancial. Realmente, parece não haver provas de apoio a este conceito. No entanto, a natureza multifuncional do CFTR e a presença de variáveis genéticas e ambientais indicam que uma interpretação simplista da relação genótipo/fenótipo na

FC pode ser útil para testar hipóteses, mas de pouco valor para um indivíduo doente (SCREEVER, 2001).

2.5.8.3 Genótipo CFTR e outras características do fenótipo na FC

Tentativas têm sido feitas para correlacionar genótipo com a disfunção das glândulas sudoríparas. As concentrações de Cl⁻ no suor parecem ser menores em pacientes com suficiência pancreática do que os com insuficiência pancreática (WILSCHANSKI, 1995).

No entanto, o Cl⁻ no suor dos pacientes com suficiência pancreática pode variar de valores na faixa normal para valores observados em pacientes homocigotos para a mutação $\Delta F508$.

Na tabela 3 está apresentada a relação entre as diferentes mutações e a concentração de Cl⁻ no suor.

A mutação G551D parece conferir um menor risco de íleo meconial do que a mutação $\Delta F508$ (KEREM, 1989). Além disso, camundongos com uma mutação G551D tinham uma taxa mais baixa de obstrução intestinal fetal do que camundongos sem a mutação (KEREM, 1990).

TABELA 3 - ASSOCIAÇÃO ENTRE MUTAÇÕES E AS ESPECIFICIDADES FENOTÍPICAS DA FC

Mutação	% Suficiência Pancreática	Concentração de Cl ⁻ no suor (mmol)	Idade do diagnóstico em anos
$\Delta F508$	2,5 (396)	106 \pm 22 (328)	1,7 \pm 3,0 (392)
P67L ‡	77 (12)	57 \pm 9 (12)	22,5 \pm 11,3 (12)
R117H	87 (23)§	82 \pm 19 (22)§	10,2 \pm 10,5 (23) †
R334W	40 (15)§	108 \pm 16 (15)	7,6 \pm 6,6 (15) †
A455E	79 (33)§	Não reportado	15,0 \pm 10,6 (33) ‡
A455E	78 (9)*	80 \pm 19 (9) †	5,7 \pm 1,6 (9) †
3849 \pm 10 kb C -->. T ‡	67 (15)	62 \pm 17 (14)	12,5 \pm 8,8 (15)

3849 ±10 kb	77 (13)	39 (13)	não reportado
C -->. T ‡			

NOTA: *p < 0.05 † p < 0.01 ‡ Comparação estatística com ΔF508 homozigotos não foi executada §p < 0.001 comparada com o grupo de idade e sexo marcado como ΔF508 homozigotos controles

FONTE: SCREEVER (2001)

A modificação genética que influencia a ocorrência do íleo meconial tem sido identificada no cromossoma 19, indicando uma interação entre o genótipo CFTR e o fundo genético determinante do risco de íleo meconial.

A doença das vias aéreas superiores também pode estar relacionada a algumas mutações.

Uma fração significativa de homens com azoospermia obstrutiva devido a mutações CFTR também têm doença nos sinus.

Vários estudos têm sugerido que certas mutações da FC podem estar relacionadas à formação de pólipos nasais de doença do sinus (SCREEVER, 2001).

2.6 INCIDÊNCIA

A incidência da FC, obtida a partir de estudos retrospectivos é estimada em 1 caso entre 500-3000 nascimentos (RIBEIRO, 2002). No entanto, estudos baseados na triagem neonatal pela identificação de níveis elevados de tripsina no sangue mostram uma incidência entre 1:1800 e 1:6900 (KING DN, 1979).

Deve-se enfatizar que na triagem neonatal há o risco de passar despercebido certo número de casos. Ao reunir os resultados retrospectivos com os da triagem neonatal pode-se estimar a incidência na população caucasiana em 1/2000, embora em alguns países seja menor tal como 1/3500 na Espanha, 1/3300 na Alemanha e 1/7700 na Suécia. No entanto, graças à análise direta das anomalias moleculares na população, a incidência real da FC poderá ser conhecida com mais exatidão.

A incidência da FC é muito baixa nas populações não caucasianas. Apesar de dados pouco precisos, calcula-se uma incidência de 1:117.000 nos norte-americanos negros, enquanto são poucos os casos descritos na África negra (RIBEIRO, 2002). Os dados sobre os povos orientais também são muito escassos,

mas revelam uma incidência de 1/90.000 na população oriental do Hawaii, de 1/10.000 na comunidade oriental da Grã-Bretanha e pouquíssimos casos descritos no Japão (YAMASHIRO, 1997). Nos países caucasianos um em cada 22 indivíduos é portador deste defeito autossômico recessivo.

Um recente estudo publicado por Farrel (2008) combinou uma variedade de métodos para determinar a prevalência da fibrose cística na União Européia (EU). Estes resultados revelaram um registro de 0,737/10000 de prevalência média nos 27 países da UE, que é semelhante ao valor de 0,797 nos Estados Unidos da América, e apenas um isolado, a saber, a República da Irlanda com 2,98 publicado em 2008 pela Elsevier BV, Sociedade Européia de Fibrose Cística.

Embora a incidência de FC tenha sido geralmente bem definida em toda a Europa nos últimos anos a partir dos programas de triagem neonatal, a sua prevalência é mais difícil de apurar em virtude de uma série de razões, incluindo o fato dos registros da literatura científica variar em qualidade.

Durante as duas últimas décadas, os cuidados com os pacientes fibrocísticos na Europa têm sido cada vez mais organizados em serviços especializados e os casos diagnosticados geralmente são incorporados aos registros regionais ou nacionais. Isso facilita a determinação da prevalência da FC para a maioria dos países europeus. Os dados disponíveis, no entanto, mostram variações substanciais, apesar de que todas as informações sugerem uma prevalência muito inferior a 5 por 10000 habitantes. Além disso, muitos países europeus exigem agora que seja feito o registro de pacientes com FC a fim de receber cuidados por meio de reembolso (FARRELL, 2008).

Para a avaliação da prevalência da FC nos 27 países da União Européia, uma combinação de três métodos foi utilizada pelo autor: 1) a partir de uma pesquisa bibliográfica PubMed incluindo os anos de 1990 a 2006; 2) uma revisão do registro de dados dos pacientes com FC disponíveis a partir da Sociedade Européia de Fibrose Cística individual em cada país, para o ano de 2004, e 3) um levantamento em 18 países europeus realizado por meio de e-mails comerciais. Para garantir a precisão, os valores desta população foram comparados com os dados publicados pelo Eurostat, que é o Serviço de Estatística das Comunidades Europeias. À exceção de Malta onde a prevalência foi estimada a partir da população média da UE, porque a população de Malta é de apenas 397000 em 0,8% do total da União

Européia, esta estimativa tem um efeito negligenciável sobre a precisão global (Tabela 4).

Combinando todos os países da União Européia, registraram-se 35806 pacientes com FC identificados durante o ano de 2004 em um total de 486.114.000 indivíduos, resultando em uma prevalência média de 0,737 por 10.000 na UE em 27 países. Um cálculo semelhante para os Estados Unidos indicou 0,797 pacientes com FC por 10.000 pessoas.

No Brasil, nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e São Paulo os dados de incidência publicados são respectivamente de 1:9520, 1:8779, 1:9115 e 1:8403 (RODRIGUES, 2008).

Dados acumulados nos últimos 10 anos dá uma incidência total para a FC de cerca de 1:4000 nascimentos baseada no rastreio 1,5 milhões de recém-nascidos no Colorado, Wisconsin, Connecticut e Montana. Esta incidência é comparável aos cerca de 1:3000 nascidos para o hipotireoidismo congênito, uma condição incluída em todos os estado dos EUA nos programas de triagem neonatal (THERREL, 2005).

Raskin, pela análise da frequência das principais mutações de FC no estado do Paraná, encontrou uma incidência estimada de 1:6803 (IC de 95% = 1.103 - 41.270) e a probabilidade de um indivíduo ser portador do gene FC de 1:42, (IC de 95% = 17 - 102) (Tabela 5).

TABELA 4 - PREVALÊNCIA DE PACIENTES COM FC NA POPULAÇÃO DOS PAÍSES DA UNIÃO EUROPÉIA

País	População em 2004 (milhões)	Pacientes com FC	Prevalência de FC (por 10.000)	Incidência estimada de FC
Áustria	8,175	686	0,839	1:3500
Bélgica	10,348	1065	1,05	1:2850
Bulgária	7518	170	0,226	1:2500
Chipre	776	26	0,335	1:7914
República Tcheca	10246	570	0,556	1:2833
Dinamarca	5413	412	0,761	1:4700
Estônia	1,342	83	0,618	1:4500
Finlândia	5,215	64	0,123	1:25000

França	60,424	453	0,750	1:4700
Alemanha	82,425	6835	0,829	1:3300
Grécia	10,648	555	0,521	1:3500
Hungria	10,032	410	0,409	
Irlanda	3,970	1182	2,98	1:1353
Itália	58,057	5064	0,872	1:4238
Letônia	2,306	24	0,104	
Lituânia	3,608	47	0,130	
Luxemburgo	463	20	0,431	
Malta	397	23	0,579	
Holanda	16,318	1275	0,781	1:4750
Polônia	38,580	987	0,256	1:5000
Portugal	10,524	285	0,271	1:6000
Romênia	22,356	238	0,106	1:2056
Eslováquia	5,424	340	0,627	1:1800
Eslovênia	2,011	66	0,328	1:3000
Espanha	40,281	2200	0,546	1:3750
Suécia	8,986	362	0,403	1:5600
Reino Unido	60,271	8284	1,37	1:2381

FONTE: FARREL (2008)

TABELA 5 - ESTIMATIVA E LIMITE DE CONFIANÇA DE 95% DA FREQUÊNCIA DE HOMOZIGOTOS E DE HETEROZIGOTOS PORTADORES DA FC EM EURO E AFRO-BRASILEIROS

ESTADO	HOMOZIGOTOS		HETEROZIGOTOS PORTADORES	
	INCIDÊNCIA	IC	FREQUÊNCIA	IC
EURO-BRASILEIROS				
Rio Grande do Sul	1 em 1 587	504 a 5005	1 em 20	12 a 36
Santa Catarina	1 em 12 195	2 044 a 72690	1 em 56	23 a 135
Paraná	1 em 6 803	1 103 a 41720	1 em 42	17 a 102
São Paulo	1 em 32 258	3 281 a 318549	1 em 90	29 a 282
Minas Gerais	1 em 21 277	2 895 a 156 449	1 em 73	27 a 198
TOTAL GERAL	1 em 7 576	3 633 a 15 802	1 em 44	31 a 63

COMBINADO	1 em 20 202	8 651 a 47 179	1 em 58	38 a 88
AFRO-BRASILEIROS	1 em 14 085	231 a 850 965	1 em 60	8 a 458

FONTE: RASKIN (2001)

2.7 TRIAGEM NEONATAL

A triagem neonatal (TN) inclui testes bioquímicos para determinadas enfermidades que possuem graves conseqüências quando o tratamento não é efetuado.

Um programa de triagem neonatal exige um sistema complexo de apoio para garantir a sua eficácia. Nos EUA são 51 programas distintos que realizam a TN, todos com diferentes painéis de rastreio e estruturas administrativas obrigatórias (THERREL, 2005).

Em praticamente todos os recém-nascidos nos Estados Unidos, a triagem neonatal ocorre durante os primeiros dias de vida, e quando devidamente realizado, é essencial para prevenir as conseqüências devastadoras de uma série de doenças não reconhecíveis clinicamente ao nascimento. Desde o início dos anos 1960, quando Robert Guthrie, idealizou um teste de rastreio bioquímico em amostra de sangue coletada em papel filtro especial para uso na detecção de fenilcetonúria (PKU) em recém-nascidos, as oportunidades para expandir a triagem neonatal à outras condições debilitantes passaram a existir.

Não somente procedimentos bioquímicos, mas métodos moleculares têm sido utilizados para detectar transtornos potencialmente graves para o recém-nascido. De forma geral um programa de triagem neonatal pode ser dividido em 6 partes: educação, triagem laboratorial por meio de processos bioquímicos, seguimento, diagnóstico confirmatório, gestão, e avaliação.

Antes de a triagem neonatal ocorrer, são fornecidas aos pais informações sobre o teste e outras informações gerais do programa. O conteúdo e a complexidade das informações podem variar. Estas informações são geralmente compartilhadas com os pais após o nascimento da criança e também antes de a amostra de sangue ser coletada. Além de folhetos, alguns programas têm vídeos educativos e outros materiais disponíveis. Material informativo também deve estar disponível para formação técnica no que diz respeito aos procedimentos de

obtenção da amostra de sangue do RN. Em virtude da legislação nacional ou estadual que torna obrigatória a pesquisa neonatal para algumas doenças, o consentimento dos pais não é normalmente necessário. Em alguns programas em que um teste de rastreio está disponível, mas não é obrigatório, o consentimento pode ser exigido.

A Academia Americana de Pediatria (AAP) recomenda o consentimento só nos casos em que um teste faz parte de um estudo piloto ou pesquisa. A coleta da amostra do calcânhar do RN ocorre após o primeiro dia de vida nos EUA e após 48h de vida no Brasil, pouco antes da alta hospitalar. A coleta de sangue deve ser realizada de preferência até o 8º dia de vida (THERREL, 2005).

No programa de triagem neonatal do Paraná, uma repetição normalmente é necessária se a coleta inicial ocorreu antes das 48 horas de idade. A primeira amostra da criança é usualmente coletada no hospital, enquanto a repetição usualmente ocorre nas unidades básicas de saúde. O laboratório de triagem neonatal é responsável pelo recebimento das amostras, pela determinação da adequação analítica incluindo a integralidade dos dados, pela realização de testes adequados, pelos laudos e resultados dos exames. O descarte das amostras residuais após o teste é de responsabilidade do programa e envolve uma política e protocolo nacional. Os resultados dos exames são normalmente relatados à unidade coletora da amostra seja ela o hospital ou a unidade básica de saúde.

Para os resultados incomuns (alterados) ou inaceitáveis, oriundos de análises não realizadas por comprometimento da amostra por erro na coleta, um aviso de reconvocação é também encaminhado ao familiar em primeira circunstância. Neste caso medidas extremas de acompanhamento são necessárias para localizar a criança que pode ter nascido com uma possível condição de risco de vida.

Alguns testes diagnósticos confirmatórios são necessários. A equipe de médicos é encorajada a apresentar periodicamente os resultados do tratamento para avaliação contínua do programa em reuniões sistemáticas da equipe. Os dados provenientes da triagem neonatal propiciam uma melhor compreensão das condições do rastreio, traduzindo-se em melhoria na qualidade do programa em geral (THERREL, 2005).

A incapacidade de detectar a FC ao nascimento conduz invariavelmente ao aparecimento de doença pulmonar progressiva, disfunção pancreática e falhas em outros órgãos. Enquanto a cura para a alteração no código do DNA que leva à FC

ainda não existe, recém-nascidos identificados por meio da triagem neonatal são encaminhados para tratamento mais precocemente, o que tem contribuído sobremaneira para melhorar o crescimento e o estado nutricional, impedindo anormalidades na função cognitiva e melhoria na função pulmonar. A detecção precoce da FC diminui também o número de visitas médicas e o estresse emocional que a família sofre durante o processo de investigação e obtenção do diagnóstico clínico.

Os protocolos existentes para a triagem neonatal em cada programa podem variar. Inclui métodos de detecção da tripsina imunorreativa (IRT) que na maioria dos recém-nascidos com FC está aumentada durante um breve período de tempo logo após o nascimento. A IRT permanece elevada na maioria dos recém-nascidos com FC durante várias semanas, e o recém-nascido com elevação transitória desta substância geralmente não possui FC. Uma segunda determinação da IRT antes dos 30 dias de vida pode ajudar no diagnóstico eliminando falsos positivos. Este modelo de protocolo pode ser encontrado na literatura escrito como IRT/IRT que envolve a determinação sucessiva da IRT ao longo de um período de 1 a 4 semanas, seguida do teste do suor para confirmação da doença no subgrupo de pacientes com um segundo IRT elevado.

Este protocolo será extensivamente discutido ao longo deste trabalho por ser o utilizado no Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Paraná, objeto deste estudo.

Com a introdução da pesquisa do DNA, na década de 1990, utilizando-se de amostras de sangue seco coletadas em cartão de papel filtro a mutação $\Delta F508$, mais frequente em cerca de 90% dos casos de FC nos Estados Unidos, contribuiu para modificação no protocolo da triagem neonatal. Em alguns programas, foi incorporada uma segunda linha de teste de DNA para pesquisa desta mutação a partir da mesma mancha de sangue coletada no papel filtro do RN quando uma primeira determinação de IRT estava elevada. Neste modelo de protocolo os pacientes identificados com a mutação são encaminhados para testes do suor. Este protocolo é conhecido na literatura como IRT/DNA que teoricamente encurtou o tempo de diagnóstico, ao mesmo tempo diminuindo o número de pacientes reconvidados. A desvantagem reside na incapacidade em detectar pacientes que poderiam não ter a mutação $\Delta F508$. Com a disponibilidade recente de painéis com múltiplas mutações, alguns programas substituíram a segunda triagem por esta

análise para aumentar ainda mais a sensibilidade. A maioria dos painéis comercialmente disponíveis inclui 25 mutações recomendadas pelo Colégio Americano de Genética Médica nos EUA (ACMG) na triagem da FC.

Atualmente, os exemplos de protocolos de triagem neonatal existentes são: IRT/IRT, IRT/DNA (Δ F508) e IRT/DNA (multi painel de mutações), sem existir um consenso sobre qual o melhor modelo de protocolo que atinja as reais condições de cada programa. O fato de mais de 1500 mutações do DNA terem sido identificadas nos casos de FC ilustra a potencial dificuldade que existe em alcançar um consenso em uma segunda linha de inclusão de teste de DNA.

Em todo programa de triagem neonatal a responsabilidade e as atividades de cada componente devem ser perfeitas e não duplicadas. É importante ressaltar a necessidade de subsídio financeiro por meio de obrigação legal a fim de favorecer a continuidade dos serviços. Os programas de triagem neonatal em todo o mundo são concebidos para serem sistemas de saúde abrangentes, com garantia desde a triagem até a gestão do tratamento. Qualquer nova doença triada geralmente é adicionada com a expectativa de que haja:

1. Melhoria dos resultados sanitários para os recém-nascidos;
2. Prevenção de danos desnecessários ao recém-nascido, decorrentes da ausência de detecção precoce por meio da triagem neonatal.

A doença deve ter uma frequência relativa que justifique a sua inclusão e o programa de triagem neonatal (incluindo finanças) deve ser ajustado para que a prestação dos serviços seja adequada, eficaz e universal no que se refere ao diagnóstico e o tratamento precoce.

Na implantação de um programa de triagem neonatal obrigatório muitas questões devem ser consideradas na elaboração das políticas que incluem a pesquisa de determinada doença. Dentre elas pode-se citar a fonte de financiamento para sustentação da pesquisa e se o tratamento deve ser incluído no financiamento. Deve se considerar também a necessidade de existir um sistema abrangente de diagnóstico e acesso ao tratamento disponível de forma local, regional ou nacional de forma que atinja plenamente a finalidade de prevenção ao qual se propõe. A

evolução da doença deve ser contida ou uma melhora no quadro geral do paciente deve ser potencialmente alcançada com tratamento precoce.

Outras discussões e problemas invariavelmente irão surgir, dentre eles a armazenagem e utilização de amostras residuais, e o uso das amostras da triagem neonatal na identificação genética de doenças que podem causar impacto nas decisões reprodutivas. Quase todos os programas têm sociedades científicas consultivas que incluem sub-especialistas, e conselheiros de atividades associadas. Eles oferecem subsídios para decisões programáticas e muitas vezes são responsáveis por recomendar as condições para inclusão de outras doenças no painel de triagem neonatal.

No final da década de 1960, alguns critérios foram desenvolvidos por Wilson e Jungner (Quadro 4) que ainda servem como base na tomada de decisões no que se refere à definição do painel de doenças da triagem neonatal (THERREL, 2005).

No Brasil, a triagem neonatal para fibrose cística teve início a partir da publicação da portaria do Ministério da Saúde de número 822 de junho de 2001, que introduziu o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). Ficou determinado que o rastreamento fosse dividido, de acordo com a organização em cada Estado, em 3 fases:

- Fase 1 - Fenilcetonúria (PKU) e Hipotireoidismo Congênito (HC);
- Fase 2 - PKU, HC, Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias;
- Fase 3 - PKU, HC, Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias e Fibrose Cística.

QUADRO 4 - PRINCÍPIOS PARA DETECÇÃO PRECOCE DE DOENÇAS

1. A doença deve ser grave.
2. Deve existir um tratamento conhecido para a doença.
3. O diagnóstico e o tratamento devem estar disponíveis.
4. A doença deve ser assintomática ao nascimento.
5. Deve existir um teste ou exame adequado.
6. O teste ou exame deve ser aceitável para a população.
7. A história natural da doença deve ser conhecida.
8. Deve existir um protocolo de tratamento e este deve estar disponível aos pacientes.
9. O custo do processo (incluindo o diagnóstico e o tratamento dos pacientes diagnosticados),

deve ser economicamente equilibrado em relação às possíveis despesas como a assistência médica como um todo.

10. O seguimento deve ser um processo contínuo e não uma só vez e deve estar disponível para todos os RN que necessitarem.

FONTE: THERREL (2005)

O Paraná foi o primeiro estado brasileiro cadastrado em setembro de 2001, já na terceira fase, seguido de Santa Catarina e Minas Gerais. No Paraná, a triagem da FC começou em 2001, usando o protocolo IRT/IRT, seguido do teste do suor como método confirmatório e a pesquisa da mutação $\Delta F508$ nos casos de positividade para o teste do suor. A primeira publicação da experiência no Paraná envolveu 456.982 recém-nascidos a partir de setembro de 2001 a abril de 2004. Neste estudo em 4028 (0,9%) indivíduos o resultado da primeira dosagem para a IRT foi positiva, acima do valor de corte de 70ng/ml. Destes, uma segunda amostra de sangue para confirmação da IRT inicial alterada resultou em 3815 (94,7%) crianças com um resultado normal, 478 (12,8%), com resultado positivo. Destes com resultado positivo na segunda determinação de IRT, apenas 48 (0,01%) tiveram o diagnóstico confirmado pelo teste do suor cloreto (corte de 50mMol/l). Esses resultados indicaram um índice elevado de resultados falso-positivos na primeira IRT. A incidência de fibrose cística foi de 1:9520 recém-nascidos no estado (SANTOS, 2005).

No Estado de Santa Catarina, o primeiro relato da triagem neonatal para FC resultou da avaliação de 386.183 crianças durante o período compreendido entre outubro de 2000 a dezembro de 2005, utilizando o protocolo do teste IRT/IRT, com coleta inicial de sangue do RN no período do quarto ao sétimo dia de vida, com um valor de corte de 70ng/ml, sendo o segundo teste realizado até 30 dias de vida e três amostras de suor para dosagem do cloreto como diagnóstico confirmatório. Das 386.183 crianças triadas, 3902 (1%) tiveram uma primeira IRT alterada e 181 (0,05%) uma segunda prova de IRT igualmente alterada. A incidência foi de 1:8776 (44 casos de FC). Todas as crianças com FC eram brancas, sendo 11 homocigotos e 14 heterocigotos para a mutação $\Delta F508$. A idade média ao diagnóstico foi de 64 dias (HONÓRIO, 2006).

Em Minas Gerais, a triagem neonatal iniciou-se em julho de 2003. No período compreendido entre julho de 2003 até abril de 2005 foram triados 455.755 RN e a

incidência encontrada foi de 1:9115 (53 casos de FC). A idade média ao diagnóstico foi de 51,4 dias (RODRIGUES, 2008).

Em São Paulo há relato de um estudo piloto testando 33.600 RN do Norte, Nordeste e Oeste do estado apresentando uma incidência estimada em 1:8403. A média de idade no momento do diagnóstico neste estudo foi de 69 dias. Das quatro crianças diagnosticadas, três já apresentavam sintomas da doença quando o diagnóstico foi confirmado (RODRIGUES, 2009).

2.8DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da FC deve ser realizado:

1. Pelo achado de mutações nos dois alelos;
2. Pela presença de dois testes do suor alterados;
3. Pela presença de pelo menos uma das seguintes manifestações clínicas epidemiológicas:
 - Doença pulmonar obstrutiva/supurativa ou sinusal crônica;
 - Insuficiência pancreática exócrina crônica;
 - História familiar de FC (COMMITTEE, 1997;CONFERENCES, 1996).

Contudo, em virtude de que existem cerca de mais de 1500 mutações para FC relatadas (www.genet.sckkids.on.ca/cgi-bin/webobjects/mutattion), o diagnóstico molecular torna-se inviável.

Em alguns países a presença do gene na mãe é testada, e quando se evidencia a condição de portadora, o pai é testado. Quando ambos são conhecidos como heterozigotos para um alelo da FC a amniocentese ou a amostra de vilosidade coriônica pode recuperar o DNA fetal para determinar o genótipo do feto.

O teste do suor no diagnóstico da FC, para ser válido, deve ser executado em serviços que tenham padronização e realizado por técnicos experientes. Um segundo teste positivo é necessário para confirmar o diagnóstico. Poucos pacientes com FC têm concentrações de cloreto normais.

Podem ser auxiliares no diagnóstico da FC:

- A identificação da ausência de esperma no sêmen (praticamente todos os pacientes homens com FC são azospérmicos);
- Pneumonia de repetição;
- Evidência de obstrução intestinal;
- Medida da diferença de potencial nasal (NPD).

Para pacientes com clínica sugestiva, no quais o diagnóstico é ainda duvidoso, deve ser feita a avaliação de NPD (KNOWLES, 1983).

A prova baseia-se no achado dos autores que verificaram que pacientes com FC tinham elevada reabsorção de Na^+ e reduzida secreção de Cl^- em resposta ao cAMP. Contudo, este teste requer habilidade considerável, um banco de resultados de indivíduos normais e FC tópica para comparação e interpretação experiente.

Atualmente, os programas existentes de triagem neonatal utilizam a medida da tripsina imunorreativa (IRT) em amostras de sangue seco coletadas por punção do calcanhar do recém nascido (RN) no nascimento para detectar e intervir precocemente na enfermidade. A IRT encontra-se elevada na maioria dos pacientes com FC (HEELEY, 1992). Contudo, os valores de corte que selecionam aproximadamente todos os pacientes com FC, também selecionam cinco ou seis vezes RN sem FC. Por esta razão a triagem com IRT em muitos países é utilizada associada com a pesquisa das mutações mais freqüentes da FC como um segundo teste de pesquisa.

O diagnóstico definitivo depende do teste do suor ou da identificação de dois alelos mutantes. A FC tem uma incidência de cerca de 1 para cada 2500 nascidos vivos caucasianos na maioria das populações estudadas. Ocorre também em populações não caucasianas, porém com freqüências menores.

Sendo uma doença autossômica recessiva ocorre em 25% da prole de casais em que ambos sejam portadores do gene mutante.

2.9 GENÉTICA

Existem mais de 1500 mutações descritas na literatura para o gene da FC, identificado em 1989, que codifica a proteína CFTR. A mais comum é a que causa a deleção da fenilalanina na posição 508 (F508 del), presente em aproximadamente

67% dos casos. A incidência de cada uma destas mutações também varia conforme a população em estudo (SÁNCHEZ-SOLIS, 1999).

A probabilidade de nascer um filho saudável, mas com um alelo mutado para FC é de 50%, como ilustrado na figura 9. O pediatra deve ter em mente esses dados para orientar futuras gestações das mães dos pacientes.

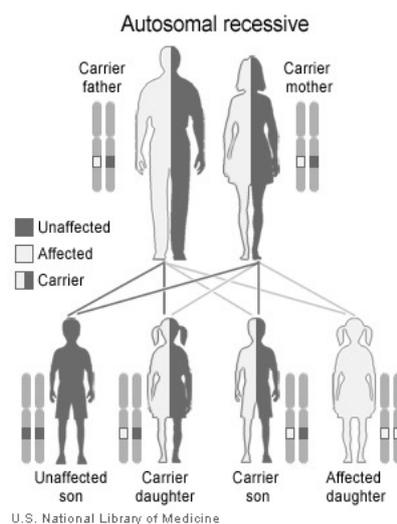


FIGURA 9 - MODELO DE TRANSMISSÃO DAS DOENÇAS DE HERANÇA AUTOSSÔMICA RECESSIVA

FONTE: http://www.coursejournal_medicina.blogs.sapo.pt/42129.html

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população de estudo originou-se de recém nascidos paranaenses triados no programa de triagem neonatal para pesquisa de Hipotireoidismo Congênito, Fenilcetonúria, Deficiência de Biotinidase, Doença Falciforme e outras hemoglobinopatias e Fibrose Cística no Estado do Paraná.

O período avaliado correspondeu ao mês de janeiro de 2002 até dezembro de 2008.

As crianças com suspeita de FC diagnosticadas pelo teste confirmatório de dosagem de cloreto (Cl⁻) no suor foram encaminhadas ao ambulatório de Alergia e Pneumologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) onde é realizado o seguimento de rotina destes pacientes.

Todos os hospitais e maternidades do estado são cadastrados para a realização do “Teste do Pezinho” na FEPE. Estima-se, por isso, que a cobertura seja de 100% dos recém nascidos vivos no PR, além de possivelmente incluir algumas das regiões fronteiriças com países vizinhos.

Neste estudo foram avaliadas no citado período, 1.218.642 recém nascidos provenientes dos 408 hospitais maternidade e 1281 unidades de saúde, do estado do Paraná. Desses recém nascidos, 13.235 (1,08%) tiveram um exame inicial de IRT positivo acima do valor de corte utilizado, de 70ug/l. Dessas crianças 2.309 (17,4%) tiveram um segundo resultado de IRT positivo em nova amostra de sangue coletada do calcanhar e impregnada em papel filtro. Todas essas crianças foram submetidas ao teste do suor para confirmação diagnóstica laboratorial da FC. Destes foram selecionados, por conveniência, para o cálculo utilizado nesta pesquisa 444 RN cujo diagnóstico foi normal pelo teste do suor e 90 com resultado confirmado positivo de FC. O número de RN foi fornecido pelo cadastro da (Declaração de Nascido Vivo) DNV do banco de dados da FEPE.

3.2 CARACTERÍSTICA DO ESTUDO

O estudo realizado foi observacional, retrospectivo e transversal, no qual todas as variáveis (fatores de estudo e efeitos clínicos) foram verificadas em uma única ocasião. Trata-se de um estudo comparativo de dois métodos utilizados na confirmação diagnóstica da Fibrose Cística (Teste do Suor).

Os recém nascidos selecionados para a pesquisa foram aqueles que apresentaram suspeita da doença em virtude de resultado positivo (acima do valor de corte) no método utilizado para triagem seletiva neonatal da FC.

3.3 AMOSTRA DA PESQUISA

3.3.1 Critério de Inclusão

- Recém nascidos triados pela FEPE no período de janeiro de 2002 até dezembro de 2008.
- Preenchimento completo das informações na ficha cadastral (cartão de coleta) do RN referentes ao gênero, raça, peso, idade do nascimento, idade da coleta.

3.3.2 Critérios de Exclusão

- Criança com idade maior que 30 dias no primeiro exame.
- Crianças que não realizaram o teste por recusa familiar ou por não terem sido localizadas pelo SRTN da FEPE.
- Crianças encaminhadas com suspeita clínica, irmãos e parentes de RN com FC

3.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo, de coorte da avaliação da triagem neonatal para Fibrose Cística.

Todos os dados foram obtidos pelo pesquisador e registrados no instrumento de coleta de dados. Os dados foram digitados em planilha eletrônica (*Microsoft Excel*®), conferidos e exportados para posterior análise estatística (*Statistica - Statsoft*®).

Na análise descritiva, as variáveis contínuas simétrica estão apresentadas com as suas medidas de tendência central e variabilidade (média, desvio padrão e mediana) e intervalos de confiança de 95%; as variáveis categóricas em percentagem.

A estimativa da diferença entre médias, para variáveis de distribuição contínua e grupos independentes foi realizada pelo teste t de *Student* e Análise da Variância (Anova). A estimativa da diferença entre freqüências foi realizada pelo teste qui-quadrado de Pearson.

Para estimar a probabilidade de volume de suor de acordo com o peso de nascimento foi utilizada a Regressão Logística Univariada. O coeficiente de correlação de Person foi calculado para estimar as possíveis correlações entre os métodos quantitativo coulométrico e a condutividade. O coeficiente de Kappa foi calculado para estimar a concordância entre os métodos.

A curva Roc (*Receiver Operation Curve*) foi utilizada para estimar o ponto de corte e índices de sensibilidade e especificidade do teste de condutividade, considerando o método coulométrico como o padrão-ouro.

Para todos foram utilizados testes bicaudais, considerando que as diferenças podem estar distribuídas para ambos os lados da curva, com nível de significância mínimo de 5%.

3.5 METODOLOGIA DA TRIAGEM NEONATAL

O Programa de Triagem Neonatal foi implantado por amparo legal na Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE) em 1987, inicialmente

para a pesquisa da Fenilcetonúria. Mais tarde, precisamente no ano de 1990, foi incluída na mesma infra-estrutura a pesquisa do hipotireoidismo congênito através da medida do TSH (Tireotropina).

No ano de 1994 possibilitou a realização de um estudo piloto para triagem de outra enfermidade chamada Deficiência de Biotinidase e que passou a ser rotineira em todos os recém-nascidos a partir de 1996.

Em 6 de Junho de 2001 o Ministério da Saúde instituiu no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) através da Portaria nº 822. Este programa normatizou a realização de testes de triagem neonatal populacional para a fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, hemoglobinopatias e a fibrose cística.

Os serviços de triagem neonatal receberam a denominação de Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) e foram organizados conforme o grau de complexidade estrutural e de atendimento em três fases distintas.

No Paraná o SRTN é responsável pela realização de todas as fases estabelecidas pelo PNTN que compreende a distribuição do material de coleta à toda rede de hospitais-maternidades e unidades de saúde, realização de testes laboratoriais de triagem, exames confirmatórios, busca ativa dos casos suspeitos e acompanhamento médico multidisciplinar e tratamento específico para cada doença.

Além da pesquisa das quatro enfermidades estabelecidas pelo PNTN, o SRTN da FEPE mantém a pesquisa da Deficiência de Biotinidase com o seguimento dos casos positivos detectados.

3.6 COLETA E ENVIO DE MATERIAL

No Paraná, a coleta da amostra de sangue do recém nascido é realizada por punção de calcanhar com lanceta especial no momento da alta hospitalar, ou na unidade de saúde em situações de parto domiciliar. O sangue é impregnado em um papel filtro (*Schleicher & Schuell 903®*) (NCCLS, 1992).

Existe uma recomendação do PNTN que a coleta de sangue seja realizada após as 48h de vida do recém-nascido, o mais próximo possível da alta hospitalar. No entanto, a coleta é realizada entre 24h à 48h após o nascimento.

Por ser o Estado do Paraná o único a realizar a coleta do sangue em hospitais maternidades, o SRTN orienta que nos casos em que a coleta for feita antes de 48h de vida, o exame seja repetido entre o quinto e o oitavo dia de vida na unidade de saúde.

São encaminhados mensalmente para a rede de coleta a ficha de coleta do recém-nascido, a lanceta de punção individual, o envelope Carta Resposta e uma lista nominal de mães.

Na ficha de coleta existem espaços para o preenchimento dos dados cadastrais da criança e da família e que são indispensáveis para o rastreamento da criança quando há necessidade de nova coleta do sangue ou a complementação de dados não preenchidos.

A amostra de sangue coletada pela enfermeira, depois de seca à temperatura ambiente de acordo com as normas técnicas de coleta de sangue do SRTN, é encaminhada diariamente pelo correio ao laboratório da FEPE.

O registro de entrada de cada exame no laboratório do SRTN é realizado através da Declaração de Nascido Vivo (DNV). Este fato possibilita sua correta identificação e evita duplicidade na sua identificação, uma vez que a DNV é única e conferida para cada criança individualmente ao sair do hospital.

Além da DNV, todas as informações e dados demográficos da criança são registrados em um sistema informatizado.

3.6.1 Coleta de Sangue Inadequada

Na figura 10 é possível ver alguns exemplos de amostras inadequadas para a pesquisa neonatal. Da esquerda para direita e na ordem, amostra coletada corretamente, amostra ainda molhada, amostra hemolisada ou contaminada, sangue insuficiente, excesso de sangue (desnecessário), excesso de sangue com sobreposição de gotas, sangue insuficiente (não ultrapassou a outra face do papel), halos de soro ao redor na mancha coletada.

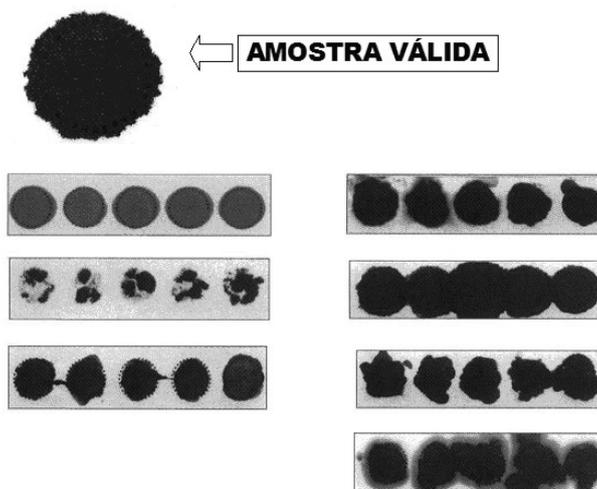


FIGURA 10 - DEMONSTRATIVO DE AMOSTRA COLETADA NA TRIAGEM NEONATAL
 FONTE: FEPE (2011)

Embora o SRTN capacite a equipe de enfermeiras dos hospitais e unidades de saúde por meio de material informativo e o Manual Técnico de Coleta, muitas amostras de sangue chegam ao laboratório comprometidas e são rejeitadas pelo processo de controle de qualidade.

Para efeito de pesquisa o laboratório submete estas amostras às análises sem, no entanto, divulgar os resultados obtidos. Qualquer resultado anormal (acima do valor de corte) que possa sugerir doença modifica a conduta de busca ativa da criança conferindo uma maior agilidade ao processo.

Para a FC amostras coletadas em crianças com idade superior à 30 dias de vida são consideradas inadequadas em virtude de uma possível redução dos níveis de IRT e conseqüente resultado falso normal. Amostras ressecadas e envelhecidas também podem interferir nos resultados dos exames de IRT com apresentação de resultados muito baixos e também a possibilidade de falso normal.

Os problemas técnicos de coleta que rotineiramente ocorrem nas amostras coletadas são:

1. Amostra de sangue insuficiente;
2. Amostra de sangue em excesso (quando há evidente sobreposição de sangue no papel filtro);
3. Amostra de sangue hemolisada;

4. Amostra de sangue contaminada com substância ou corpos estranhos como, tinta de caneta, fungos, álcool entre outros elementos;
5. Amostra de sangue envelhecida (que foi enviada tardiamente ao laboratório do SRTN, em um período maior que 30 dias da data de coleta do sangue);
6. Amostra de sangue ressecada que foi exposta ao calor intenso ou sol durante a secagem do sangue;
7. Papel filtro inadequado (quando a procedência do papel filtro para a coleta do sangue não é o recomendado pelo SRTN);
8. Amostras coletadas após transfusão.

A insuficiência de informações da criança na ficha de coleta não inviabiliza a sua análise laboratorial, porém pode comprometer a pronta localização pela busca ativa e retardar o início do tratamento. Quando os resultados são alterados a convocação para novo exame ocorre de acordo com o fluxograma demonstrado na figura 11.

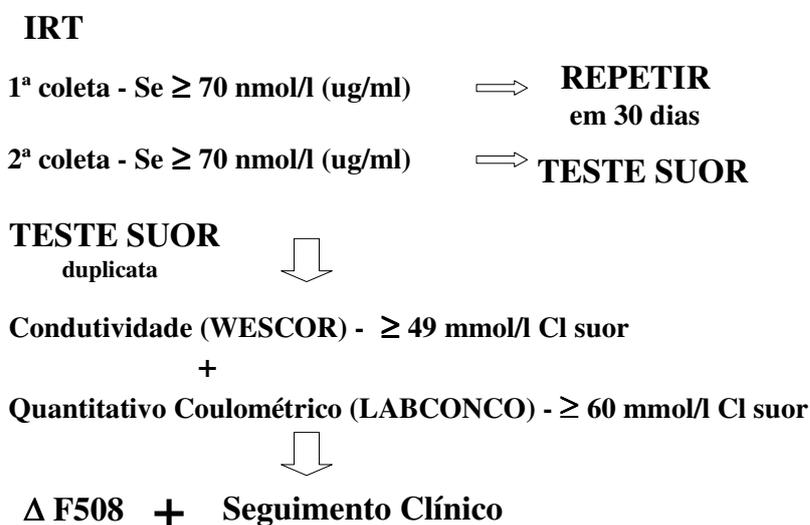


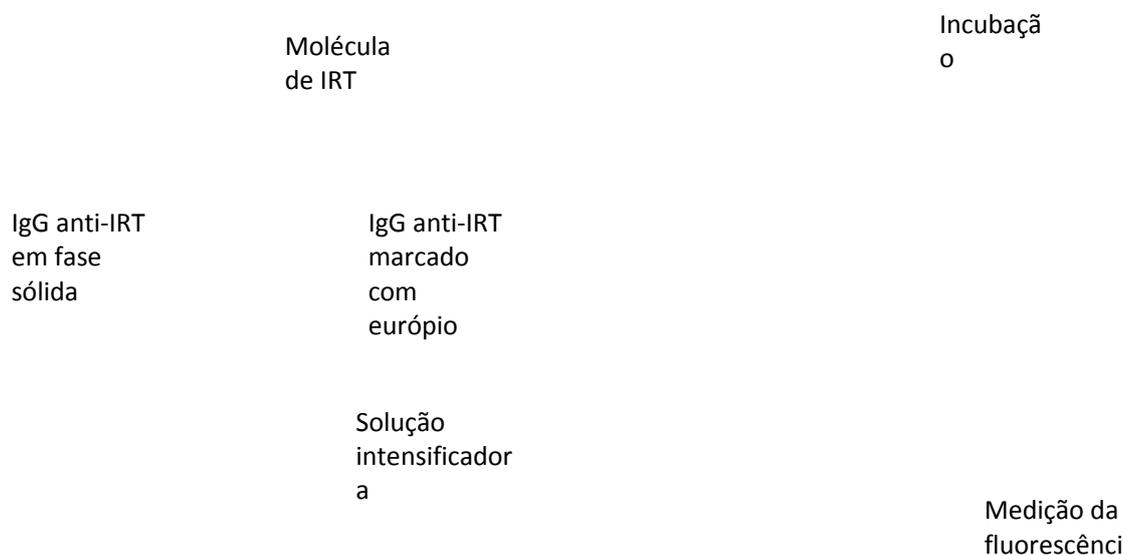
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DE TRIAGEM DA FIBROSE CÍSTICA NO SRTN
FONTE: FEPE (2011)

3.7 DETERMINAÇÃO DA TRIPSINA IMUNORREATIVA (IRT) NA TRIAGEM NEONATAL

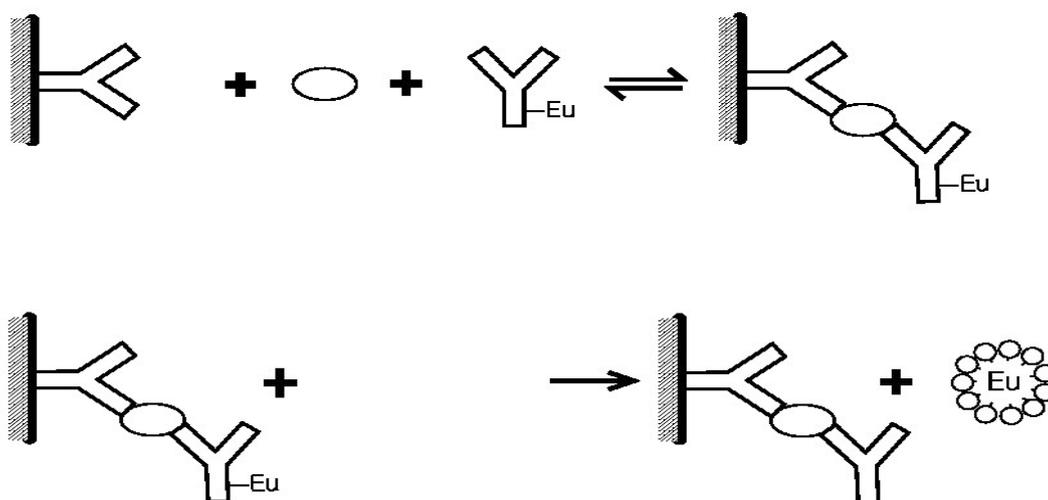
3.7.1 Princípio do Ensaio

O ensaio AutoDELFA Neonatal IRT é um fluoroimunoensaio de dois sítios em fase sólida com base na técnica direta de sanduíche, na qual dois anticorpos monoclonais (derivados de camundongos) são dirigidos contra dois determinantes antigênicos separados na molécula de IRT. Padrões, controles e amostras do teste contendo IRT reagem simultaneamente com anticorpos monoclonais imobilizados dirigidos a um sítio específico antigênico na molécula de IRT e anticorpos monoclonais marcados com európio (dirigidos com uma posição antigênica diferente) em solução tampão do ensaio. A solução tampão do ensaio extrai a IRT das manchas de sangue seco nos discos de papel de filtro. O ensaio completo exige apenas uma etapa de incubação.

A solução intensificadora dissocia os íons de európio do anticorpo marcado e em seguida formam quelatos altamente fluorescentes com componentes da solução intensificadora.



A fluorescência em cada poço é medida. A fluorescência de cada amostra é proporcional à concentração de IRT na amostra (SOINI, 1983; HEMMILÄ, 1984) (Figura 12).



Erro! Fonte de referência não encontrada.

FIGURA 12 DESENHO ESQUEMÁTICO DA ANÁLISE IMUNOFLUORIMÉTRICA DE IRT
 FONTE: HEMMILÄ (1984)

3.7.2 Conteúdo do “Kit”

Cada kit AutoDELFLIA Neonatal IRT contém reagentes para 1152 ensaios. Acompanham o *Kit*:

1. Cartelas contendo manchas de sangue seco em papel filtro, correspondentes à curva de calibração e controles de qualidade com valor baixo, intermediário e alto da IRT - Os valores da curva de calibração vão desde zero ng/ml, até 500 ng/ml (0, 25, 50, 100, 250 e 500) de sangue. Os valores de controle correspondem à faixa de 40, 70 e 120 ng/ml de sangue que correspondem aos controles baixo, médio e alto, respectivamente. Os padrões e controles são preparados a partir de um derivado de sangue humano com um valor de hematócrito de 50 a 55% e calibrados usando métodos gravimétricos.
2. Solução do traçador anti-IRT-Eu (~50 µg/mL) monoclonal de camundongo - O traçador está em solução salina tamponada (pH = 7.8) de Tris-HCl, contendo soro albumina bovina, IgG de camundongo, e menos de 0,1% de azida de sódio como conservante.

3. Tampão de ensaio de Neo IRT - Solução salina tamponada (pH = 7.8) de Tris-HCl, pronta para uso, contendo soro albumina bovina, globulina bovina, Tween 40, polietilenoglicol 6000, um corante vermelho inerte, e menos de 0,1% de azida de sódio como conservante.
4. Microplaca revestida - Tiras de microtitulação de anti-IRT 8 x 12 poços revestidos com anticorpos em reação com um sítio específico na molécula de IRT (monoclonal de camundongo).
5. Etiquetas de código de barras para o cassete de reagente e etiquetas de código de barra.
6. Concentrado para lavagem - Utilizada após o preparo despejando 250 mL de concentrado para lavagem em um recipiente limpo adicionando 6000 mL de água destilada (1: 25) para obter uma solução de lavagem tamponada (pH = 7,8).
7. Solução intensificadora.
8. *Software* e protocolo *MultiCalc* para "34 NIRT".
9. Picotador de amostras de sangue seco em papel filtro, DBS Puncher, Multipuncher ou semelhantes (Figuras 13 e 14).



FIGURA 13 - PICOTADOR AUTOMÁTICO MULTIPUNCHER

FONTE: FEPE (2011)



Erro! Fonte de referência não encontrada.

FIGURA 14 - SISTEMA AUTODELFIA DE ANÁLISE
FONTE: FEPE (2011)

As amostras de sangue dos recém nascidos, padrões e controles nos poços da microplaca tem aproximadamente 3,2 mm (1/8 polegada) de diâmetro.

3.7.3 Cuidados Necessários

Amostras lipêmicas e ictéricas não interferem no ensaio. Se a amostra não for aplicada diretamente no papel de filtro (que não é o método escolhido), um cuidado deve ser observado para que não sejam utilizados tubos ou vasos capilares com citrato ou etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para coletar o sangue, pois esses reagentes de anticoagulação afetam o ensaio quelando o európio.

Amostras de sangue armazenadas em temperatura ambiente devem ser analisadas em relação a IRT em no máximo duas semanas após a coleta, pois os níveis de IRT têm uma redução de 6 a 9% por semana. Para o armazenamento prolongado, sugere-se colocar as amostras em sacos plásticos e guardá-las congeladas (KIRBY, 1981;BORGSTRÖM, 1982).

Procedimentos adequados de transporte e teste após a coleta diminuem essa variação.

3.7.4 Controle de Qualidade

Amostras de controle sempre devem ser usadas para garantir a validade dos resultados no dia-a-dia. Pelo menos um controle deve estar próximo do limite de decisão clínica. Os controles devem ser executados da mesma maneira que as amostras. Controles em três níveis diferentes estão incluídos no *kit*. Esses controles devem ser executados em cada ensaio. Se o ensaio incluir mais de uma placa, os controles são executados em cada placa.

Segundo as recomendações do fabricante cada laboratório deve estabelecer sua própria média e faixa aceitável, que deverá ficar em cerca de $\pm 20\%$ dos valores especificados no certificado do controle de qualidade.

É recomendável que os laboratórios estabeleçam seus próprios controles em diferentes níveis, além dos controles incluídos no *kit*. Os resultados das amostras só devem ser relatados se os resultados dos controles para o ensaio estiverem em conformidade com os critérios estabelecidos pelo laboratório.

3.7.5 Resultados Anômalos

Podem ocorrer sob algumas condições:

- amostras de sangue que não estejam uniformemente preenchida com sangue;
- amostras de sangue picotada muito perto da borda da mancha de sangue;
- amostras coletadas e secas de forma insatisfatória;
- mancha de sangue não-eluyente (não extraída pelo tampão) devido à deterioração da amostra causada por exposição a calor e umidade;
- contaminação da mancha de sangue com material da mãe.

3.7.6 Resultados

A identificação baseia-se no uso de um valor de corte ou percentual, que faz a distinção entre as populações afetadas, ou não, para maximizar a especificidade e a sensibilidade do diagnóstico.

O corte de triagem de IRT usado varia conforme a população específica em que está sendo testado. Em uma estratégia de triagem alternativa, é solicitada uma segunda amostra daqueles bebês que originalmente apresentaram níveis elevados de IRT. Outra determinação de IRT é feita na segunda amostra e, se o nível estiver elevado, essa criança é submetida ao teste de suor. Os bebês identificados como predispostos à FC exigem maior acompanhamento para excluir ou confirmar a doença. O valor de corte utilizado neste trabalho foi de 70ng/ml ou ug/l de sangue.

3.8 TESTE DO SUOR - COLETA DO SUOR – ESTIMULAÇÃO ATRAVÉS DA IONTOFORESE POR PILOCARPINA

3.8.1 Princípio do Ensaio

O suor é obtido através da iontoforese por pilocarpina. A pilocarpina, impregnada em discos gelatinosos (pilogel) ou em gaze, é ionizada e conduzida a uma pequena área de glândulas sudoríparas no braço por iontoforese. O suor estimulado produzido a partir desta área é coletado diretamente em um *Macroduct* para a análise do cloreto ou em almofadas de papéis de filtro pré-pesadas para determinação do sódio.

Quando soluções aquosas de eletrólitos são aplicadas em bloco, uma corrente de 0,5 mA deve ser submetida, e gradualmente aumentada até um máximo de 4 mA. Quando é alcançado o valor de 4 mA a corrente deve ser mantida por um mínimo de 3 minutos e um máximo de 5 minutos.

Um período maior que esse não é necessário para aumentar a produção de suor, desde que um bom contato elétrico seja mantido pelo uso dos eletrodos e das almofadas saturadas ou discos de gel na pele do paciente.

O músculo flexor superficial do antebraço é o local preferido para a coleta do suor. No caso de ambas as áreas estarem eczematosas ou com apenas um pequeno sítio de coleta, outros locais podem ser utilizados com sucesso. Estes

locais incluem a parte superior do braço e em volta da coxa. Um grande cuidado deve ser tomado em todas as fases do processo para evitar a contaminação.

Uma bateria deve ser utilizada como fonte de alimentação e o aparato deve incluir um interruptor de segurança. O acompanhamento do processo deve ser realizado em toda a iontoforese, sempre que possível.

A segurança elétrica de todas as fontes de alimentação deve ser verificada anualmente. Os eletrodos devem ser de curvatura e tamanho apropriado para que fiquem encaixados sem folga no paciente. Comumente eles são feitos de cobre ou aço inoxidável. Os eletrodos devem ser firmemente fixados na posição para que as almofadas ou géis de eletrólitos fiquem bem ajustados à pele do paciente. Isto pode ser feito por meio de cintas ajustáveis com velcro ou borracha. Os eletrodos devem ser periodicamente limpos e inspecionados, e descartados se apresentarem ferrugem ou irregularidades.

3.8.2 Soluções de Eletrólitos

Incluem:

- Soluções aquosas ou discos de gel de Pilocarpina (*Wescor*) contendo nitrato de 2-5g/l é recomendado para utilização em ambos os eletrodos.
- Soluções alternativas (por exemplo, sulfato de magnésio) podem ser utilizadas no cátodo.
- Soluções que contenham sódio e / ou cloreto deve ser evitadas devido ao risco de contaminação da coleta.
- Soluções ácidas tamponadas não devem ser usadas por causa do aumento do risco de queimaduras.

Não é recomendado o preparo doméstico dessas soluções. Elas devem, se for o caso, ser preparadas em ambientes de laboratório especializado conforme as recomendações sanitárias vigentes.

3.8.3 Almofadas de Gaze como Base para Solução de Eletrólitos

Quando utilizadas devem ser convenientemente grossas para minimizar o risco de queimaduras com ácido. A dobradura deve proporcionar mais de 1 centímetro de espessura. O bloco deve ser, pelo menos, 1 centímetro maior do que o eletrodo em todas as direções para impedir o contacto da pele com o eletrodo. Os blocos devem ser saturados por imersão em solução do eletrólito antes da aplicação na pele do paciente. Sistemas híbridos, por exemplo, eletrodos *Wescor* com soluções aquosas de eletrólitos, ou discos de gel *Wescor* com eletrodos não *Wescor* não são recomendados.

3.8.4 Coleta

Durante a coleta, o suor deve ser protegido de qualquer contaminação e evaporação. Em alguns sistemas o suor é coletado em papéis (livre de cloreto de sódio) pré-pesado; em outros sistemas coletadores, *Wescor* descartáveis são utilizados. Estes coletadores estão descritos a seguir. O tamanho do papel filtro deve ser aproximadamente igual à área estimulada, ou seja, o tamanho da almofada de eletrólito. O papel filtro deve ser coberto com uma folha de material impermeável, pelo menos, 1 centímetro maior, em todas as dimensões do que o papel de filtro. O material deve ser impermeável completamente vedada à superfície da pele utilizando uma fita adesiva apropriada. O filtro de papel e face interna do material impermeável não deve nunca entrar em contato direto com as mãos do operador. Coletadores *Wescor* devem ser utilizados de acordo com as instruções do fabricante, tomando precauções para evitar o contato direto do suor com as mãos do operador.

3.8.4.1 Tempo de coleta

O suor deve ser coletado em tempo não maior que 30 minutos e não inferior a 20 minutos.

3.8.4.5 Armazenamento do suor antes da análise

Ao longo da coleta do suor, transporte e análise, todos os esforços devem ser feitos para minimizar a evaporação da amostra. Se a armazenagem é necessária antes da análise, o suor coletado em almofadas de papel deve ser mantido a 4°C por um período máximo de 3 dias e adequadamente dimensionados, com contenção de ar que não permita a evaporação ou fuga. O suor líquido coletado em coletores *Wescor Macroduct* podem ser armazenados em embalagens fechadas de até 72 horas a 4°C. Tubos de hematócrito fechados com plasticina também são adequados, proporcionando um ar diferencial deixado entre a plasticina e suor. O suor pode ser coletado em locais remotos, e transportado ao laboratório para análise, desde que se observe a atenção para os detalhes do armazenamento.

3.8.4.6 Pesagem

Se realizado com sistema de coletores em almofadas de papel filtro, uma balança de precisão para 0,0001g deve ser utilizada para pesar o suor. O suor, quando coletado em almofadas de papel, deve ser pesado e analisado o mais rapidamente possível.

Os sistemas de coletores *Wescor Macroduct* dispensam a pesagem proporcionando maior segurança e uma variável a menos de interferência no resultado final da análise.

3.8.4.7 Quantidade de amostra - Definição de amostra suficiente

A taxa média de suor secretado durante o período de coleta não deve ser inferior a 10ul de suor líquido em sistemas de coleta por *Wescor Macroduct*. Coletas abaixo dessa taxa não devem ser analisadas. Não é recomendado o uso de combinação de coletas insuficientes.

3.8.4.8 Cuidados necessários

As mãos devem ser lavadas antes e após o procedimento. Em caso de contacto de pilocarpina com os olhos, boca ou grandes áreas da pele, a área

atingida deve ser lavada com água abundante. Os eletrodos devem ser verificados antes de cada ensaio e substituídos se apresentarem sinais de ferrugem ou queimadura. Não é recomendado o uso de discos de Pilogel que estejam com a data de validade expirada, rachados, ou que apresentem qualquer indício de deterioração. O paciente deve ser acompanhado continuamente durante a iontoforese atentando-se para as queixas de "ardor" ou "queimação". No final da iontoforese a área estimulada deve aparecer avermelhada. Se houver qualquer evidência de bolhas ou queimadura deve-se procurar assistência médica.

3.8.4.9 Recomendações

Recomenda-se que o teste do suor seja adiado em bebês com idade inferior a 7 dias de vida. Da mesma forma em indivíduos desidratados, doentes, que tenham eczema ou edema.

O teste do suor não deve ser realizado em indivíduos que estão em oxigênio em sistema aberto.

3.8.4.10 Instrumentação e equipamento (Sistema de coleta de suor *Wescor Macroduct* (Modelo 3600, 3700 etc.)

a) Componentes:

1. Caixa de alimentação;
2. Dois eletrodos de iontoforese (vermelho e preto) cada um com uma pulseira de velcro;
3. Tiras de velcro em diferentes tamanhos, para caber o *Macroduct* em diferentes tamanhos de braço ou coxa;
4. Ferramenta extratora, tesoura ou alicate;
5. Tubos de 100ul de transporte e armazenagem de suor vedados (pode ser também tubos capilares de hematócrito e plasticina para vedação);
6. Algodão hidrófilo;

7. Etiquetas adesivas para identificação da amostra.

b) Reagentes:

1. Coletores *Macroduct*;
2. Discos de Pilogel;
3. Água destilada ou água deionizada.

c) Procedimento:

1. Verificar visualmente condição de alimentação, ligações e eletrodos. Realizar registro no manual do instrumento sobre qualquer manutenção de rotina;
2. Explicar o procedimento para o paciente e pais. Dependendo do protocolo local isto pode incluir o fornecimento de um folheto ao paciente;
3. Utilizar um pisseti com água deionizada ou destilada e embeber uma bola de algodão;
4. Solicitar à mãe, pai ou responsável para remover do paciente roupas que favoreçam a exposição da área do braço onde será realizada a coleta do suor;
5. Qualquer dos braços podem ser usados;
6. Escolher a área da iontoforese. A superfície interna do antebraço é quase sempre a área mais satisfatória;
7. A pele deve estar lisa, livre de rugas e não deve estar machucada ou irritada. Em bebês muito pequenos, com pouca área do antebraço, a área da coxa pode ser utilizada como sítio de coleta;
8. Limpar a área usando uma bola de algodão hidrófilo umedecido em água deionizada ou destilada. Secar com algodão ou gaze limpa;
9. Umedecer a pele com um novo chumaço de algodão embebido em água destilada ou deionizada para garantir o bom fluxo da pilocarpina na região a ser estimulada;

10. Colocar um disco de gel de pilocarpina em cima de cada eletrodo assegurando que haja um bom contato;
11. Posicionar os dois eletrodos na posição do braço. O suor será produzido no local onde estiver posicionado o eletrodo vermelho, ou seja, no pólo positivo;
12. Selecionar uma posição que garanta um melhor contato do coletor *Macroduct*, ou seja, mais afastado do punho;
13. Assegurar uma distância de no mínimo 2cm entre os eletrodos, evitando qualquer ponte de corrente sobre a superfície da pele entre eles. Se necessário, o eletrodo negativo pode ser colocado sobre a superfície exterior do antebraço, ou na parte superior do braço. Embora o princípio seja o mesmo para todas as versões do sistema *Wescor*, as instruções do fabricante fornecidas em cada unidade, devem ser seguidas em todos os casos;
14. Ligar a unidade a um transformador de alimentação. Esperar a mudança da luz vermelha para verde no sistema;
15. Adaptar os eletrodos no equipamento de indução de corrente elétrica e carregar no botão Iniciar. Ao término uma luz indicativa no aparelho indutor e também um alarme sonoro indica que a iontoforese foi concluída;
16. Após, remover os eletrodos do braço. Normalmente a área visivelmente estimulada apresenta-se rosa ou vermelha;
17. Limpar com algodão embebido em água deionizada ou destilada a área que ficou sob o eletrodo vermelho (positivo) pelo menos três vezes, secando a seguir com algodão ou gaze seca;
18. Afixar nesta área o coletor *Macroduct* firmemente com auxílio da pulseira de velcro, sem comprimir a área;
19. Deixar na posição por pelo menos 20 minutos, mas nunca por mais de 30 minutos;
20. O volume suficiente corresponde à 2 voltas da serpentina do coletor *Macroduct* que corresponde à aproximadamente 15uL de suor;
21. Deixar o *Macroduct* ainda preso ao braço do paciente, remover a capa plástica de polipropileno que existe acima da bobina onde está o suor;

22. Remover o suor da serpentina com auxílio da ferramenta extratora (tubo distribuidor) que acompanha o equipamento evitando perda do suor e formação de bolhas;
23. Cortar a extremidade bem próxima ao *Macroduct* e colocar este corte final no auto-analisador apertando em seguida a ferramenta de extração (tubo indutor) para que haja a transferência do suor, evitando bolhas;
24. O volume mínimo aceitável de suor corresponde a $1\text{g}/\text{m}^2/\text{min}$ ou 12ul com 20 minutos para uma coleta, ou 18ul com 30 minutos para uma coleta;
25. Avaliar se a amostra está adequada imediatamente após a coleta. Coletas de 12uL ou inferior, coletadas em 20 minutos ou de 18ul ou inferior coletadas em 30 minutos não deve ser analisadas;
26. Proceder a leitura da condutividade no equipamento e registrar a leitura no protocolo do exame.

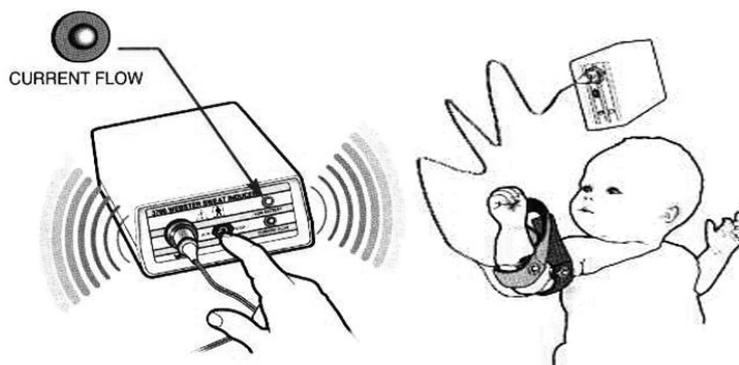
A produção de suor decresce rapidamente depois de 30 minutos. Coletas insuficientes não devem ser combinadas para fornecer um volume suficiente para análise.

Se a análise do suor não puder ser realizada imediatamente a coleta deve ser repetida. Se a amostra necessitar ser transportada para um local diferente para a análise, recomenda-se que o suor seja armazenado em um tubo capilar de vidro liso rotulados. Um diferencial de ar deve ser deixado em ambas extremidades, que são então seladas com plasticina. Essa amostra pode ser utilizada até 6 horas.

3.9 ANÁLISE DO SUOR - DETERMINAÇÃO DA CONDUTIVIDADE NO SUOR – *WESCOR* - TÉCNICA QUALITATIVA

3.9.1 Coleta do Suor

O indutor de suor *Webster* é parte integrante do Sistema de Coleta de Suor por Macroduto (Figura 15).



referência não encontrada.

Erro! Fonte de

FIGURA 15 - INDUTOR DO SUOR

FONTE: WESCOR (2002)

Quando a chave do equipamento estimulador é ligada, um breve sinal mostra que a resistência do circuito externo do eletrodo é aceitável, e que o sistema iniciou o envio da corrente iontoforética. O envio da corrente é confirmado por um indicador de corrente elétrica. O sinal soa novamente de forma breve, ao completar a iontoforese.

A corrente iontoforética aumenta a 1,5 mA durante um intervalo de 25 segundos; permanece a 1,5 mA por somente 5 minutos, depois diminui nos 5 minutos finais para quase “zero”, quando o aparelho desliga.

Durante a seqüência completa da iontoforese, a carga total enviada para o eletrodo positivo é de aproximadamente 450 millicoulombs ou 78 millicoulombs/cm².

Devido a impurezas no ágar, o disco de Pilogel contém sódio e outros cátions em uma concentração molar aproximadamente igual ao íon *pilocarpinium*. Estes competem entre eles para o transporte das cargas elétricas que reduz aproximadamente 50% na quantidade de pilocarpina que poderia ser enviada para as glândulas, na presença de tais sais. Entretanto, quantidade suficiente da droga é transportada para produzir o máximo de estimulação de suor (Figura 16).

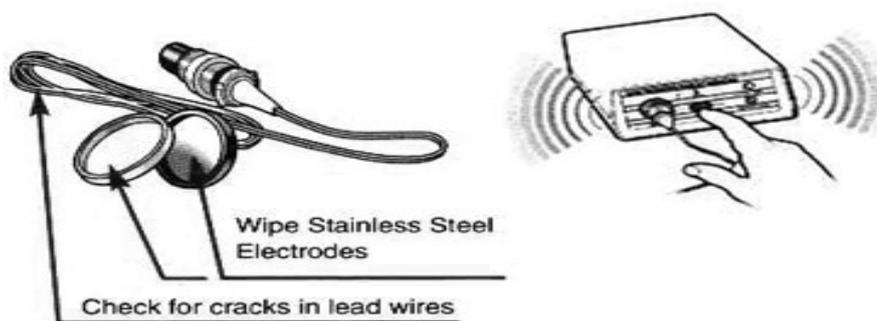
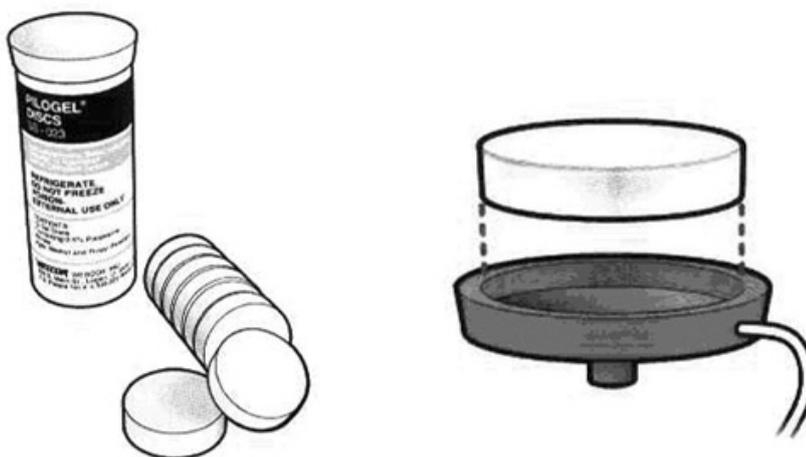


FIGURA 16 - ELETRODOS

FONTE: WESCOR (2002)

Os eletrodos são de aço inoxidável e requerem manutenção mínima. Consiste em limpá-los com água destilada após cada uso, ficando prontos para o próximo procedimento (Figura 17).

A solução reagente tradicional para a iontoforese com pilocarpina é o nitrato de pilocarpina e o nitrato de sódio. Estas substâncias estão aplicadas tanto no papel absorvente (como a gaze) ou aos discos de papel espessos que estão interpostos entre a superfície do eletrodo e a pele.



Erro! Fonte de

referência não encontrada.

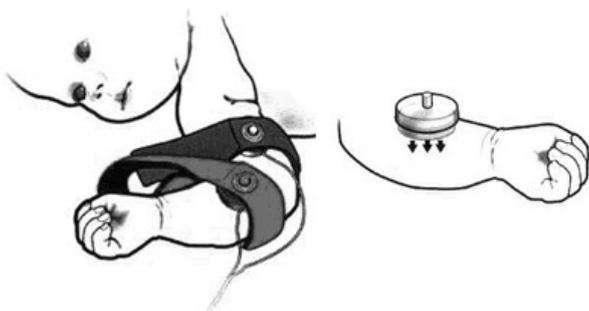
FIGURA 17 - DISCOS DE PILOGEL

FONTE: WESCOR (2002)

Os discos de iontoforese pilogel são um gel sólido de ágar que é composto de 96% de água, na qual se dissolveu 0,5% de nitrato de pilocarpina e traços de um composto antifúngico.

Os discos são de aproximadamente 6mm de espessura e dimensionados para encaixar perfeitamente nos eletrodos padrões *Wescor*.

Os discos são usados nos eletrodos positivos e negativos. A estimulação do suor ocorre no eletrodo positivo enquanto que o disco no eletrodo negativo completa o circuito elétrico (Figura 18).



Erro! Fonte de referência não encontrada.

FIGURA 18 - ADAPTAÇÃO DOS ELETRODOS NO BRAÇO DO RN - PRODUÇÃO DE SUOR EFICAZ

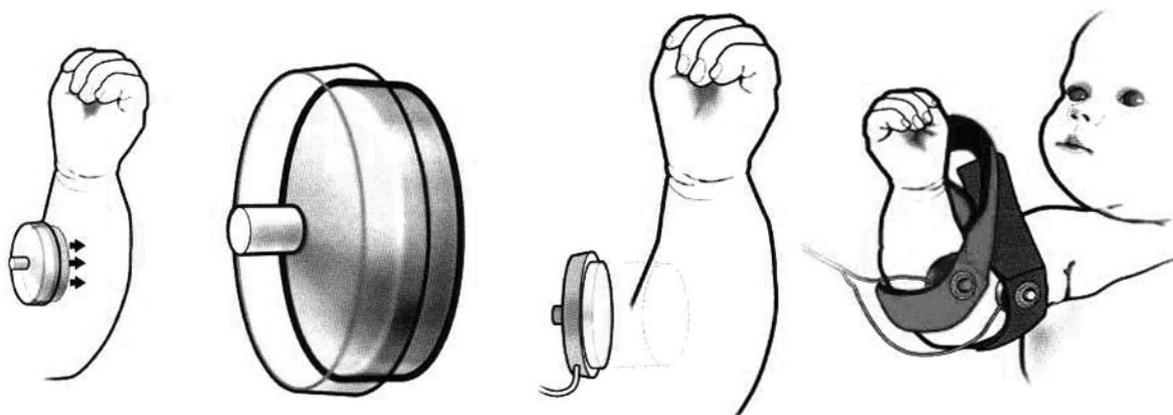
FONTE: WESCOR (2002)

O contato gel-pele assegura que a pilocarpina penetre em toda a área da pele recoberta, permitindo total estimulação da glândula e máxima produção de suor.

Apesar de ser bastante úmido, com uma superfície molhada sobre a pele, o disco Pilogel não exsuda líquido, mesmo sob pressão aplicada durante a colocação da braçadeira.

O Pilogel elimina a necessidade de aplicar gaze ou papel absorvente. Os discos estão prontos para uso. Não há necessidade de preparar ou armazenar

soluções reagentes. Com Pilogel, os eletrodos, uma vez colocados, não precisam de maior atenção durante a iontoforese (Figura 19).



Erro! Fonte de referência não encontrada.

FIGURA 19 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO ELETRODO - QUEIMADURAS DURANTE A IONTOFORESE

FONTE: WESCOR (2002)

Este sistema é bastante utilizado em clínicas e hospitais no mundo inteiro. Apesar de ser um método superior, queimaduras durante a iontoforese não estão totalmente descartadas. Conforme relatos práticos, foi estimada uma frequência de 1 queimadura em 50.000 procedimentos de iontoforese (NCCLS, 2000).

As queimaduras variam de pequenos pontos pretos na pele à queimaduras de 3º grau, como crateras, com 2 a 3 mm de diâmetros. Em muitos casos reportados,

as crianças não tinham sinais de dor ou desconforto durante o procedimento, e a queimadura não foi descoberta até que os eletrodos foram removidos.

3.9.2 Recomendações para Prevenir as Queimaduras

Não usar discos Pilogel que tenham aparências estranhas (fraturas, etc). As braçadeiras devem fazer um firme contato entre a pele e o disco do gel. A pressão não deve ser tão forte a ponto de quebrar o disco entre a pele e o eletrodo (Figura 20).



Erro! Fonte de referência não encontrada.

Erro! Fonte de referência não encontrada.

FIGURA 20 - RECOMENDAÇÕES PREVENTIVAS DE QUEIMADURAS

FONTE: WESCOR (2002)

Deixar a pele levemente úmida após lavar a área onde os eletrodos serão colocados ou adicionar uma gota de água na pele ou na superfície do Pilogel (após a instalação no eletrodo) (Figura 21).



Erro! Fonte de referência não encontrada.

FIGURA 21 - *MACRODUCT*

FONTE: WESCOR (2002)

O coletor de suor *Macroduct* é um dispositivo descartável, de plástico com uma superfície côncava rasa que cobre a área da pele previamente estimulada com iontoforese pela pilocarpina. A superfície de coleta tem um contorno tal que quando firmemente aplicada sobre a área estimulada, a pele torna-se abaulada para dentro da concavidade, sem espaço para o ar. No ápice da superfície cônica, um minúsculo orifício leva a um pequeno tubo plástico ou duto, que tem um diâmetro interno de aproximadamente 0,64mm enrolado numa espiral.

A base da glândula do suor é de 2 a 3 mm sob a superfície da pele. Fluidos secretados pela glândula criam uma pressão hidráulica que move o fluido para fora através do ducto do suor, que emerge para a pele como suor. Sob o coletor de suor *Macroduct*, a mesma pressão hidráulica força o suor para a interface sem ar, entre a pele e superfície côncava do coletor. Como a pressão da pele contra a superfície do coletor está aumentada na borda, e diminuída no centro, o suor secretado é direcionado para o orifício e para dentro do plástico *Macroduct*.

Depois, o suor torna-se visível no tubo espiral do *Macroduct* dentro de 1 a 4 minutos, dependendo da elasticidade da pele e proporção de suor do paciente (Figura 22).



Erro! Fonte de referência não encontrada.

FIGURA 22 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO CORANTE NO *MACRODUCT*

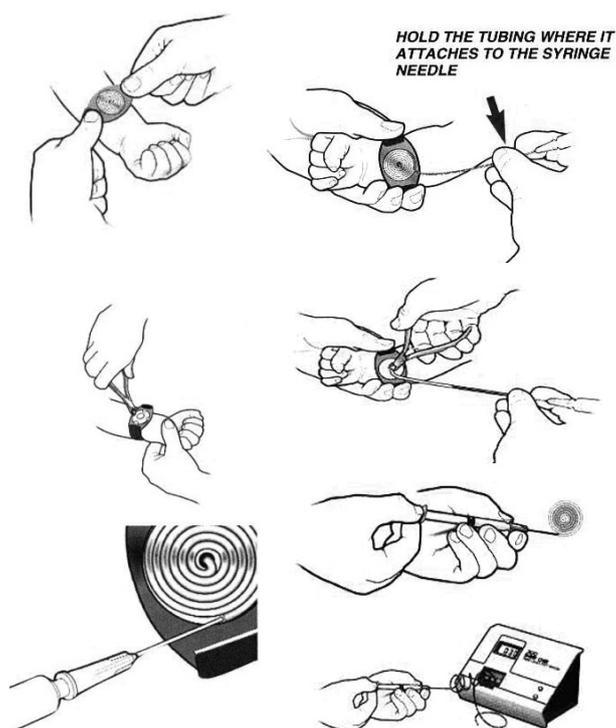
FONTE: WESCOR (2002)

O suor que emerge torna-se azul pelo contato com uma pequena quantidade (≤ 10 nano moles) de corante azul solúvel em água (corante para alimento certificada pelo CDC dos EUA) aplicada sobre a superfície do coletor *Macroduct*. Isto permite uma rápida visualização do volume produzido a qualquer tempo durante a coleta.

Este corante não interfere com o teste do suor por colorimetria. O corante contribui para a osmolaridade e quantidade de sódio na amostra do suor. A capacidade do espiral de coleta é de aproximadamente 85 μ l. Este volume é suficiente para todos os métodos padrões para a análise do suor.

Ao final do tempo de coleta, o *kit* permanece no local, enquanto a serpentina tubular contendo a amostra do suor é removida, cortando-se o plástico no seu ponto de inserção.

O *Macroduct* permite a visualização da produção do suor a qualquer tempo pela referência do diagrama de calibração sob o tubo espiral. Uma coleta de 30 minutos geralmente produz de 50 a 60 microlitros de suor, apesar da diferença entre indivíduos ser muito grande (Figura 23).



Erro! Fonte de referência não

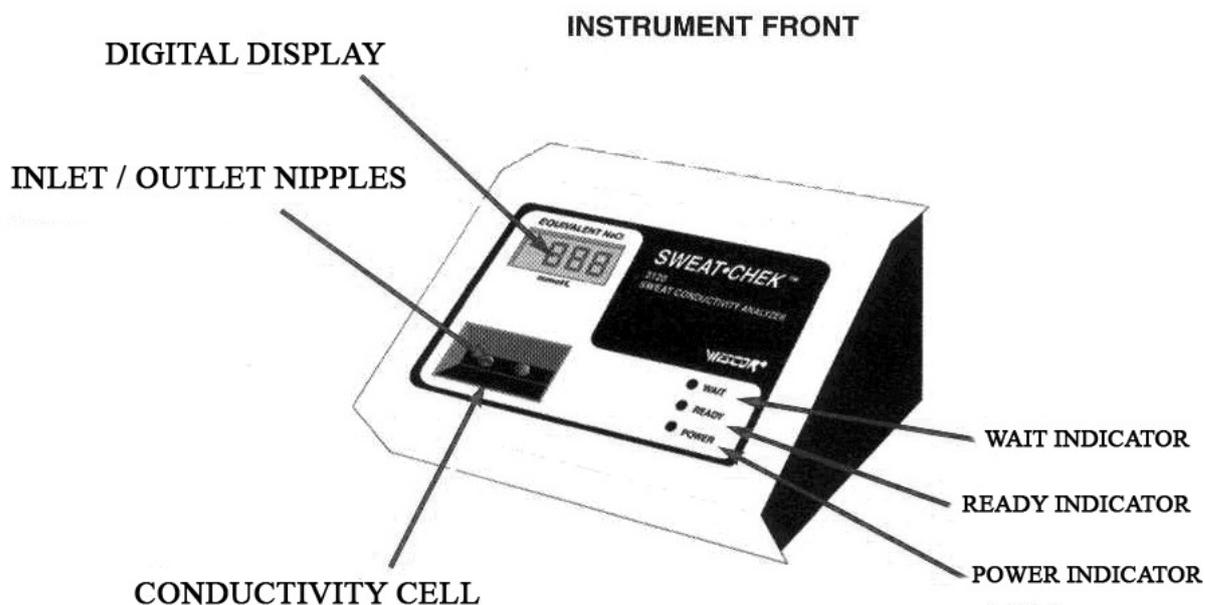
encontrada. Erro! Fonte de referência não encontrada.

FIGURA 23 - REMOÇÃO E ARMAZENAMENTO DO SUOR COLETADO
 FONTE: WESCOR (2002)

3.9.3 Remoção e Armazenamento da Amostra de Suor Coletado

Este procedimento deve ser realizado enquanto o coletor *Macroduct* ainda está firmemente aderido no braço. A remoção completa do dispositivo antes de retirar o tubo coletor pode criar um vácuo que irá puxar o suor coletado para dentro da pele, reduzindo seriamente o volume da amostra.

O suor, após análise para a condutividade, é transferido para um pequeno frasco selado, após o qual é analisado para determinação do cloreto (Figura 24).

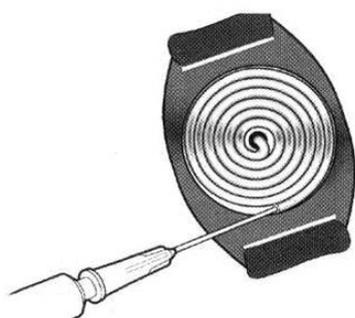


Erro! Fonte de referência não encontrada.

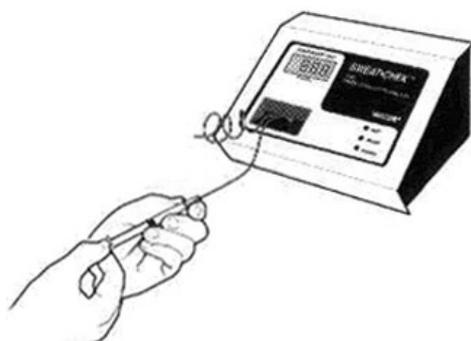
FIGURA 24 - – EQUIPAMENTO LEITOR DA CONDUTIVIDADE “SWEAT CHECK”
 FONTE: WESCOR (1999)

Normalmente, a amostra de suor é introduzida diretamente dentro da célula de condutividade através do tubo de coleta *Macroduct* (Figura 25).

Uma coleta típica produzirá um volume de suor superior ao necessário para o teste. Nos casos em que o volume de suor está abaixo da média, a dosagem é possível, utilizando-se de 6 a 10 microlitros de suor; porém técnica cuidadosa e precisa é obrigatória, pois o posicionamento da amostra dentro da célula é crítica. Se o volume é insuficiente para estabelecer o contato entre os eletrodos na célula de condutividade (aproximadamente 6 microlitros), não será possível realizar a dosagem (Figura 26).

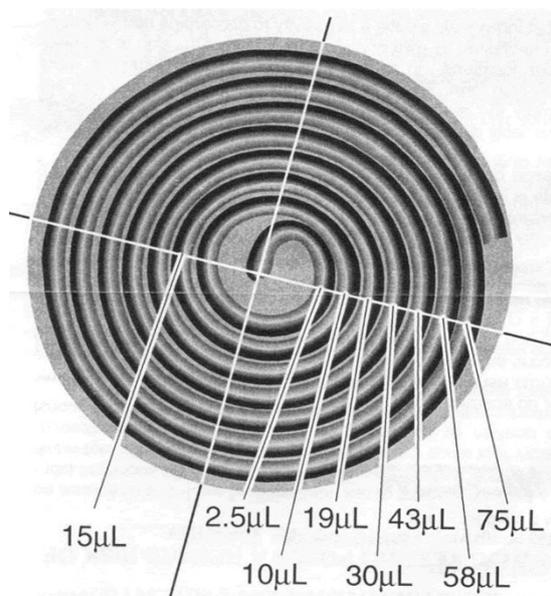


Erro! Fonte de referência não encontrada.



Erro! Fonte de referência não encontrada.

FIGURA 25 - - LEITURA DA CONDUTIVIDADE NO "SWEAT CHECK"
FONTE: WESCOR (1999)



Erro! Fonte de referência não encontrada.

FIGURA 26 - – QUANTIDADE DE SUOR COLETADA NO MACRODUTO”

NOTA: Mínimo de 03 voltas (19ul) para Cloridrômetro – Teste Quantitativo

FONTA: WESCOR (1999)

3.9.4 Leitura

O *Sweat-Check* tem uma resposta característica estável, que é praticamente linear dentro da faixa crítica de 75 a 110 mmol/L. Em faixas muito baixas, haverá um pequeno erro positivo na leitura, e em faixas muito altas, um pequeno erro negativo. Estes erros não invalidam o resultado diagnóstico.

3.9.5 Controle de Qualidade

Recomenda-se o uso de soluções comerciais de controle de qualidade, preferencialmente em três níveis de medição da condutividade do suor - Condutividade do suor como equivalente NaCl (mmol/l):

- Aproximadamente 40 mmol/L – Normal;
- Aproximadamente 70 mmol/L – Normal-Alto/Duvidoso;
- Aproximadamente 130 mmol/L – Anormal.

Os limites de normalidade, limítrofe e anormal da condutividade foram estabelecidos em referência aos dados publicados usando equação relacionando condutividade por cloreto (Hammond 1994).

Para resultados na faixa limítrofe (60-80 mmol/l) deve-se observar fatores como idade, estado de hidratação, história familiar de FC, etc.

É conhecido que a concentração dos eletrólitos diminui com o tempo.

O suor obtido (usualmente de 50-60 μ l em 30 minutos usando *Macroduct*) passa do começo do tubo de coleta do *Macroduct* para célula de condutividade onde é lido. A variação será pequena em comparação com a diferença entre normal e anormal e dessa forma não irá confundir o diagnóstico.

A leitura em mmol/l (equivalente NaCl) significa que a amostra de suor tem uma condutividade equivalente a solução de NaCl (à mesma temperatura).

3.9.6 Observações

O nível da condutividade elétrica está em função direta com a concentração de moléculas ionizadas na solução. Amostras de suor são compostas de Na^+ , K^+ e uma pequena concentração de amônia como contribuição.

O balanço aniônico desses é dado principalmente por Cl^- , lactato e bicarbonato, de tal forma que a condutividade pode ser vista como a medida da concentração total dos eletrólitos em mmol/l. O eletrólito selecionado como referência na calibração é o NaCl, mas poderia ser qualquer outro sal.

O intervalo de referência para condutividade no suor será baseado em comparação com o valor do calibrador, e será válido enquanto o eletrólito for usado como referência. A variação da condutividade é diferente da variação de cloreto devido à presença de concentração significativa de íons não cloreto no suor. Hammond et al. demonstraram que 50mmol/l de condutividade equivale à 28 mmol/l cloreto (HAMMOND, 1994). O intervalo de confiança vai de 0-150 mmol/l.

3.9.7 Linearidade da Condutividade e Concentração de Eletrólitos

Os dados produzidos pela *Wescor* estão baseados no calibrador do instrumento de um único ponto: 90mmol/l (equivalente NaCl), quando o registro da

leitura apresenta para soluções padrão/NaCl no intervalo de 0-150 mmol/l. O ponto de calibração 90 mmol/l foi escolhido pois coincide com aproximadamente o ponto médio e o valor mais baixo publicado para FC. Os resultados mostram que a resposta é razoavelmente linear de 20 a 90 mmol/l. O erro nesta faixa é relativamente constante e representa um valor verdadeiro superestimado de 2 mmol/l reduzindo para zero até 90 mmol/l. Na faixa de 90-140 mmol/l o erro começa subestimado e aumenta de zero 90mmol/l para 6 mmol/l abaixo do valor real de 140 mmol/l, intervalo que corresponde aos valores registrados de FC.

3.10 DETERMINAÇÃO DE CLORETO NO SUOR – TÉCNICA QUANTITATIVA

3.10.1 Princípio do Método

O cloridômetro digital (*Labconco®*) é um titulador colorimétrico designado à determinar a concentração de íons cloreto em uma solução. Ele mostra a concentração direta em miliequivalentes de cloreto por litro quando 10ul ou 100ul de amostra é utilizado. A combinação de íons de prata e íons de cloreto em uma reação quantitativa resulta em um precipitado insolúvel de cloreto de prata (AgCl). Esta reação é realizada a uma velocidade pela passagem de uma corrente direta fixa entre o par de eletrodos de prata imersos na solução ácida. O anodo que é consumido na reação é um arame de prata numa bobina contínua. Tão logo a porção imersa de prata seja consumida um arame novo é imerso da bobina. Quando o ponto equivalente da reação é atingido, um aumento da corrente é detectado entre o par de eletrodos indicadores. Na presença de indicador de corrente o instrumento automaticamente interrompe o aumento na contagem e a geração de íons prata. Uma vez que a geração de corrente é constante, o tempo da titulação é diretamente proporcional ao número de íons cloreto que é adicionado (amostra). O instrumento mostra o tempo relativo em unidades de mEq Cl/l.

Em resumo, o reagente ácido é uma solução eletrolítica completa para uso em titulação colorimétrica de íons cloreto. Alíquotas de amostra são adicionadas ao reagente e misturadas formando uma solução homogênea e tituladas contra íons de prata no método desenvolvido pelo Dr. Ernest Cotlove, *et. al.*, em 1958. Uma corrente direta e constante passa entre o par de eletrodos de prata gerando íons

prata em um valor conhecido. Esses íons reagem quantitativamente com os íons cloreto formando um precipitado insolúvel de cloreto de prata (COTLOVE, 1958):

$$\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \rightarrow \text{AgCl (ppt)}.$$

O ponto de equivalência da reação é determinado amperometricamente pelo aumento da corrente detectado no par de eletrodos sensíveis. Desta forma, a medida do número de íons cloreto na solução é diretamente proporcional à duração da corrente elétrica (Figura 27).



FIGURA 27 - – *DIGITAL CHLORIDOMETER* – MODELO 442-5100 (115V/50HZ)
LABCONCO CORPORATION”

FONTE: LABCONCO (2003)

a) Material necessário:

- Pipeta graduada 5 - 10 ml
- Pipeta Conta gotas
- Cubas de vidro (Tubo de leitura) 20 x 40 mm
- Gaze hidrófila
- Estante
- Água deionizada
- Reagente de Gelatina
- Solução àcida
- Solução Controle 50mmol/l Cl
- Solução Controle 100 mmol/l Cl
- Pasta polidora de prata
- Micropipeta de 10 ul

- Ponteiras
- Pisseti com água deionizada ou destilada
- Luvas (sem talco)
- Recipiente para descarte das ponteiras (Becker)
- Becker para auxílio na lavagem dos eletrodos

b) Reagentes:

1. Solução Ácida

- Ácido Nítrico.....3,2 ml
- Ácido Acético Glacial.....50 ml
- Água Deionizada ou destilada....qsp 500 ml
- Armazenar à temperatura ambiente em frasco de vidro. O reagente é estável por 06 meses.

2. Reagente de Gelatina

- Gelatina/Timol.....6,2 g
- Água deionizada ou destilada (fervente)....1000 ml
- Dividir em alíquotas de 10 ml, e retirar da geladeira somente a alíquota que será utilizada.
- Armazenar à 4°C – Estável por 06 meses na geladeira

3. Calibrador 50 mmol/l

- Cloreto de Sódio desidratado.....2,9220 g
- Água deionizada ou destilada1000 ml
- Separar em alíquotas menores e retirar da geladeira somente a alíquota que será utilizada
- Armazenar à 4°C – Estável por 03 meses na geladeira

4. Controle 10 mmol/l

- Cloreto de Sódio desidratado.....0,5844 g
- Água deionizada ou destilada1000 ml
- Separar em alíquotas menores e retirar da geladeira somente a alíquota que será utilizada

- Armazenar à 4°C – Estável por 03 meses na geladeira
5. Controle 100 mmol/l
- Cloreto de Sódio desidratado.....5,8441 g
 - Água deionizada ou destilada1000 ml
 - Separar em alíquotas menores e retirar da geladeira somente a alíquota que será utilizada
 - Armazenar à 4°C – Estável por 03 meses na geladeira

c) Procedimento (Branco):

1. Pipetar na cuba de titulação 4 ml da Solução Ácida;
2. Adicionar 04 gotas do Reagente de Gelatina;
3. Posicionar a cuba no suporte do titulador e suspender até imergir a solução no eletrodo;
4. Posicionar a chave seletora em *Low* e apertar a chave *Start*;
5. Em poucos segundos o display mostra o resultado obtido;
6. Repetir o Branco em outra cuba;
7. Registrar as leituras do Branco obtidas. Calcular o valor médio;
8. Ajustar o valor médio obtido do Branco no instrumento.

d) Amostras, controles e calibradores:

1. Pipetar 4 ml da solução ácida na cuba;
2. Adicionar 04 gotas do reagente de gelatina;
3. Pipetar 10 ul da amostra, controle ou calibrador;
4. Adaptar a cuba no suporte do titulador e suspender até imergir a solução nos eletrodos;
5. Posicionar a chave seletora em *Low* e apertar a chave *Start*;
6. Registrar a leitura obtida;
7. Para nova titulação da amostra, repetir os passos 03, 04 e 05;
8. Lavar os eletrodos com o pisseti de água deionizada e secar cuidadosamente com uma gaze;

9. Testar a amostra em duplicata, registrar os valores obtidos calculando a média.

e) Registro dos resultados:

1. Arredondar os resultados o mais próximo de uma casa decimal;
2. Comparar os resultados da duplicata. Eles devem concordar em 10 mmol/l para valores menores ou iguais à 60 mmol/l e dentro de 15 mmol/l para valores maiores que 60 mmol/l;
3. Checar se os controles estão dentro do limite aceitável (\pm 2 SD).

f) Valor de referência:

- Concentração de Cl⁻ Suor < 40 mmol/l – Normal;
- Concentração de Cl⁻ Suor entre 40 – 60 mmol/l – Limítrofe;
- Concentração de Cl⁻ Suor > 60 mmol/l – Compatível com diagnóstico de FC.

g) Observações:

Valores de concentração de cloreto no suor devem estar consistentes com a indicação clínica para o diagnóstico da Fibrose Cística. Dados dos Programas de Triagem Neonatal sugerem que a concentração de cloreto no suor acima de 40 mmol/l em criança jovem (menor que 01 mês de vida) parece ser sugestivo de FC. Não existe correlação direta entre os eletrólitos no suor e a severidade da doença, contudo, pacientes com FC com suficiência pancreática tendem a ter valores mais baixos (LABCONCO, 2033; NCCLS, 2000).

4 RESULTADOS

4.1 NÍVEIS DE IRT EM PACIENTES COM SUSPEITA DE FC SUBMETIDAS AO TESTE DO SUOR

Constituíram a amostra deste estudo 2309 RN cujo teste do suor foi realizado sendo que em 99 (4,3%) o teste precisou ser retestado por volume inicial de suor insuficiente. Dos 2309 RN, por conveniência foram selecionados 444 RN cujos resultados do teste de suor foram normais e que, portanto, tiveram afastado o diagnóstico de FC, sendo 185 (41,6%) do sexo masculino, 234 (52,7%) do sexo feminino e 25 (5,6%) sem informação disponível quanto ao gênero. Quatrocentos recém-nascidos eram da cor branca (94,6%) com média de peso de nascimento de $3228,8 \pm 2352,8\text{g}$ (IC 95% = 3002,4 – 3455,4g), com mediana de 3110g, variando de 775,0 a 3601,0g.

O valor do IRT1, em média, obtido foi de $125,5 \pm 55,1\text{ ug/l}$ (IC 95% = 115,4 – 135,6), com mediana de 99,7 variando de 70,1 a 657,0 ug/ml; do IRT 2, em média de $113,8 \pm 56,4\text{ ug/l}$ (IC 95% = 103,5 – 124,2), com mediana de 91,0, variando de 70,6 a 674,0 ug/l e do IRT3, em 117 casos (26,3%) com valor, em média, de $136,9 \pm 194,2\text{ ug/l}$ (IC 95% = 101,3 - 172,4), com mediana de 86,1, variando de 17,8 a 999,0 ug/l. O Gráfico 1 ilustra os valores médios registrados nos três exames. Corresponde aos resultados médios de IRT obtidos no primeiro, segundo e terceiro exame do RN coletados em datas diferentes.

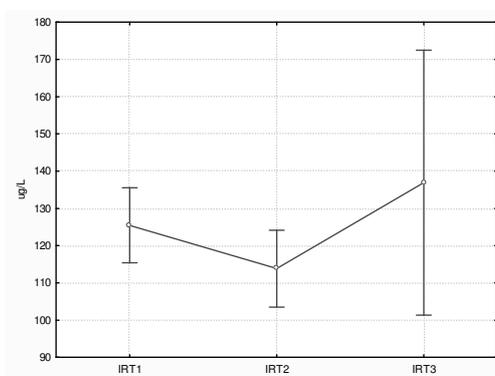


GRÁFICO 1 – MÉDIA E DP DOS VALORES DE IRT NO PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO EXAME

FONTE: O autor (2011)

O Gráfico 2 corresponde à distribuição dos valores de IRT obtidos no primeiro e no segundo exame do RN coletados em datas diferentes.

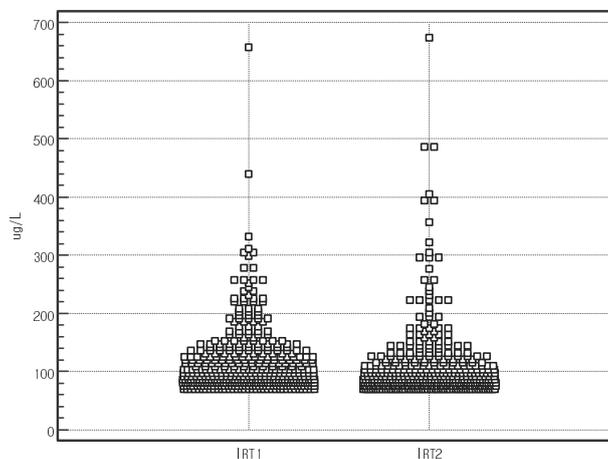


GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DO RESULTADO DO PRIMEIRO E O SEGUNDO EXAME
FONTE: O autor (2011)

O Gráfico 3 ilustra os valores da IRT1 (azul) e IRT2 (rosa).

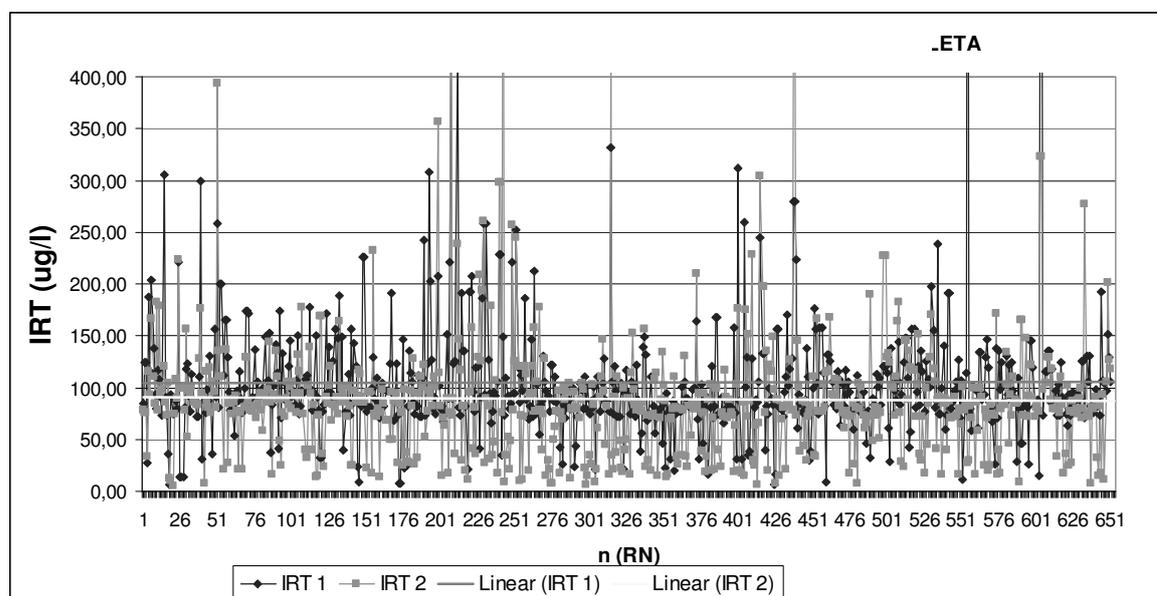


GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA IRT NA TRIAGEM INICIAL E NA RECOLETA

FONTE: O autor (2001)

4.2 NÍVEIS DE IRT EM PACIENTES COM FC

Constituíram a amostra deste estudo 90 RN com diagnóstico confirmado de FC, sendo 46 (51,1%) do sexo masculino e 44 (48,9%) do sexo feminino, 86 (95,5%) da cor branca, 04 (4,5%) da cor parda com média de peso de nascimento de 3091,2 \pm 477,9g, variando de 2000,0 a 3997,0g. A IRT 1 equivale ao primeiro resultado da triagem neonatal, a IRT2 corresponde ao resultado obtido após a convocação da criança para confirmação do resultado em nova coleta de sangue, e a IRT 3 corresponde à concentração da IRT no dia da consulta médica a qual não faz parte do protocolo de triagem neonatal mas foi utilizada neste estudo.

Na tabela 6 estão ilustrados os resultados obtidos da IRT nas três determinações.

TABELA 6 - VALORES DE IRT, MÉDIA, COEFICIENTE DE VARIAÇÃO, DP, VALOR MÍN. E MÁX., DE IRT OBTIDOS EM TRÊS COLETAS DISTINTAS DOS PACIENTES COM FC

	IRT 1 (n = 90)	IRT 2 (n = 84)	IRT 3 (n = 71)
Média (ug/l)	194,8	179,7	192,9
Coeficiente Variação	0,5	0,6	0,7
Desvio-Padrão	95,6	111,6	138,5
Valor Mínimo	73,1	74,8	51,0
Valor Máximo	657,0	674,0	746,0

FONTE: O autor (2011)

O gráfico 4 ilustra os valores registrados nos três exames. Representa o valor da IRT em três datas distintas das crianças detectadas com Fibrose Cística.

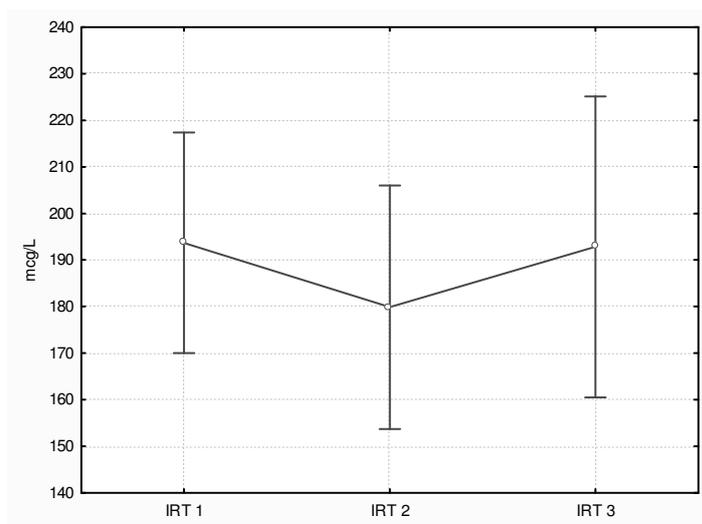


GRÁFICO 4 – MÉDIA, DP DOS VALORES DE IRT OBTIDOS EM TRÊS DETERMINAÇÕES DISTINTAS DE PACIENTES COM FC

FONTE: O autor (2011)

O gráfico 5 corresponde à distribuição dos valores de IRT obtidos no primeiro e no segundo exame, coletados em datas diferentes, de pacientes com FC.

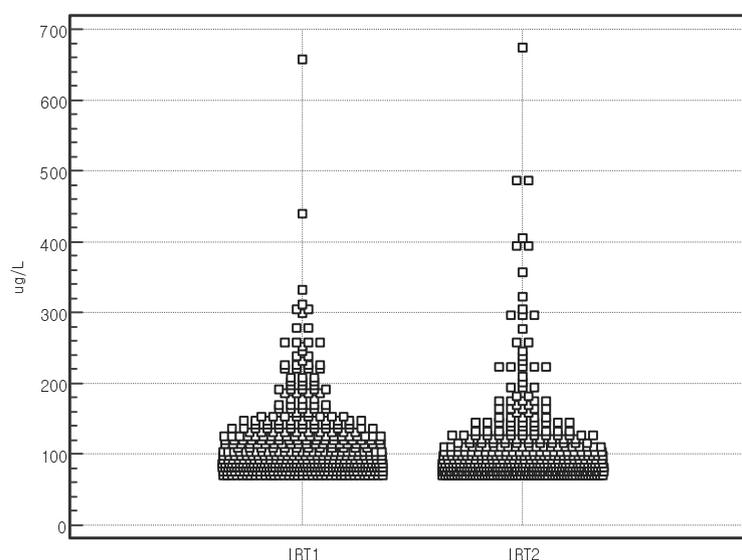


GRÁFICO 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DE IRT DO PRIMEIRO E SEGUNDO EXAME EM PACIENTES COM FC

FONTE: O autor (2011)

O gráfico 6 corresponde à distribuição dos valores de IRT obtidos no primeiro, segundo e terceiro exame, coletados em datas diferentes, de pacientes com FC.

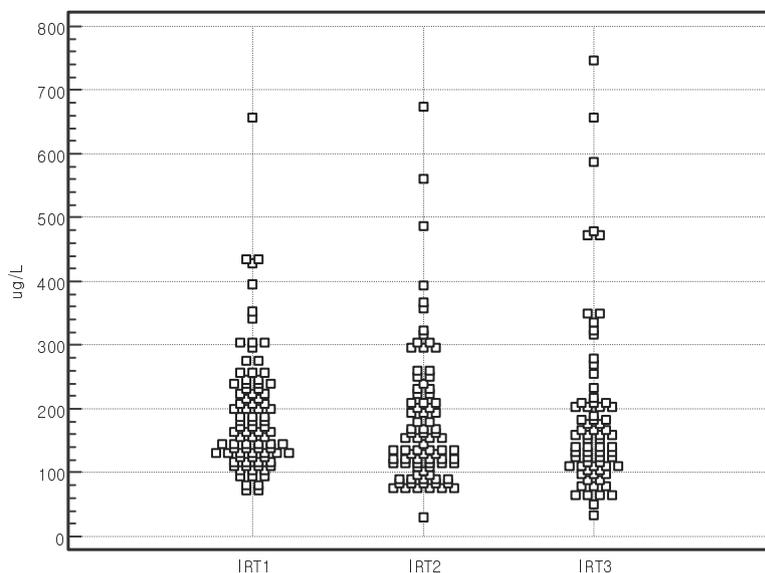


GRÁFICO 6 DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DE IRT DO PRIMEIRO, - SEGUNDO E TERCEIRO EXAME EM PACIENTES COM FC

FONTE: O autor (2011)

Comparando-se os resultados das dosagens de IRT1/IRT2, IRT1/IRT 3 e IRT2 IRT 3, não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,34$).

4.3 IDADE DA CRIANÇA NA TRIAGEM NEONATAL PARA FC

A mediana da idade do RN na triagem inicial de IRT, foi de 3 dias (IC 95% = 2,6 – 3,9), variando de 1 a 18 dias. O gráfico 7 ilustra a distribuição da idade no momento da realização do primeiro exame.

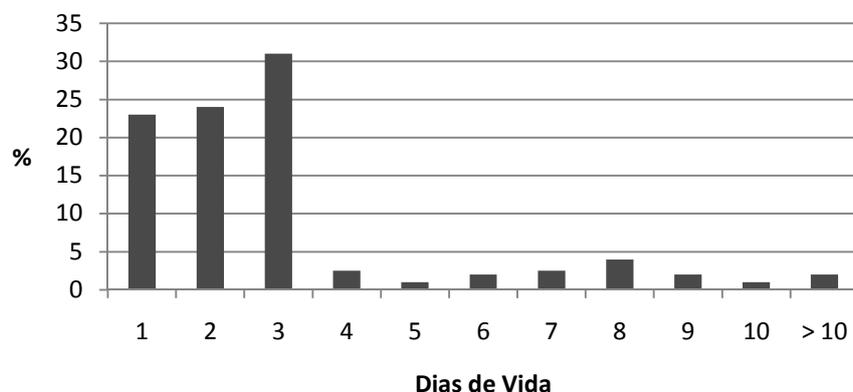


GRÁFICO 7 - DISTRIBUIÇÃO DA IDADE NO PRIMEIRO EXAME DE IRT

FONTE: O autor (2011)

A mediana da idade do RN no momento do segundo exame foi de 13 dias (IC 95% = 9,7 – 22,0), variando de 0 a 269 dias. O gráfico 8 ilustra a distribuição da idade no momento da realização do segundo exame.

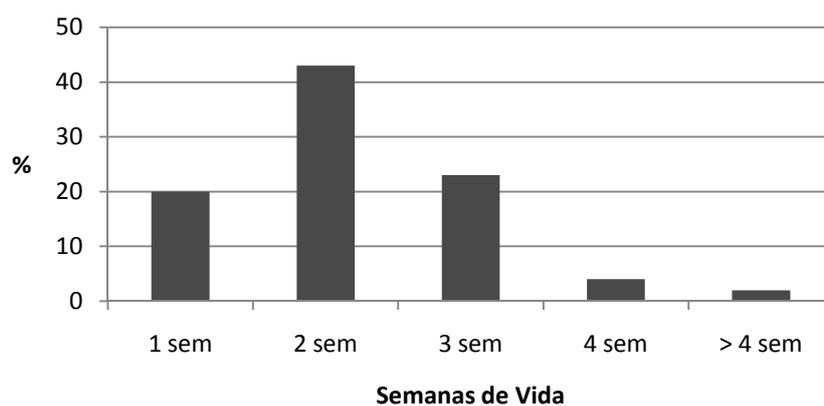


GRÁFICO 8 – DISTRIBUIÇÃO DA IDADE NO SEGUNDO EXAME DE IRT EM CRIANÇAS COM FC

FONTE: O autor (2011)

A mediana da idade do RN no momento do terceiro exame foi de 29,5 dias (IC 95% = 29,3 – 40,9), variando de 15 a 199 dias. O gráfico 9 ilustra a distribuição da idade no momento da realização do terceiro exame.

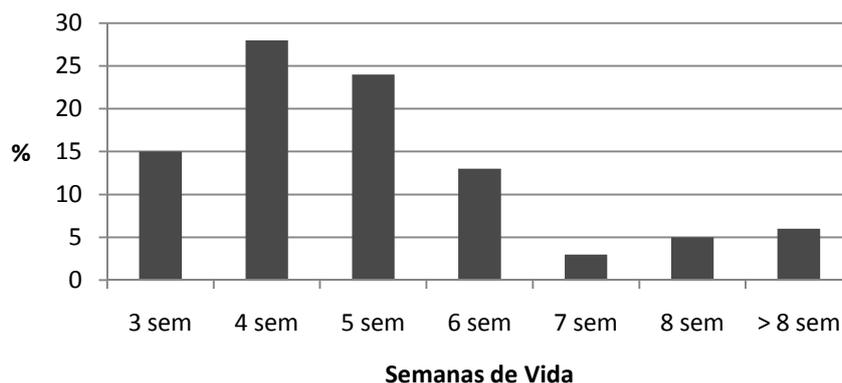


GRÁFICO 9 – DISTRIBUIÇÃO DA IDADE NO TERCEIRO EXAME DE IRT EM CRIANÇAS COM FC

FONTE: O autor (2011)

4.4 VOLUME DE SUOR EM RN COM SUSPEITA DE FC NA TRIAGEM NEONATAL

No gráfico 10 está ilustrada a escala ascendente de volume de suor de acordo com o aumento do peso da criança. No eixo (Y) o peso da criança no momento do exame da triagem em (g) e no eixo (x) as classes de volume de suor obtido pela estimulação com Nitrato de pilocarpina e coletado no sistema Macroduct (*Wescor*) para determinação da condutividade: a) Classe 1 - 10ul à 20ul de suor; b) Classe 2 - 20ul à 30ul de suor; c) Classe 3 - 30ul à 40ul de suor; d) Classe 4 - 40ul à 50ul de suor; e) Classe 5 - 50ul à 60ul de suor; f) Classe 6 - maior que 60ul de suor.

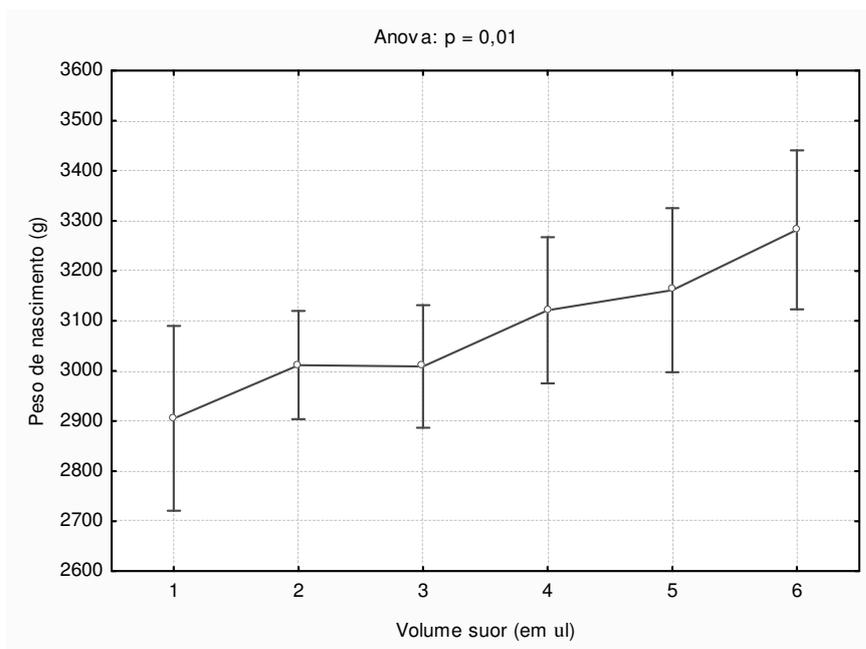


GRÁFICO 10 - VARIAÇÃO DO VOLUME DE SUOR DE ACORDO COM O PESO DA CRIANÇA

FONTE: O autor (2011)

O gráfico 11 ilustra a probabilidade de volume de suor de acordo com o peso da criança ao nascimento.

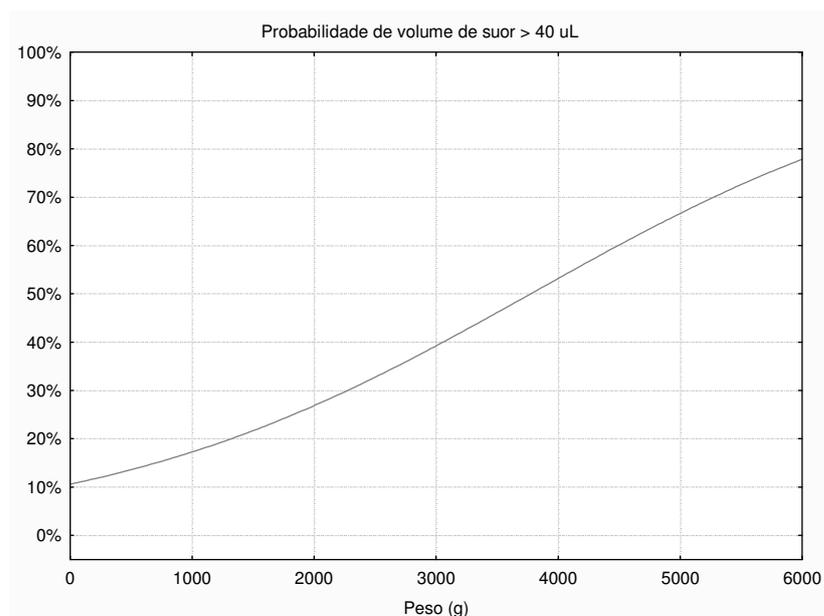


GRÁFICO 11 - PROBABILIDADE DE VOLUME DE SUOR DE ACORDO COM O PESO DA CRIANÇA

FONTE: O autor (2011)

4.5 CONDUTIVIDADE E DOSAGEM DE CLORETO

Na tabela 7 estão relacionados os resultados obtidos nas duas análises de suor realizadas em datas diferentes nas crianças com diagnóstico confirmado de FC pelos métodos quantitativo de dosagem de cloreto (Cl/mEq/l), método coulométrico e pela determinação da condutividade (Cond/mEq/l).

TABELA 7 - DOSAGEM QUANTITATIVA DE CLORETO E DA CONDUTIVIDADE EM PACIENTES COM FC

	MÉDIA (DP)	IC 95%	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Cl 1	91,9 ± 19,0	87,5 – 96,3	97,0	60,0	110,0
COND 1	102,4 ± 18,8	98,5 – 106,3	108,0	53,0	133,0
Cl 2	91,7 ± 19,0	86,4 – 96,9	97,5	60,0	115,0
COND 2	106,4 ± 18,9	102,6 – 110,2	110,0	57,0	129,0

NOTA: Cl = métodos quantitativo da dosagem de cloreto (Cl/mEq/l)

COND = método coulométrico da dosagem de cloreto (Cl/mEq/l)

1 e 2 correspondem ao primeiro e segundo exame

FONTE: O autor (2001)

Os gráficos 12 e 13 ilustram a correlação entre os resultados do suor obtidos pelo método quantitativo coulométrico e a condutividade na primeira amostra de suor e na segunda coletada do bebê respectivamente.

Observou-se forte correlação entre o teste coulométrico de determinação quantitativa de Cl e o teste da condutividade nas duas dosagens realizadas.

Quando o primeiro teste de condutividade foi positivo (> 50,0 mmol/l) em apenas 4 casos o cloreto foi negativo (< 60,0 mmol/l), ou seja foram encontrados 4 casos de falso positivo para o teste da condutividade.

Quando o segundo teste de condutividade foi positivo (> 50,0 mmol/l) em todos os casos o cloreto foi positivo (> 60,0 mmol/l), ou seja não foi encontrado caso de falso negativo no teste de condutividade.

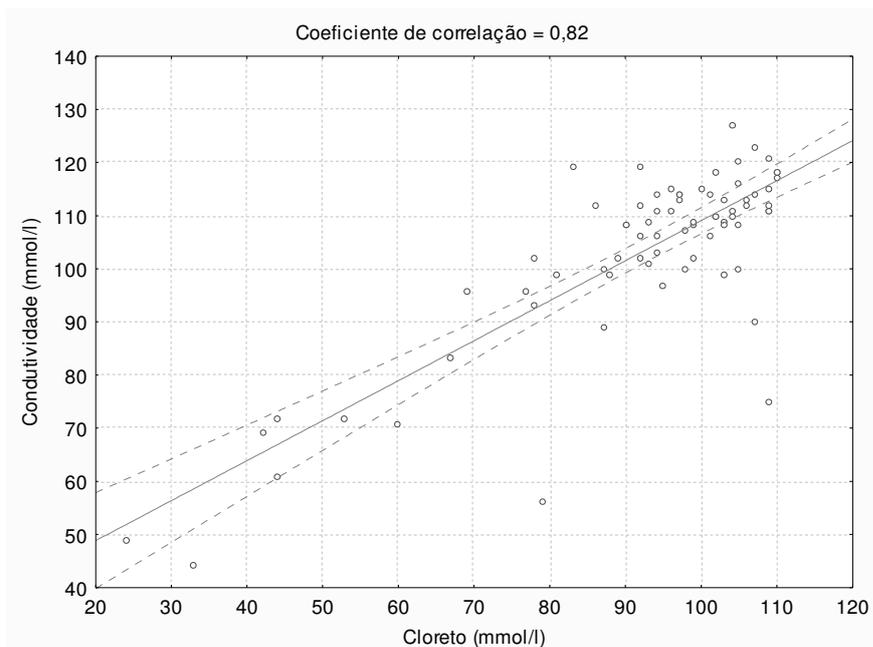


GRÁFICO 12 - CORRELAÇÃO ENTRE O TESTE COULOMÉTRICO QUANTITATIVO E A CONDUTIVIDADE (PRIMEIRO EXAME)

FONTE: O autor (2011)

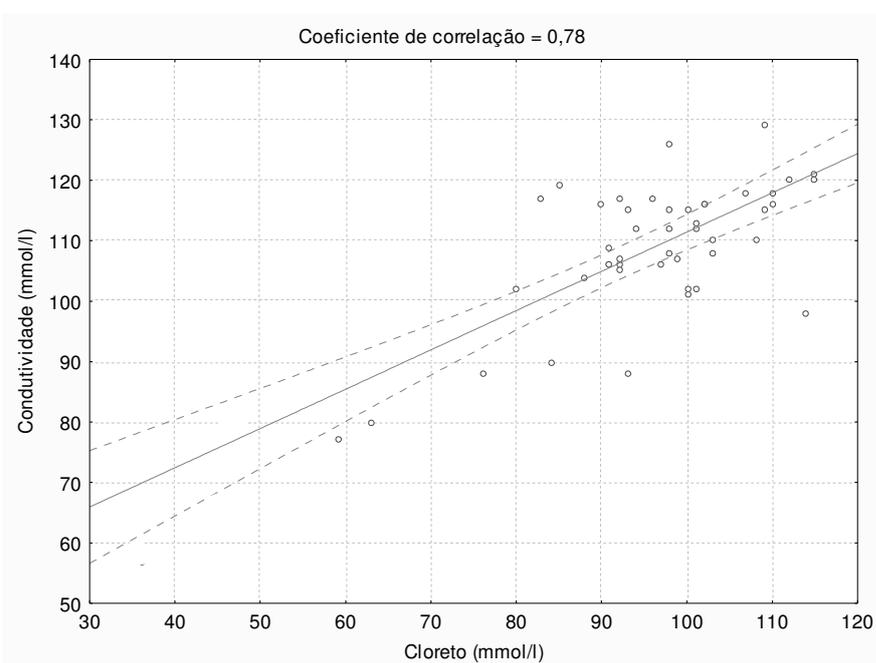


GRÁFICO 13 - CORRELAÇÃO ENTRE O TESTE COULOMÉTRICO QUANTITATIVO E A CONDUTIVIDADE (SEGUNDO EXAME)

FONTE: O autor (2011)

Na tabela 8 estão apresentados os valores do teste quantitativo coulométrico e de condutividade realizados.

TABELA 8 - DOSAGEM QUANTITATIVA DE CLORETO E DA CONDUTIVIDADE EM PACIENTES NÃO FC

	MÉDIA (DP)	IC 95%	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
CL 1	26,0 ± 32,2	23,0 – 29,0	12,0	3,0	35,0
COND 1	44,1 ± 29,5	41,3 – 46,8	32,0	6,0	48,0

Observou-se forte correlação entre o teste quantitativo de dosagem de cloreto (mmol/l) no suor e o teste de condutividade (mmol/l) (Gráfico 14).

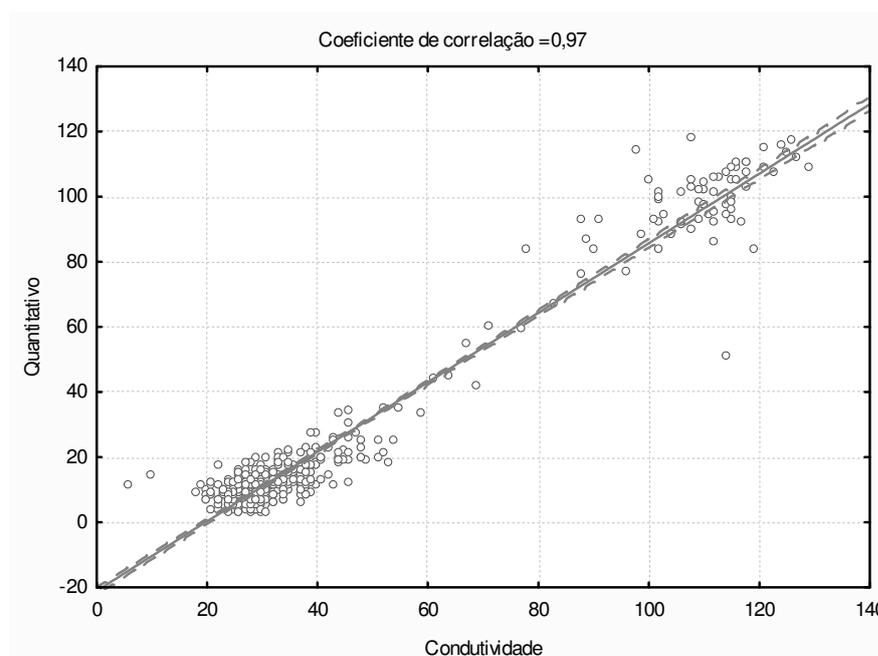


GRÁFICO 14 - CORRELAÇÃO ENTRE O MÉTODO QUANTITATIVO (PADRÃO-OURO) DE DOSAGEM DE CLORETO NO SUOR E O MÉTODO DA CONDUTIVIDADE NO SUOR

FONTE: O autor (2011)

Quando o teste de condutividade foi positivo (> 50,0 mmol/l) em apenas 14 casos o teste do suor quantitativo para pesquisa do cloreto (Coulométrico) foi negativo (< 60,0 mmol/l). Ou seja, somente 14 casos foram considerados falso positivo para o teste do suor pelo método da condutividade (Tabela 9).

TABELA 9 – CONCORDÂNCIA ENTRE O DIAGNÓSTICO PELA CONDUTIVIDADE E PELO TESTE QUANTITATIVO COULOMÉTRICO DE DOSAGEM DE CLORETO

		TESTE QUANTITATIVO		
		Positivo	Negativo	Total
CONDUTIVIDADE	Positivo	70	14	84
	Negativo	0	360	360
	Total	70	374	444

Coeficiente de Kappa = 0,89; $p < 0,001$

O teste de condutividade apresentou assim uma sensibilidade de 100,0%, especificidade de 96,2%, valor preditivo positivo de 83,3%, valor preditivo negativo de 100,0%, acurácia de 96,8%, índice de falso positivo de 16,7% e de falso negativo nulo. O ponto de corte indicado pela curva ROC foi de 69,0 mmol/l (AUC = 0,99, IC 95% = 0,98 – 1,00) (Gráfico 15).

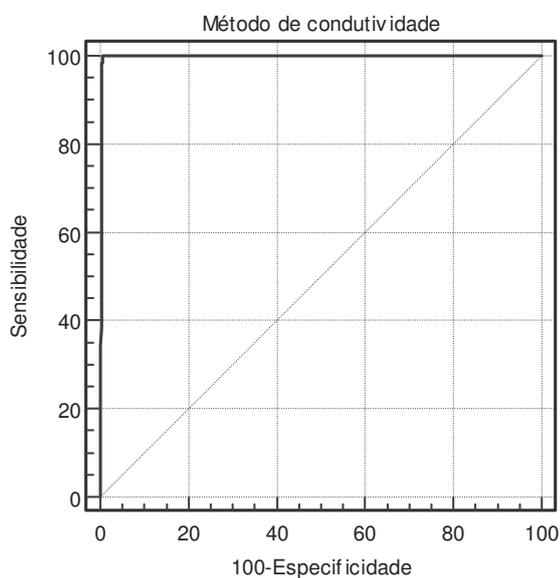


GRÁFICO 15 - CURVA ROC ENTRE O MÉTODO QUANTITATIVO (PADRÃO OURO) DE DOSAGEM DE CLORETO NO SUOR E O MÉTODO DA CONDUTIVIDADE NO SUOR

FONTE: O autor (2011)

4.6 VALORES MÉDIOS DE IRT, VOLUME DE SUOR, CONDUTIVIDADE E DE CL DE ACORDO COM A FAIXA DE PESO DO RN

Com a finalidade de verificar a influência do peso da criança nos níveis encontrados de IRT, no volume de suor obtido e nos valores de condutividade e da concentração de cloreto, os casos suspeitos na triagem neonatal foram agrupados em três categorias de peso: 1000g à 1999g (1), 2000g à 2999g (2) e maior que 3000g (3) (Tabela 10).

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DOS RN COM SUSPEITA DE FC NA TRIAGEM NEONATAL (NÃO CONFIRMADOS PELO TESTE DO SUOR) POR FAIXA DE PESO

CATEGORIA DE PESO	1 (n=18) 1000 à 1999g	2 (n=117) 2000 à 2999g	3 (n=213) > 3000g
Peso (g)	1670,0	2673,6	3392,4
IRT1 (ug/l)	125,5	99,9	102,2
IRT2 (ug/l)	105,3	87,7	89,6
Volume Suor (ul)	30,7	23,2	37,7
Condutividade (mmol/l)	30,1	32,6	41,5
Cloreto (mmol/l)	11,1	14,9	19,4
Relação	0,4	0,5	0,5
Cloreto/Condutividade (Média) = 0,4			
Valores de peso, IRT1, IRT2, Volume suor, condutividade e cloreto, estão expressos em média.			
Peso corresponde ao dado obtido da ficha de coleta do exame de IRT na triagem neonatal			

4.6.1 Análise Comparativa do Volume de Suor nas Categorias de Peso

Comparando-se a média dos resultados do volume de suor dos recém-nascidos nas três categorias foi encontrada uma diferença fortemente significativa entre as categorias 2 e 3 ($p < 0,001$). O mesmo achado não foi observado na comparação entre as categorias 1 e 2, e 1 e 3 ($p = 0,21$ e $p = 0,17$, respectivamente).

4.6.2 Análise Comparativa da Condutividade nas Categorias de Peso

Comparando-se a média dos resultados da Condutividade nos indivíduos das três categorias observou-se diferença significativa entre os valores de condutividade da Categoria 1 e 3, ($p = 0,04$) e também diferença fortemente significativa entre as categorias 2 e 3, ($p < 0,001$). O mesmo achado não foi observado quando se comparou os valores de condutividade nos indivíduos das categorias 1 e 2, ($p = 0,16$).

4.6.3 Análise Comparativa da Concentração de Cloreto nas Categorias de Peso

Comparando-se a média dos resultados da concentração de cloreto nos recém-nascidos das três categorias observou-se diferença significativa entre os valores de cloreto das categorias 1 e 2 ($p = 0,01$); categorias 1 e 3 ($p = 0,02$) e entre as categorias 2 e 3 ($p < 0,001$).

4.7 ANÁLISE COMPARATIVA DAS DOSAGENS DE IRT NAS CATEGORIAS DE PESO

Comparando-se a média dos resultados das dosagens de IRT 1/ IRT2, entre as categorias de peso do RN não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,15$).

4.8 VALORES MÉDIOS DE IRT, VOLUME DE SUOR, CONDUTIVIDADE E DE CL DE ACORDO COM A PRESENÇA DA MUTAÇÃO $\Delta F508$

Os casos de FC foram agrupados em três grupos. Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3. O Grupo 1 constitui-se dos casos em que a pesquisa da mutação $\Delta F508$ foi negativa. O Grupo 2 e o Grupo 3 constituíram-se dos casos onde a mutação $\Delta F508$ foi confirmada em um alelo e nos dois alelos, respectivamente (Tabela 11).

TABELA 11 - CASOS DE FC DE ACORDO COM A PRESENÇA DA MUTAÇÃO $\Delta F508$

GRUPO	1 (n = 35) ($\Delta F508$ AUSENTE)	2 (n = 34) ($\Delta F508$ /OUTRA MUTAÇÃO)	3 (n = 20) ($\Delta F508$ / $\Delta F508$)
Peso (g)	3.055,8	3.066,6	3.194,7
IRT1 (ug/l)	185,2	195,5	207,7
IRT2 (ug/l)	160,1	187,2	207,8
Volume Suor (ul)	32,2	35,2	42,8
Condutividade (mmol/l)	93,5	106,6	110,4
Cloreto (mmol/l)	83,4	94,8	101,1
Relação	0,9	0,9	0,9
Cloreto/Condutividade - média = 0,89			
Valores de peso, IRT1, IRT2, Volume suor, condutividade e cloreto, estão expressos em média.			

4.8.1 Análise Comparativa das Dosagens de IRT nos Grupos

Comparando-se a média dos resultados das dosagens de IRT 1 (primeiro exame do RN em papel filtro) e IRT2 (segundo exame do RN) nos três grupos não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,16$).

4.8.2 Análise Comparativa do Volume de Suor nos Grupos

Comparando-se a média dos resultados do volume de suor dos recém-nascidos nos três grupos não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,12$).

4.8.3 Análise Comparativa da Condutividade nos Grupos

Comparando-se a média dos resultados da condutividade nos recém-nascidos dos três grupos observou-se forte diferença significativa entre o Grupo 1 e o Grupo 2 ($p = 0,02$) e diferença significativa limítrofe entre o Grupo 1 e o Grupo 3 ($p = 0,05$). Não foi encontrada diferença significativa entre o Grupo 2 e o Grupo 3 ($p = 0,23$).

4.8.4 Análise Comparativa da Concentração de Cloreto nos Grupos

Comparando-se a média dos resultados da concentração de cloreto nos recém-nascidos dos três grupos observou-se diferença significativa entre o Grupo 1 e o Grupo 2 ($p = 0,02$) e diferença significativa limítrofe entre o Grupo 1 e o Grupo 3 ($p = 0,05$). Não foi encontrada diferença significativa entre o Grupo 2 e o Grupo 3 ($p = 0,11$).

5 DISCUSSÃO

5.1 IRT

Com o advento da triagem neonatal é possível fazer um diagnóstico em bebês assintomáticos. É conhecido há mais de 20 anos que é possível suspeitar que um neonato tenha FC com base em uma elevação no plasma do tripsinogênio. A tripsina imunoreativa (IRT) constitui-se a base dos programas de rastreamento neonatal e foi introduzida no Brasil em 2001 sob a forma de recomendação do Ministério da Saúde. O seguimento dos casos com resultados anormais, a combinação do teste do suor e os testes genéticos confirmam ou refutam o diagnóstico da doença.

No Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Paraná o protocolo define que dois resultados alterados para IRT em coletas distintas sugerem o diagnóstico da doença. Foi definida como data limite para validação deste analito a idade de 30 dias de vida do RN. A terceira coleta no dia da primeira consulta médica foi utilizada para pesquisa da mutação DF508 e submetida também para avaliação dos níveis da IRT. Com poucas exceções este modelo tem detectado com sucesso em 91% à 98% das crianças afetadas seguido de uma taxa de reteste de 0,3 à 0,7% da população inicialmente triada. (HEELEY, 1992).

As lesões histológicas do pâncreas na FC, bem descritas na literatura, mostram um acúmulo progressivo da secreção viscosa nas ductos e ácinos, degradação do tecido acinar e fibrose, mas essas mudanças só raramente são evidentes no início da infância, quando o nível de IRT no sangue está aumentado. Entretanto, com a progressão da doença a concentração de IRT diminui podendo até estar indetectável. Estudos realizados sobre o pâncreas de recém-nascidos FC mortos decorrente de complicações de Íleo meconial mostraram, em praticamente todos os casos, um mínimo de doença pancreática nessa idade. É provável que o aumento da viscosidade das secreções pancreáticas na FC leva a um aumento da pressão intraductular tornando-se mais "permeável" do que o normal na presença de um fluido luminal que contém uma maior concentração de tripsinogênio que o normal, resultando em aumento das concentrações sanguíneas de tripsinogênio. Entre outros mecanismos que contribuem para a elevação da IRT, observados em recém nascidos com FC, um é a transição abrupta da alimentação placentária para

enteral após o nascimento. Nesta fase o pâncreas exócrino é submetido à estimulação máxima e persistente por uma variedade de mecanismos neurais, endócrinos e parócrinos que se normalizam somente após a segunda ou terceira semana de vida (HEELEY, 1992).

O fenômeno da hipertripsinemia transitória (não FC) ocorre predominantemente nos primeiros dias de vida pelos fenômenos descritos acima. Da mesma forma, em recém-nascidos normais, cujo sistema pancreático ductular tem um desenvolvimento abaixo da média (embora dentro da faixa normal), poderia ser esperada uma elevação da IRT.

Existem relatos de que nas primeiras 24 h de vida cerca de 1-2% das crianças normais tem concentrações sanguíneas de IRT superior ao valor de corte além daquele exigido para detectar 96% das crianças com FC, resultando em uma elevada taxa de reteste, 2 a 4 vezes maior que o considerado como aceitável quando o teste é comumente realizado mais tardiamente na primeira semana de vida.

Embora algumas investigações têm mostrado que uma mudança significativa na concentração sanguínea da IRT ocorre apenas entre o primeiro e o segundo dia de vida, Heeley *et al.* relataram uma diminuição de 25 vezes na incidência da hipertripsinemia da FC em 1-2 semanas em comparação com 2-4 semanas de idade contribuindo para taxa de reteste, dependendo do tempo do teste inicial de cerca de 2% no primeiro dia para cerca de 0,02% em 30 dias.

A atribuição de um valor de corte inferior ao utilizado inicialmente para confirmação dos casos pode melhorar a sensibilidade do teste, mas essa prática pode resultar em uma perda de especificidade e, portanto, uma mudança na eficiência global. A qualidade da mancha de sangue aplicada no papel também interfere na reprodutibilidade dos resultados laboratoriais. Tem sido demonstrado que em amostras não homogêneas impregnadas no cartão de coleta o CV resultante da duplicata dos ensaios tanto para TSH (tireotropina para triagem neonatal do hipotireoidismo congênito) e IRT dobra em comparação com a análise do mesmo sangue aplicado corretamente (NCCLS, 1992).

Além disso, quando o processo natural de secagem da mancha de sangue é impedido, ocorre uma difusão da água do plasma e dos solutos, geralmente discreta. Ensaio subseqüentes da amostra de sangue seco no cartão mostram que a concentração da substância reduz para 30-50% de seu valor inicial (HEELEY, 1992).

Outra fonte potencial de erro na medida de IRT é o risco da contaminação do cartão de coleta da amostra com tripsina de origem fecal. Isso é facilmente evitado por uma preparação adequada do calcanhar da criança antes de gotejar o sangue e a manipulação cuidadosa do cartão da amostra.

Tem sido demonstrado não existir uma mudança significativa na IRT do sangue, dependendo se o teste é pré ou pós-prandial em lactentes normais. O efeito do estado nutricional nas concentrações IRT sanguíneas em recém-nascidos com FC é mais aparente após o tratamento cirúrgico para íleo meconial. Quando ocorrem, essas alterações no nível de IRT sanguíneos parecem estar mais relacionadas com o regime alimentar pós-operatório do que o tipo de procedimento cirúrgico realizado. Os níveis de IRT tendem a cair drasticamente no pós-operatório e tendem a aumentar gradualmente com a introdução da alimentação oral.

Neste estudo não houve seleção prévia dos pacientes para inclusão, quer por razões clínicas ou genotípicas. Todos os indivíduos foram encaminhados pelo sistema de saúde público ou privado através do Programa de Triagem Neonatal, estabelecido desde 2001 através de portaria ministerial. A coleta de sangue por punção com lanceta no calcanhar do recém nascido foi realizada na alta hospitalar preferencialmente após as 48h de vida. Nos casos em que a amostra foi coletada anterior à 48h de vida (alta precoce) uma segunda coleta foi agendada nas Unidades Básicas de Saúde para repetição da pesquisa da fenilcetonúria pela possibilidade de falsos normais no primeiro exame.

Esta condição não interfere com a dosagem da IRT do recém nascido. O único interferente reside em bebês com idade superior a 30 dias de vida como citado anteriormente. Em média o primeiro exame é realizado com 3 dias de vida do recém nascido. Um resultado alterado neste primeiro exame, confirmado por reteste em duplicata na mesma amostra de sangue coletada, motiva a convocação para nova coleta do sangue e confirmação do primeiro resultado. Esta segunda amostra de sangue em nosso estudo foi coletada em média com 13 dias de vida.

Neste aspecto é interessante salientar o benefício de uma rede estruturada de coleta e a importância de um serviço de busca ativa sistematizada dentro do Programa de Triagem Neonatal o que resulta em idade de realização, repetição do exame, confirmação do resultado e início do tratamento e ou seguimento clínico muito rápido.

Todas as crianças com resultado suspeito, alterado ou com a coleta de sangue inadequada de sangue que poderiam resultar em resultado falso positivo ou

falso negativo são convocadas por meio de uma equipe de assistentes sociais e auxiliares administrativos. Através dos dados cadastrais da criança constantes da ficha de coleta esta equipe entra em contato com a família diretamente ou através de recursos comunitários locais, como Hospitais, Conselho Tutelar, Secretaria Municipal de Saúde, Rádios, e outros na tentativa de localização rápida da família e confirmação do exame que pode significar o seguimento com médico especializado.

Rock *et al.*, estudando 145.024 crianças, usando IRT de 180ug/l como valor de corte, detectaram 129 crianças com nível elevado de IRT que não tiveram confirmação da FC pelo teste de suor (falso positivo). O total de crianças com FC encontrado pelos autores foi de 54. Excluindo pacientes com íleo meconial, 4 crianças com FC tiveram níveis iniciais abaixo do valor de corte, e 9 crianças com FC tiveram os níveis de IRT diminuídos de 180 ug/ml dentro dos primeiros 2 ½ meses de idade. Esses mesmos autores postularam que os valores de IRT em crianças com ou sem FC diminuem consideravelmente no período de 30 dias de vida, sugerindo abordagem cuidadosa nos métodos de triagem da fibrose cística (ROCK, 1990).

Hammond *et al.*, avaliando a eficácia em mensurar a IRT no sangue como procedimento de triagem da FC, analisaram 279.399 RN no Colorado no período de 1982 à 1987. A tripsina imunoreativa foi mensurada em amostras de sangue seco em papel em crianças de 1 a 4 dias de idade utilizando valor de corte para IRT de 70 ug/l em sangue total. Neste estudo a média de idade para o exame inicial foi de 38 dias e para o exame de repetição foi de 49 dias, embora o valor de corte da IRT para o segundo ensaio foi menor (60ug/l). Segundo esses autores a estratégia de repetição da IRT alterada com nova coleta do RN é eficaz na seleção dos resultados falsos positivos (HAMMOND, 1991).

Alguns programas de triagem neonatal incluem a pesquisa de mutações mais comuns, junto com a determinação da IRT, no intuito de diminuir o número de retestes para confirmação da IRT alterada inicial.

Wilcken *et al.*, avaliaram duas estratégias de triagem neonatal, IRT/IRT e IRT/DNA ($\Delta F508$) em 1,2 milhões e 189.000 de bebês. A pesquisa de DNA foi realizada na mesma amostra de sangue seco extraída de um disco de 3mm de diâmetro e amplificada pela técnica de PCR (*Standard Polymerase Chain Reaction*) e o produto separado por meio de gel de eletroforese de polyacrilamida. Esses autores concluíram que a percentagem de indivíduos que tiveram o diagnóstico

precoce foi semelhante (92%), mas que uma vantagem na identificação simultânea da mutação $\Delta F508$ reside no fato de não ser necessária uma segunda amostra de sangue da criança, embora a identificação dos portadores seja uma desvantagem apontada neste estudo. Todos os casos suspeitos foram avaliados pelo Teste do Suor que quando negativo descartou a doença, ou sugeriu a amplificação do painel de mutações (WILCKEN, 1995).

Neste estudo foram avaliadas no período de janeiro de 2002 à dezembro de 2008, 1.218.642 recém nascidos provenientes dos hospitais e maternidades do Estado do Paraná e das Unidades Básicas de Saúde. Desses recém nascidos, 13.235 (1,08%) tiveram um exame inicial de IRT positivo acima do valor de corte utilizado, de 70ug/l. Dessas crianças, 2309 (17,44%) tiveram um segundo resultado de IRT positivo em nova amostra de sangue coletada do calcanhar e impregnada em papel filtro. No mesmo período 1543 RN fizeram o teste do suor pelo método da condutividade, seguido do método quantitativo coulométrico na determinação da concentração de cloreto no suor para confirmação diagnóstica laboratorial da FC.

Foram selecionados da população dos 1543 recém nascidos, por conveniência, 444 RN com teste de suor normal e 90 RN com teste de suor positivo e confirmação de FC.

Não foi encontrada correlação entre o resultado inicial da IRT positivo e o segundo resultado da IRT coletada após convocação para repetição do exame por suspeita.

Embora o gráfico 3 represente uma linha de tendência dos resultados do exame inicial de IRT superior à linha de tendência dos resultados do segundo exame de IRT, essa diferença não foi significativa.

Na pesquisa da FC duas amostras coletadas com resultado alterado distintos motivam a realização de teste confirmatório no suor o qual é rotineiramente realizado no próprio Serviço de Referência que é a FEPE. Quando o teste é confirmado positivo uma terceira amostra de sangue é coletada e analisada para IRT e também para pesquisa de uma única mutação $\Delta F508$ que é a mais comum e também por ser a única subsidiada pelo Sistema Único de Saúde e preconizada pelas normas do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) quando da sua regulamentação até a atualidade. Mais a frente serão discutidos os resultados encontrados segundo a presença ou ausência dessa mutação.

5.2 IDADE

A idade, em mediana, dos recém-nascidos no momento do primeiro exame da IRT foi de 3 dias (IC 95% = 2,6 – 3,9), variando de 1 a 18 dias. O gráfico 6 ilustra a distribuição da idade no momento da realização do primeiro exame.

No gráfico 7 não se observou nas amostras estudadas um declínio da IRT como era esperado, talvez porque o período do estudo não excedeu em muito os 30 dias de vida do recém nascido. Mesmo no terceiro exame de IRT, realizado na data da consulta médica da criança, esse período não foi superior à mediana de 29,5 dias conforme foi ilustrado no gráfico 8. Embora não tenha sido evidenciado um declínio significativo da IRT no sangue do recém nascido, o que possibilitaria aceitar esse resultado como válido, este fato não interferiu e também não motivou a mudança de protocolo que considera válida a pesquisa da IRT somente em crianças que tiveram a coleta do sangue realizada antes dos 30 dias de vida.

5.3 VOLUME

A quantidade de suor coletado é parte integrante da interpretação dos resultados, a fim de assegurar uma adequada taxa de suor. Uma sudorese inadequada pode levar a resultados falso-negativos. Para valores de condutividade, um valor maior ou igual a 50 mmol/l geralmente indica a necessidade de testes adicionais (BEAUCHAMP, 2005).

LeGrys recomenda um volume mínimo aceitável de 15ul de suor coletados em 30 minutos. O mínimo aceitável de peso e volume de suor vai depender do tamanho do eletrodo e da área estimulada, do tamanho do dispositivo de coleta e o período de duração da coleta do suor (LEGRYS, 1996).

Já Beauchamp *et al.* definem como um volume de suor suficiente e ideal, o obtido com pelo menos 75 mg de peso pelo método de Gibson-Cooke ou pelo menos, 10-15 µL obtido pela bobina Macroduct® utilizada no Sistema Wescor de condutividade (BEAUCHAMP, 2005). Esta foi a recomendação seguida neste estudo. Alguns pacientes podem produzir uma quantidade insuficiente de suor devido a vários fatores como idade, raça, condição da pele e o sistema de coleta em

si.

Embora pareça ser mais difícil obter uma amostra adequada de suor em crianças mais jovens, estudos tem mostrado uma diferença estatisticamente significativa na proporção de amostras insuficientes de suor de pacientes com menos de 6 meses, se comparados com aqueles com idade maior (FARRELL, 1996).

A diferença na resistência da pele devido à fatores étnicos ou variabilidade individual de cada paciente pode contribuir com um volume baixo de suor (LEGRYS, 1996).

A Fundação Norte Americana de Fibrose Cística recomenda que para aumentar a probabilidade de coletar uma amostra de suor adequada, o teste de cloro no suor em recém-nascidos assintomáticos com um valor positivo de IRT na triagem neonatal positivo para FC deve ser realizado quando o bebê tem pelo menos 2 semanas de idade e um peso de 2000g.

Warren *et al.*, em um estudo retrospectivo de 119 testes realizados em 103 RN prematuros e de termo menores do que 6 semanas de idade, analisaram as características que influenciaram o sucesso na obtenção de suor suficiente para o diagnóstico da FC e as concentrações de cloro no suor. Concluíram que uma maior chance de fracasso na obtenção de quantidade suficiente de suor (75mg) esteve associada com a raça afro-descendente, peso da criança inferior à 2000g e a prematuridade. Consideraram que a coleta de suor pode ser realizada com sucesso em bebês com idade gestacional superior a 36 semanas , peso superior à 2.000 g e idade pós-natal maior que 3 dias.

Neste estudo a concentração de cloreto no suor dos bebês sem FC foi inversamente proporcional à idade gestacional e a idade do ensaio.

Também demonstraram que os indivíduos da raça africana têm uma maior probabilidade de fornecer uma amostra de suor insuficiente, presumivelmente por causa das diferenças étnicas na resistência da pele (WARREN, 2005; LEGRYS, 2007).

A população estudada nesta pesquisa concentrou-se em recém nascidos da triagem neonatal. Foi observado, na prática, que alguns bebês produziam um volume de suor maior já na primeira coleta, superior à 75 ul que é o limite do dispositivo *Macroduct* utilizado. Em virtude de se tratar praticamente de uma população de RN originária da triagem neonatal e a diferença de idade não ser

estreita, optou-se por verificar se existia alguma correlação com o peso da criança ao nascimento, analisando os dados tanto de crianças com FC confirmadas pelo teste do suor e as não confirmadas. Observou-se que o volume de suor obtido foi maior quanto maior foi o peso da criança.

Cálculos de probabilidade indicaram que em bebês com peso ao nascimento entre 1000g e 2000g o volume de suor esperado está entre 20ul e 30ul, para bebês com peso entre 2000g e 3000g um volume de 30ul, para bebês acima de 3000g um volume de 40ul e com peso superior à 4000g, aproximadamente um volume de 50 ul.

Este achado é interessante, pois considerando-se que os métodos utilizados no teste do suor necessitam de um volume mínimo de 10 ul para seu sucesso, pode-se observar que mesmo em RN de baixo peso da população estudada (menor que 2000g) essa quantidade de suor pode matematicamente ser estimada.

Pode-se também supor pelos dados obtidos neste estudo, que um maior volume de suor pode estar associado ao peso e não à idade da criança.

Lezana *et al.*, estudando uma população de 540 recém nascidos e adultos, descreveram um volume mínimo de 6-15 ul de suor obtido, afirmando que a maior parte dos indivíduos com amostras de suor insuficientes eram recém-nascidos (LEZANA, 2003).

Alguns estudos como o de LeGrys *et al.* avaliaram a taxa de repetições do teste do suor, quando a quantidade de suor é inadequada e recomendaram uma porcentagem limite para os programas que utilizam esse recurso na estratégia de triagem da FC. Segundo esses autores esse índice não deve ser maior que 5% de reteste por quantidade insuficiente de suor em pacientes com idade superior à 3 meses (LEGRYS, 2007; LEGRYS, 2010).

Em nosso estudo de um total de 2309 RN, somente 99 (4,3%) foram submetidos ao reteste por quantidade insuficiente de suor, portanto dentro da faixa recomendada pela literatura

5.4 CONDUTIVIDADE E DOSAGEM DE CLORETO

A composição do suor em indivíduos normais consiste de água, compostos inorgânicos e orgânicos (Quadro 5) (FARRELL, 1996).

QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO BÁSICA DO SUOR OBTIDO DE INDIVÍDUOS NORMAIS

COMPONENTES INORGÂNICOS	COMPONENTES ORGÂNICOS
Sódio – 15,6 mEq/l	Ácido láctico – 17,0 – 330,0 mEq/l
Potássio – 3,8 mEq/l	Uréia – 3,7 mEq/l
Cloreto - 15,60 mEq/l	Aminoácidos (com o Nitrogênio) – 0,7 – 1,5 mEq/l
Cálcio – 0,1 – 1,0 mEq/l	
Sulfato – 0,4 – 1,8 mEq/l	
Ferro, Magnésio, Cobre, Fosfato, Iodeto, Fluoreto – Indetectáveis (quantidades em pg)	
pH = 4,5 – 7,1	
FONTE: FARREL (1996)	

Existe um número limitado de condições patológicas onde uma alteração significativa da composição tem sido observada além da FC (NCCLS, 2000). Incluem: anorexia nervosa, dermatite atópica, disfunção anatômica, displasia ectodérmica, privação ambiental, colestase familiar, fucosidose, deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, deficiência de armazenamento de glicogênio – tipo 1, hipogamaglobulinemia, síndrome de Klinefelter, infusão à longo prazo de PGE1 (*Long-term PGE1 infusion*), síndrome de Mauriac, mucopolissacaridose tipo 1, diabetes insípido nefrogênica, nefroses, desnutrição protéico-calórica, pseudohipopaldosteronismo, falha no desenvolvimento psicossocial, insuficiência adrenal não tratada e hipotireoidismo não tratado.

A medição da concentração de cloro no suor pelo teste da iontoforese de pilocarpina descrita por Gibson e Cooke é considerado o método mais preciso para diagnosticar FC e tem sido aceito como o padrão para o teste de suor.

No entanto, este método envolve várias etapas de coleta e a análise da amostra de suor, além de complicada execução, envolve variáveis volumétricas, gravimétricas, condensação e erros no processo de evaporação, aspectos que exigem cuidados principalmente em laboratórios que não realizam o teste de suor rotineiramente.

Os métodos alternativos foram introduzidos nos últimos anos para simplificar a coleta e a análise das amostras de suor (HAMMOND, 1994; DENNING, 1980).

Medições químicas indiretas, tais como osmolaridade e condutividade não

oferecem mais do que aproximações dos níveis de eletrólitos no suor e, portanto, são utilizados apenas como triagem (BEAUCHAMP, 2005).

A aplicação do princípio da condutividade para analisar quantitativamente as soluções de suor tem sua limitação, provavelmente devido à dificuldade de interpretação dos resultados por existir mais de um eletrólito presente na solução.

A observação da condutividade elétrica em uma solução de eletrólitos está em função de variáveis como o tipo de íons presente, a quantidade de íon presentes nesta solução, a temperatura e a geometria da célula de condutividade.

Dispositivos eletrônicos modernos de medida da condutividade, disponíveis e de moderado custo, podem medir a condutividade de uma solução de uma forma simples e rápida. A solução não é consumida ou afetada pela medida e pode ser utilizada para outros estudos.

O cloreto fornece mais precisão do que a análise de sódio e, portanto, muitos centros utilizam os níveis de sódio como um único controle, ou seja, uma diferença muito grande entre o resultado desses dois eletrólitos indicam um erro em algum elemento do teste, análise ou interpretação (BEAUCHAMP, 2005).

Apesar de alguns estudos mostrarem que o método de condutividade correlaciona-se bem com a concentração de cloreto (LEZANA 2003), esta afirmação ainda não foi aceita pela Comissão Nacional de Padronização em Laboratório Clínico Norte Americana (NCCLS, 2000) como uma ferramenta de diagnóstico definitivo.

A Fundação Norte Americana de Fibrose Cística (*Cystic Fibrosis Foundation*) relega este método ao status de "método de triagem" (LEZANA, 2003).

Segundo o seu consenso, os indivíduos com uma condutividade do suor de 50 mmol/l devem ser encaminhados para uma avaliação quantitativa do cloreto no suor. Atualmente, o teste do suor é método bioquímico mais utilizado e mais conclusivo para o diagnóstico da FC, na medida em que mais de 99% dos indivíduos homocigotos para o gene da FC tem cloreto de suor e concentrações de sódio acima de 60 e 70 mmol/l, respectivamente (SHWACHMAN, 1981).

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a capacidade de discriminar indivíduos FC e não FC pelo método da condutividade do suor mensurando assim a sua precisão como um procedimento diagnóstico analítico e ferramenta útil nos programas de triagem neonatal brasileiros, e também avaliar a correlação entre este procedimento e o método quantitativo que determina a concentração de cloreto no

suor. As medições automáticas de condutividade e concentração de cloro foram realizadas nas mesmas amostras de suor de indivíduos com suspeita clínica de FC, com teste positivo de IRT na triagem neonatal.

Para os fins do estudo, um diagnóstico laboratorial da FC foi considerado confirmado quando a concentração de cloreto foi de 60mmol/l em uma amostra de suor. No entanto, todos aqueles indivíduos com um resultado positivo foram submetidos a uma segunda titulação de cloreto e mais exames clínicos, laboratoriais e a pesquisa da mutação $\Delta F508$, utilizando-se de amostra residual de sangue do calcanhar do bebê coletado em papel filtro ou de uma nova coleta de sangue em papel filtro realizada no dia da consulta médica. Quando dois ou mais testes do suor foram feitos da mesma amostra coletada, apenas o primeiro resultado de ambos os métodos foram utilizados para análise estatística. Foi incluída na rotina de testes de suor amostras de controle de qualidade preparadas no laboratório e de padrões comerciais com concentrações conhecidas de cloreto, baixo, limítrofe e alto conforme o descrito no capítulo de material e métodos.

Em todos os casos, dois estágios de coleta de amostras de suor foram realizados utilizando o sistema de *Macroduct* (Wescor Inc®, Logan, Utah). Na primeira fase foi realizada com uma estimulação iontoforética na pele do antebraço limpo com água deionizada e forte secagem. Dois eletrodos de indução contendo discos sólidos de 2,8-cm de diâmetro (Pilogel®), constituídos de agar, nitrato de pilocarpina a 0,5% em 96% de água, anexados à pele, com alças. Os eletrodos foram conectados a uma fonte de corrente do sistema operado por baterias que fornecem um máximo de corrente de 1,5 mA durante um período de 5 min. Na segunda fase (coleta de suor), a pele estava limpa e seca, e um coletor *Macroduct* foi colocado sobre a área estimulada anteriormente pelo eletrodo positivo. O coletor *Macroduct* é um dispositivo descartável, em forma de disco côncavo de plástico com um 0,025-polegada, um orifício central conectado por uma espiral de tubo plástico com capacidade para armazenar 85 ul de suor. O suor por capilaridade é conduzido através do orifício e capturado no tubo plástico sem que nenhum espaço morto ou de evaporação exista. Existe uma pequena quantidade de corante azul aquoso (10nmol) na superfície do disco côncavo que permite a visualização do suor no interior do tubo mas, que não interfere com o ensaio de eletrólitos no suor. A coleta do suor não excedeu o tempo de 30 minutos, suficiente para recolher aproximadamente 10 -75 ul. Este volume foi suficiente para realizar os dois métodos

(condutividade seguido por titulação de cloreto) sobre a mesma amostra de suor.

Neste contexto, a medição de condutividade do suor é um método cada vez mais utilizado porque é mais fácil de executar e requer uma amostra menor (mínimo de 6 ul).

O primeiro exame realizado no suor foi o da condutividade. Neste método a amostra de suor foi submetida a um analisador *Sweat 3100 - Chek* (Wescor Inc), que foi calibrado com uma solução de NaCl 90 mmol/l de acordo com as instruções do fabricante. O montante mínimo da amostra de suor exigido pelo equipamento é 6-15 ul, embora no presente estudo, todas as amostras foram constituídas de no mínimo 10 ul para posterior titulação de cloreto.

Ainda que a condutividade seja atualmente considerada como um método de triagem, alguns estudos propõem a sua utilização para diagnóstico. A aparente vantagem desse sistema *MacroductWescoré* a sua capacidade de fazer leituras diretas dos resultados com pequenas quantidades de suor (10-15 ul) (BEAUCHAMP, 2005). Existe outro sistema que requer um volume menor de suor (Nanoduct), mas também é um dispositivo que mede a condutividade. Este sistema pode ser uma alternativa superior ao *Macroduct*, especialmente para a triagem neonatal desde que considerada como única medição. No caso deste estudo este dispositivo não seria útil, em virtude da quantidade menor de suor obtida, insuficiente para medir a concentração de cloreto.

No início dos estudos pela pouca experiência, quando o volume de suor era inferior à 10ul, o teste era repetido no mesmo dia, em outro braço ou mesmo na coxa da criança. Verificou-se que, mesmo na repetição, o volume de suor suficiente para o teste não era conseguido.

Dessa forma passou-se a orientar à família da criança que a repetição do teste fosse realizada em data diferente nas situações em que o volume de suor não era o suficiente para medições da condutividade e conseqüente dosagem de cloreto.

Para efeito de confirmação diagnóstica é necessário dois testes do suor realizados em datas diferentes. Essa recomendação não se refere ao reteste para efeito de controle de qualidade. Deve-se observar que para o diagnóstico, a duplicação dos ensaios realizados no mesmo dia não representa a repetição do teste independente (LEGRYS, 2007).

Seguindo as recomendações do item 13 do documento que regulamenta os procedimentos para o teste do suor (NCCLS, 2000) um controle positivo e negativo

devem ser incluídos em cada série do paciente.

No presente estudo para cada série do paciente foram incluídos controle baixo (10mmol/l); médio (50mmol/l) e alto (100 mmol/l).

O limite inferior de detecção deve ser determinado pelo laboratório e deve ser de 10 mmol/l. A extremidade superior dos resultados reportados não deve ser superior a 160 mmol/l, conforme orientação da norma internacional NCCLS (NCCLS, 1991).

LeGrys *et al.* recomendam que valores inferiores sejam reportados como "inferior à 10 mmol/l." Embora os instrumentos analíticos possam ter um intervalo de medição superior a 160 mmol/l, concentrações acima desse valor não são fisiologicamente possíveis e segundo esses autores não devem ser reportadas por se tratarem de provável erro técnico ou contaminação (LEGRYS, 2010).

Para o diagnóstico laboratorial da FC, o teste do cloreto no suor positivo deve ser confirmado repetindo a análise em um horário diferente ou confirmada pela identificação de duas mutações do gene CFTR conhecidas para causar FC, ou resultados anormais em estudos eletrofisiológicos do epitélio nasal. Todos os valores limítrofes do teste do suor devem ser repetidos. Esses autores sugerem que em pacientes identificados pela triagem neonatal o teste deve ser repetido dentro de 1-2 meses. Se os testes repetidos continuam limítrofes, testes auxiliares como genotipagem, avaliação da função pancreática, avaliação microbiológica do trato respiratório e urogenital podem auxiliar. Pacientes com testes limítrofes no teste de suor devem ser monitorizados para problemas respiratórios e condição nutricional.

Análise da mutação CFTR pode ser executada como uma confirmação de um resultado anormal no teste do suor. No entanto, porque muitas mutações não são detectadas pelos painéis utilizados para o rastreio da FC, a repetição do teste de cloro no suor é muitas vezes necessária para confirmação diagnóstica (LEGRYS, 2010).

Os controles foram executados utilizando-se soluções de referência preparadas no laboratório de (10, 50 e 100 mmol/l NaCl), inicialmente e soluções fornecidas pelo fabricante (40,70 e 130 NaCl mmol/l), rotineiramente. Após cada leitura, água deionizada e ar foram passadas através da célula de condutividade do *Sweat-Chek*, a fim de remover qualquer suor e evitar a contaminação da amostra seguinte. As concentrações dos íons obtidos na condutividade foram expressos em mEq/l. Para efeito de padronização, foi utilizada neste estudo a representação em mmol/l (equivalente de NaCl), o qual representa a unidade de concentração molar de

uma solução de cloreto de sódio que tem a mesma condutividade da amostra de suor na mesma temperatura.

Deve-se salientar que este valor de forma alguma representa o total de sódio, real ou a concentração de cloreto no suor da amostra.

Depois de medir a condutividade, o suor foi capturado em um pequeno tubo plástico com tampa e imediatamente titulado para determinação quantitativa do cloreto.

A determinação da concentração de cloro no suor foi realizada utilizando-se um titulador Cloridrômetro (Labconco, USA). Este equipamento é projetado para medir a concentração de cloreto em micro diluições e é baseado no princípio de titulação coulométrica. Os limites de detecção deste titulador são 0-999 mMol/l Cl (etapa de 1 mmol/l) com uma precisão de 0,5 mmol/l (0,5%) e reprodutibilidade de 0,5%. A calibração do equipamento foi realizada em uma base diária com solução de 1 e 50 e 100 Cl mmol/l.

A amostra foi então transferida para o recipiente de titulação do titulador de cloreto conforme o descrito no capítulo material e métodos. Controles foram processados juntamente com a titulação de cada amostra de suor. Controle e soluções de calibração foram armazenados refrigerados em recipientes de vidro sob temperatura controlada de 4-8C até sua validade de 3 meses, e mantidos à temperatura ambiente no momento do uso, de acordo com as orientações da NCCLS.

A coleta do suor em gaze, uma vez pesada pode ser armazenada com ou sem diluente em um recipiente hermeticamente fechado por um período de 3 dias sob refrigeração. Porém, estudos sobre o tempo de armazenamento do suor no sistema *Macroduct* necessitam ser publicados e, portanto, os laboratorios devem validar as condições de armazenamento neste sistema (LEGRYS, 2007).

Nesta pesquisa a amostra não foi armazenada para posterior análise. O suor coletado no sistema *Macroduct* foi imediatamente submetido a avaliação da condutividade com posterior e imediata quantificação do cloreto por meio de procedimento Coulométrico.

Em um estudo recente, Lezana *et al.* relataram a correlação entre o método da condutividade e o método quantitativo por Coulometria avaliando 3834 indivíduos com suspeita de FC no México. Na população estudada somente 0,6% indivíduos eram provenientes de teste de triagem neonatal positivo, sendo que a mediana de

idade variou de 1,8 anos (1 mês à 54 anos de idade). O coeficiente de correlação encontrado neste trabalho entre os dois métodos foi de 0,60 ($p = 0,001$). A curva ROC mostrou alta concordância entre os métodos. Neste estudo o melhor valor de corte para condutividade no diagnóstico dos casos de FC foi de 90mmol/l (sensibilidade de 99,7%, especificidade de 100%, valor de preditivo positivo e negativo de 100% e 99,97%, respectivamente, coeficiente de kappa de 0,99. Lezana *et al.* sugerem 75 mMol/l como valor negativo e os valores de 75-89 corresponderiam ao intervalo equívoco (LEZANA, 2003).

Outra pesquisa conduzida por Legrys em 809 instituições verificou que mais de 45% usaram o método da condutividade no suor. Esta taxa de preferência parece ser justificada porque o método da condutividade é mais fácil de executar do que as dosagens tradicionais quantitativas da concentração de cloreto no suor. Até agora o método de condutividade não foi aceito pela Fundação Norte Americana de Fibrose Cística ou o NCCLS como um método definitivo de diagnóstico para esta doença apesar da boa concordância entre condutividade e titulação de cloreto encontrados em vários estudos (LEGRYS, 2000).

Sanchez *et al.*, estudando 14 crianças com FC e 60 crianças não-CF chilenas, encontraram que a condutividade estava altamente correlacionada com concentração de Na^+ acrescido da concentração de K^+ ($r = 0,98$). Este estudo mostrou que todas as crianças com FC tinham valores de condutividade de 98 mmol/l, e os autores sugeriram 50-60 mmol/l como valores de condutividade duvidosos, que necessitariam repetição do teste (SÁNCHEZ-SOLIS, 1999).

No EUA., Hammond *at al.* descreveram a relação entre valores de condutividade e a concentração de cloreto no suor em amostras de 471 indivíduos e 43 pacientes com FC. Eles encontraram um alto coeficiente de correlação ($r = 0,97$) em todos os pacientes com FC com determinação da condutividade de 90 mmol/l (HAMMOND, 1994).

Heeley *et al.*, avaliando 57 indivíduos com FC e 154 crianças e lactentes não-FC no Reino Unido, concluíram que a condutividade do suor é tão eficaz quanto as medições de cloreto no diagnóstico laboratorial da doença. Eles sugeriram valores de condutividade de 67-71 mmol/l como os limites do intervalo de equívocos (HEELEY, 2000).

Mattar *et al.* avaliaram 52 pacientes com FC (29 do sexo masculino e 23 do sexo feminino) com idade entre 1,5 à 18,2 anos. Realizando o teste do suor pela

condutividade encontraram valores medianos de cloro e condutividade de suor de 114 e 122 mmol/l, respectivamente. Encontraram uma sensibilidade de 100% para o teste de condutividade (IC 95% = 93,1 – 100). Cinquenta indivíduos sem FC (24 do sexo masculino e 26 do sexo feminino) com idade variando entre 0,5 a 12,5 anos apresentaram valores medianos de cloro e condutividade de 15,5 mmol/l e 30,0 mmol/l, respectivamente. Em todos os casos a condutividade foi inferior à 70,0 mmol/l, o que conferiu ao teste 100% de especificidade (IC 95% = 92,9-100). O tempo despendido no teste foi significativamente menor (MATTAR, 2010).

Mishra *et al.*, estudando 282 indivíduos saudáveis e 40 com FC, estabeleceram valores de referência para o cloreto. A idade da população estudada por esses autores variou de 5 a 50 anos. Eles utilizaram o sistema *Macroduct Wescor* de condutividade para as análises em suor coletado por iontoforese com Pilocarpina, seguido da dosagem de cloreto e sódio. Um volume de 20ul foi determinado como suficiente neste estudo.

A pesquisa da mutação $\Delta F508$ foi realizada nos indivíduos saudáveis com idade superior à 15 anos de idade. Neste estudo foram excluídos os indivíduos portadores da mutação $\Delta F508$. Como resultado eles verificaram que para ambos os eletrólitos a concentração aumenta rapidamente com a idade durante o grupo etário (5 – 19 anos), mas mantem-se estável nos 4 grupos etários adultos (20-68 anos de idade). A média estimada (95% do Intervalo de Referência - IR) para cloro no suor foram: 5-9 anos, 13 mmol/L (1-39 mmol / L), 10 a 14 anos, 18mmol/L (3-47 mmol/L), 15 a 19 anos, 20 mmol/L (3-51mmol / L); 20 anos e 23 mmol/L (5-56mmol/L).

Em todos os participantes desse estudo a razão Na/Cl foi de 1.2. O limite superior do intervalo de confiança (IC) para as concentrações de cloro no suor, na faixa etária mais velha (20-68 anos) foi de 59,6 mmol/L, tornando a faixa de limítrofe tradicionalmente utilizada (40-60 mmol/L) não confiável para os adultos, embora uma recomendação mais recente indique que o limite inferior de cloro no suor normal seja reduzido para 30 mmol/L. Uma limitação deste estudo é a faixa etária que extrapolou a população essencialmente de RN provenientes da triagem neonatal (MISHRA, 2008).

Os pacientes com FC têm valores proporcionalmente elevados para ambos os compostos, e estes irão concordar na razão de 15 mmol a razão de Cl/Na mostrando pouca utilidade no diagnóstico como tem mostrado diferentes estudos (LEGRYS, 1996; MISHRA, 2008).

Segundo LeGrys *et al.* (2007) os valores de referência para o cloreto no suor são: menos de 40 mmol/l, negativo; 40-60 mmol/l, limítrofe, e maior que 60 mmol/l, positivo.

Importante é notar que alguns estudos sugerem que o ponto de corte para um resultado positivo em recém-nascidos deve ser de 30 mmol/l, para descartar a possibilidade de falso negativo (LEGRYS, 2007; MISHRA, 2008).

Segundo LeGrys os eletrólitos no suor podem estar transitoriamente elevados durante as primeiras 24 horas de vida do bebê. Sugere-se que o teste seja realizado após as 48 horas de vida desde que uma quantidade suficiente de suor seja obtida.

Desde a introdução da metodologia do teste de suor, as definições universais de valores de normalidade: normal (≤ 39 mmol/L), intermediária (40-59 mmol/L) e anormal (≥ 60 mmol/L) de cloreto no suor foram aplicados a todos os pacientes, independentemente da idade. Esta classificação das faixas de cloro no suor foi inicialmente afirmada através de um exame de 7200 testes de suor realizada entre 1959 e 1966 (SHWACHMAN, 1981).

Como na maioria dos relatos publicados de valores de cloro no suor, os aspectos técnicos das metodologias de teste do suor não atendiam às diretrizes aceitas atualmente, e os estudos não tinham verdadeiramente controles saudáveis, o que torna difícil obter uma referência de intervalo válida. Apesar dessas limitações, o tradicionalmente valor de referência de uma forma geral mostrou-se satisfatório.

Em 2005 a Fundação de Fibrose Cística registrou que apenas 3,5% dos pacientes com diagnóstico de FC apresentaram um valor de cloro no suor < 60 mmol/L e apenas 1,2% tiveram um valor inferior a 40 mmol/L (Farrell 2008). Embora tais intervalos de cloreto no suor, tradicionalmente aceitos, parecem ser suficientes para o diagnóstico de FC em crianças com insuficiência pancreática exócrina e doença pulmonar supurativa, um número crescente de crianças estão sendo identificadas como estando em risco para FC de outras maneiras. Como os programas de triagem neonatal para a FC tornam-se mais generalizados, prevê-se que até 90% das crianças com FC, que freqüentemente não têm sintomas aparentes da doença, seja detectado até a sexta semana de idade, criando uma necessidade urgente de um intervalo de referência precisos para cloro no suor nesta faixa etária.

O principal objetivo deste estudo foi demonstrar que o método de condutividade possui grande capacidade de diferenciar indivíduos FC dos não-FC através do cloreto no suor (60 mmol/l ou 40 mmol/l, respectivamente).

A capacidade do teste de condutividade para discriminar entre indivíduos FC e não-FC foi avaliada por construção da *Receiver Operation Curve* (Curva ROC), e a acurácia geral dos melhores valores de corte foi avaliada através do cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e coeficiente de Kappa. Finalmente, a diferença absoluta ou polarização entre os dois métodos, bem como a relação titulação e condutividade do cloreto, também foi calculada. O valor de significância estatística foi fixado em 69 mmol/l, e os valores de condutividade de 60-69 mmol/l como os limites do intervalo de equívocos (coeficiente de Kappa = 0,89; $p < 0,001$).

Dessa forma os estudos citados confirmam estes resultados, o que sugere que este método analítico pode ser um procedimento de diagnóstico definitivo e confiável para a FC.

Nesse aspecto, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, valendo-se dos critérios de sensibilidade e especificidade de 100% e 99,5%, respectivamente, um valor de condutividade de 69,0 mmol/l deve ser considerado confirmativo da doença.

A correlação encontrada entre o método da condutividade e o da dosagem de cloreto por Coulometria apresentou um coeficiente de correlação de 0,97, semelhante aos estudos retrospectivos.

Na avaliação deste estudo se o método de condutividade pode ser visto como uma ferramenta de diagnóstico pode-se afirmar que todos os testes estatísticos que avaliam esta questão (curva ROC, sensibilidade, especificidade, valores preditivos, coeficiente de Kappa) indicaram claramente que o método de condutividade tem uma excelente capacidade de discriminar entre indivíduos com FC e indivíduos não-FC (de acordo com a concentração de cloro no suor de 60 mmol/l), e assim produziu um alto grau de precisão diagnóstica.

Porque a condutividade avalia o total de íons presentes na amostra de suor, principalmente Cl, Na e K, mas também valores mais baixos de bicarbonato, lactato, cálcio, magnésio, sulfato e fosfato, a razão titulação/condutividade de cloreto deve representar a proporção de cloreto na amostra de suor, com relação aos íons totais. Nesse sentido, Lezana *et al.* constataram em seu estudo que a proporção de cloreto em pacientes com FC foi sempre superior a 50% e, portanto, uma relação cloreto/condutividade menor que 50% exclui o diagnóstico da FC (LEZANA, 2003).

No presente estudo foi encontrada uma razão de 0,42 e 0,89 entre a titulação

cloreto/conductividade para crianças sem FC e com FC respectivamente, o que concorda com os achados desses autores.

Para efeito de confirmação diagnóstica é necessário dois testes do suor realizados em datas diferentes. Essa recomendação não se refere ao reteste para efeito de controle de qualidade. Deve-se observar que para o diagnóstico, a duplicação dos ensaios realizados no mesmo dia não representa a repetição do teste independente (LEGRYS, 2007).

Outras considerações importantes devem ser observadas quanto ao teste do suor no que se refere a possíveis erros. As causas mais comuns de erros incluem volume de suor coletado, evaporação da amostra, calibração dos equipamentos, contaminação, erros de diluição, erros de transcrição dos resultados e interpretação.

Um erro de comunicação comum envolve o uso de valores de referência de cloreto para medidas de condutividade. Uma vez que os níveis de condutividade são maiores do que o cloreto sozinho, um resultado considerado normal possa ser considerado limítrofe para positivo se interpretada utilizando valores de referência de cloreto. Isso resulta em mais testes dispendiosos e desnecessários para a família. Por último, a coleta de suor não deve ser continuada após 30 minutos, e duas amostras de suor não devem ser combinadas para análise quando os volumes obtidos de suor são insuficientes. Durante a estimulação por pilocarpina, as taxas de suor aumentam rapidamente durante os primeiros 10 minutos e depois diminuem de volta à linha de base por 60 minutos. Durante os primeiros 30 minutos, a concentração de eletrólitos, mensurado pela condutividade, diminui. Prolongar assim a coleta para além de 30 minutos resulta na adição de uma quantidade relativamente pequena de suor diluído, o que poderia diminuir os valores de cloreto no suor. O alargamento do período de coleta também aumenta o risco de evaporação (BEAUCHAMP, 2005).

De acordo com LeGrys *et al.* a taxa de sudorese ideal é a de 1 g/m²/min que possibilita um resultado válido sem que haja evaporação e a diluição por suor não estimulado (LEGRYS, 2007).

Além disso, várias mutações têm sido associadas com valores limítrofes ou concentrações de cloreto no suor normal como: 3849 p 10 kb C > T, R117H, G551S, A455E, D1152H, IVS8 (5T), L206W, 2789 p 5 G > A.

Estas mutações podem ter um efeito adverso sobre o número de crianças detectadas através dos programas de triagem neonatal, especialmente se um corte

de 40 mmol/l de Cl no suor é utilizado (BEAUCHAMP, 2005).

De acordo com as publicações, cerca de 98% dos pacientes com FC tem concentrações de cloreto no suor maior que 60mmol/l e apenas 1% a 2% tem concentração de cloreto abaixo de 60mmol/l (LEGRYS, 1996).

Segundo a autora índice de falso positivo e falso negativo depende do método utilizado e tem sido reportados taxas maiores que 15% de falso positivo e maiores que 12% de resultado falso negativo que podem ser ocasionado em pacientes edemaciados, problemas metodológicos e erros técnicos.

De acordo com o que foi publicado por Mayell *et al.*, o teste do suor deve ser realizado por pessoal treinado e o laboratório deve ter uma rotina de no mínimo 150 testes de suor por ano (MAYELL, 2009).

Alguns fatores que podem afetar os resultados do teste do suor incluem o estado nutricional e de hidratação do paciente, uso de mineralocorticóides, condição da pele (eczemas, *rashes*, entre outros), e a idade que podem alterar a concentração dos eletrólitos no suor. Desnutrição, desidratação, eczema e *rash* podem aumentar a concentração de eletrólitos no suor, enquanto edema e administração de mineralocorticóides podem diminuir a concentração de eletrólitos no suor. Não existe diferença de concentração de eletrólitos no suor em diferentes partes do corpo, mas braços e pernas são os locais preferenciais para aplicação do teste (LEGRYS, 1996).

5.5 IRT/CONDUTIVIDADE/CLORETO DE ACORDO COM A PRESENÇA DA MUTAÇÃO $\Delta F508$

A identificação de mutações conhecidas como causa de FC em cada um dos alelos do gene da CFTR, frente a um contexto clínico ou história familiar compatível, estabelece o diagnóstico de FC. Entretanto, o achado de uma ou de nenhuma mutação no gene da CFTR não exclui o diagnóstico de FC. (ROSENSTEIN, 1998). A análise de mutações para confirmar o diagnóstico de FC tem alta especificidade, porém baixa sensibilidade (ROSENSTEIN, 1998). A baixa sensibilidade decorre da existência de um grande número de mutações conhecidas como causa de FC (mais de 1.000) e do fato de que os painéis comerciais disponíveis para essa análise só estudam uma minoria dessas mutações. Poucos centros de referência podem

disponibilizar painéis com maior número de mutações ou realizar o seqüenciamento genético para o diagnóstico dos casos mais atípicos.

O conhecimento da dimensão e complexidade das mutações do gene CFTR também tem se expandido muito. Em 1996, cerca de 500 mutações foram identificadas, com painéis típicos de triagem comercial para apenas 30 deles. Hoje, mais de 1.500 mutações foram identificadas (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>).

Mutações nocivas no gene podem se apresentar como um espectro de patologias que vão desde a sinusite na vida adulta para comprometimento grave no pulmão, pâncreas, fígado ou doença na infância. Amplos estudos genéticos têm produzido tanto maior consciência do espectro de mutações em populações específicas como uma maior compreensão das relações genótipo/fenótipo, entre mutações do gene CFTR com pouco ou nenhum efeito funcional e aquelas conhecidas ou previstas potencialmente causadoras da doença FC.

Embora a capacidade de teste para mutações do gene CFTR ofereça uma nova dimensão para o diagnóstico da FC, o teste de cloreto no suor continua sendo o procedimento padrão para confirmar um diagnóstico da doença.

Atualmente, o teste do suor é método bioquímico mais utilizado e mais conclusivo para o diagnóstico da FC, na medida em que mais de 99% dos indivíduos homozigotos para o gene da FC tem cloreto no suor e concentrações de sódio acima de 60 e 70 mmol/l, respectivamente (SHWACHMAN, 1981).

Mergni et al., avaliando o programa de triagem neonatal italiano (Florença), encontraram diferença estatisticamente significativa entre a concentração de cloreto no suor de RN com IRT positiva na triagem e portadores da mutação $\Delta F508$, quando comparados com RN negativos para o teste genético.

Neste estudo a concentração média de cloreto no suor foi de 16,4 mmol/l nos indivíduos portadores da mutação enquanto nos que não apresentavam a mutação a média da concentração de cloreto foi de 13,5 mmol/l. A idade média dos indivíduos estudados foi de 65 dias. Neste estudo 161 RN foram submetidos ao teste do suor, 26 (16,1%) portadores da mutação $\Delta F508$ e 135 negativos para o teste genético (MERGNI, 2005).

Soultan et al., de um Instituto de Medicina em Nova York, reavaliando 300 crianças identificadas através da triagem neonatal, portadores de pelo menos uma mutação da FC, recomendaram uma faixa de de cloreto no suor de 24 a 59 mmol/L, menor que o atualmente recomendado. Segundo esses autores alguns indivíduos

com valor de cloreto inferior a 30,0 mmol/l e superior a 24,0 mmol/l podem estar sob risco de desenvolver sintomas da FC (SOULTAN, 2008).

Os valores de referência para o cloreto de suor nos primeiros três meses de vida têm sido largamente determinado a partir de um estudo detalhado de 725 crianças identificadas como estando em risco, através do programa de triagem neonatal ou com base na apresentação clínica que levou 0, 1 ou 2 cópias da mutação do gene CFTR mais comum $\Delta F508$ (FARRELL, 1996).

Todos os lactentes foram submetidos a um teste do cloreto no suor padronizado seguindo a metodologia que atendeu as atuais diretrizes publicadas. As crianças sem um fenótipo FC e sem $\Delta F508$ ($n = 184$) tinham um valor médio do cloreto do suor de $10,6 \pm 5,6$ mmol/L; nomeadamente, apenas um desses recém-nascidos tinha um valor de cloro no suor > 30 mmol/L. Essas crianças que não têm um fenótipo FC, mas eram heterozigotas para $\Delta F508I$ ($n = 128$) tinham um valor médio do cloreto do suor de $14,9 \pm 8,4$ mmol/L, ou um desvio padrão acima da média para aquelas crianças que não tinham a $\Delta F508$, 9 dessas crianças tinham um valor de cloro no suor > 30 mmol/L. Nenhum caso de falso normal foi encontrado nos últimos 10 anos subseqüentes à essa publicação.

Assim, pode-se concluir que os valores de cloro no suor > 30 mmol/L pode ocorrer em indivíduos saudáveis que são heterozigotos para $\Delta F508$. Todos os recém-nascidos homozigotos $\Delta F508$ apresentavam concentrações de cloro no suor > 60 mmol/L.

No presente estudo não foi encontrada diferença significativa nos resultados da dosagem de IRT inicial e na segunda coleta da criança nos indivíduos com FC com e sem a mutação $\Delta F508$. Também o volume de suor obtido por estimulação como esperado não foi diferente nesses indivíduos. No entanto, existe diferença tanto nos valores de condutividade e das concentrações de cloreto naqueles pacientes onde foi detectada pelo menos uma cópia da mutação $\Delta F508$, quando comparados com os que não apresentam essa mutação. Este achado corrobora o encontrado por Mergni *et al.* e de Farrel *et al.*, em seus estudos (FARRELL, 1996; MERGNI, 2005).

Pode-se afirmar que a presença da mutação $\Delta F508$ nos indivíduos com FC confere um valor maior na concentração de cloreto no suor.

6 CONCLUSÕES

1. Observou-se que o volume de suor, condutividade e a concentração de cloreto no suor foram significativamente mais altos em crianças de maior peso ao nascimento ($p = 0,001$). Supõe-se que, um maior volume de suor pode estar associado também ao peso e não somente à idade da criança.
2. Não foi encontrada diferença significativa nos resultados da dosagem de IRT inicial e na segunda coleta da criança nos indivíduos FC independente da presença da mutação $\Delta F508$
3. A presença da mutação $\Delta F508$ confere resultados de condutividade e concentração de cloreto significativamente mais altos do que os obtidos em pacientes sem a presença desta mutação ($p = 0.001$).
4. Observou-se forte correlação entre o método da condutividade e o método quantitativo para determinação de cloreto no suor ($r = 0,97$, Coeficiente de Kappa = 0,89; $p < 0,001$).
5. O teste de condutividade apresentou uma sensibilidade de 100,0%, especificidade de 96,2%, valor preditivo positivo de 83,3%, valor preditivo negativo de 100,0%, acurácia de 96,8%, índice de falso positivo de 16,7% e de falso negativo nulo.
6. O valor de corte sugerido neste estudo foi de 69,0 mmol/l no teste de condutividade (Curva Roc), considerado confirmativo da doença. Os valores de condutividade na faixa de 60 a 69 mmol/l foram sugeridos como os limites do intervalo de equívocos.

Este estudo realizado em um grande número de sujeitos sugere que a condutividade pode ser tão viável como a análise quantitativa de cloro no suor para diagnosticar ou excluir a FC e, portanto, o seu potencial como ferramenta definitiva de diagnóstico para a FC deve ser considerado.

REFERÊNCIAS

ALBELIOVICH, D.; LAVON, I.P.; LERER, I.; COHEN, T.; SPRINGER, C.; AVITAL, A.; CUTTING, G.R. Screening for five mutations detects 97% of cystic fibrosis (CF) chromosomes and predicts a carrier frequency of 1 :29 in the Jewish Ashkenazi population. **Am J Hum Genet**51, 951–956, 1994.

ANDERSEN, D.H.; HODGES, R.G. Celiac Syndrome V. Genetics of ciystic fibrosis of the pâncreas with a consideration etiology. **Am. J Dis Child**72, 62-80, 1966.

ANDERSON, D. Cystic fibrosis of the pancreas and its relationship to celiac disease: Clinical and pathologic study. **Am J Dis Child**56, 344-399, 1938.

ARIS, R.M.; RENNER, J.B.; WINDERS, A.O.; BUELL, H.E.; RIGGS, O.B.; LESTER, G.E.; ONTJES, O.A. Increased rate of fractures and severe kyphosis: Sequelae of living into adulthood with cystic fibrosis. **Ann Intem Med**128, 186-93, 1998.

BALTIMORE, R.S.; CHRISTIE, C.D.C.; WALKER SMITH, G.J. Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. **Am Rev Respir Dis**140, 1650-1661, 1989.

BARONI, M.A.; ANDERSON, Y.E.; MISCHLER, E. Cystic fibrosis newborn screening: impact of early screening results on parenting stress. **Pediatr Nurs**23, 143-151, 1997.

BARTMAN, J.; LANDING, L.H. Morphology of the sweat apparatus in cystic fibrosis. **Am J Clin Pathol**45, 455-459, 1966.

BEAUCHAMP, M.; LANDS, L.C. Sweat-Testing: A Review of Current Technical Requirements. **Pediatric Pulmonology**39, 507-511, 2005.

BINTON, D. Systemic and parenchymal lung diseases. **Elsevier**, 2008. 273-278.

BORGSTRÖM, A.; SVEGER, T.; LINDBERG, T.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Immunoreactive trypsin screening for cystic fibrosis. **Acta Pediatr Scand**71, 621-624, 1982.

BOUCHER, R.C.; STUTTUS, M.J.; KNOULES, M.R.; CANTLEY, L.; GATZ, T. Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia abnormal basal rate and a response to adenilate cyclase activation. **J Clin Invest** 78, 1245-1242, 1986.

BOWLER, I.M.; ESTLIN, E.J.; LITTLEWOOD, J.M. Cystic fibrosis in Asians. **Arch Dis Child**, 68, 120-122, 1995.

BRONSTEIN, M.N.; SOKOL, S.R.; ABMAN, S.H.; CHATFIELD, B.A.; HAMMOND, K.B.; HAMBIDGE, K.M.; STALL, C.D.; ACCURSO, F.J. Pancreatic insufficiency, growth, and nutrition in infants identified by newborn screening as having cystic fibrosis. **J Pediatr**120, 533-540, 1992.

BURGER, J.M.; MARCEK, J.; STUHRMANN, M.; REIS, A.; KRAWCZAK, M.; SCHMIDTKE, J. Genetic influences in the formation of nasal polyps. **Lancet** 337, 974, 1991.

CARSON, J.L.; COLLIER, A.M.; GAMBLING, T.M.; KNOWLES, M.R.; BOUCHER, R.C. Ultrastructure of airway epithelial cell membranes among patients with cystic fibrosis. **Hum Pathol**21, 640-647, 1990.

CASTELLANI, C.; BENETAZZO, M.G.; BONIZZATO, A.; PIGNATTI, P.F.; MASTELLA, G. Cystic fibrosis mutations in heterozygous newborn with hypertrypsinemia and low sweat chloride. **Am J Hum Genet**64, 303-304, 1999.

CHENG, S.H.; RICH, D.P.; MARSHAL, J.; GREGORY, R.J.; WELSH, M.J.; SMITH, A.E. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. **Cell** 66, 1027-1036, 1991.

CHOW, C.W.; LANDAU, L.I.; TAUSSING, L.M. Bronchial mucous glands in the newborn with cystic fibrosis. **Eur J Pediatr**139, 240-243, 1982.

COHN, J.A.; FRIEDMAN, K.J.; NOONE, P.G.; KNOWLES, M.R.; SILVERMAN, L.M.; JOWELL, P.S. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. **N Engl J Med**339, 653-658, 1998.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION COMMITTEE. **Clinical Practice Guidelines For Cystic Fibrosis**1: 54, 1997.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. CONSENSUS CONFERENCES. The Diagnosis of Cystic Fibrosis: **Consensus Statement**7, 1, 1996.

CORREIA, C.A.A. Prevalência de seis mutações no gene CFTR em portadores de fibrose cística da região de Campinas. 2005. 153f. **Tese (Doutorado em Farmacologia)** - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, UNICAMP, Campinas. 2005.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**284, 1318-1322, 1999.

COTLOVE, E.; TRANTHAM, H.V.; BOWMAN, R.L. An Instrument and Method for Automatic, Rapid, Accurate, and Sensitive Titration of Chloride in Biologic Samples. **J. Lab Clin Med** 31, 461-468, 1958.

DAMACENO, N.C.; CARVALHO, C.R. Fibrose Cística - Mucoviscidose. **Arquivos de Gastroenterologia** 33, 08-44, 1996.

DANKERT-ROELSE, J.E.; MEERMAN, G.J. Long term prognosis of patients with cystic fibrosis in relation to early detection by neonatal screening and treatment in a cystic fibrosis centre. **Thorax**50, 712-718, 1995.

DARLING, R.C.; DI SANT AGNESE, P.A.; PERERA, G.A.; ANDERSEN, D.H. Electrolyte abnormalities of sweat in fibrocystic disease of the pâncreas. **Am J Med Sciences**225, 67-70, 1953.

DAVIS, P.V. Cystic fibrosis since 1938. **Am J Respir Crit Care Med**173, 475-482, 2006.

DENNING, C.R.; HUANG, N.N.; CUASAY, L.R. et al. Cooperative study comparing three methods of performing sweat test to diagnose cystic fibrosis. **Pediatrics** 66, 752 -757, 1980.

DI SANT AGNESE, P.A. Fibrocystic Disease of pâncreas a generalized disease of exocrine glands. **J Am Med Assoc**160, 846-853, 1956.

DI SANT AGNESE, P.A.; PERERA, G.A.; SHEA, E. Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. **Pediatrics**12, 549-563, 1953.

DUTHIE, A.; DOHERTY, D.G.; WILLIAMS, C.; SCOTT-JUPP, R.; WARNER, J.O.; TANNER, M.S.; WILLIAMSON, R.; MOWAT, A.P. Genotype analysis for delta F508, G551D and R553X mutations in children and young adults with cystic fibrosis with and without chronic liver disease. **Hepatology** 15,660-664, 1992.

FARBER, S. Pancreatic Function And Disease in Early Life V. Pathologic Changes Associated With Pancreatic Insufficiency, V. Early Life. **Arch Pathol**37, 238-250, 1944.

FARRALL, M.; LAW, H.Y.; RODECK, C.H.; WARREN, R.; STANIER, P.; SUPER, M.; LISSENS, W.; SACAMBLR, P.; WATSON, E.; WAINWRIGHT, B.; WILLIAMSON, R. First-trimester prenatal diagnosis of cystic fibrosis with linked DNA probes. **Lancet** 327, 1402 -1405, 1986.

FARRELL, P.M.; KOSOROK, M.R.; LAXOVA, A.; SHEN, G.; KOSCIK, R.E.; BRUNS, W.T.; SPLAINGARD, M.; MISCHLER, E.H. Nutritional benefits of neonatal screening for cystic fibrosis. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. **N Engl J Med**337,963-969, 1997.

FARREL, P.M.; KOSCIK, R.E. Sweat chloride concentrations in infants homozygous or heterozygous for F508 cystic fibrosis. **Pediatrics** 97, 524-528, 1996.

FARRELL, P.M.; ROSENSTEIN, B.J.; WHITE, T.B.; ACCURSO, F.J.; CASTELLANI, C.; CUTTING, G.R.; DURIE, P.R.; LEGRYS, V.A.; MASSIE, J.; PARAD, R.B.; ROCK, M.J.; CAMPBELL, P.W. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. **J Pediatr**153, S4 - S14, 2008.

FEUILLET-FIEUX, M.N.; FERREC, M.; GIGAREL, N.; THUILLIER, L.; SERMET, I.; STEFFAN, J.; LENOIR, G.; BONNEFONT, J.P. Novel CFTR mutations in black cystic fibrosis patients. **Clin Genetics** 65, 284-287, 2004.

FLIKELSTEIN, S.M.; WIELINSKI, C.L.; ELLIOTT, G.R.; WARWIK, W.J.; BARBOSA, J.; WU, S.C.; KLEIN, D.J. Diabetes mellitus associated with cystic fibrosis. **J Pediatr**112, 373-377, 1988.

EUROPIAN WORKING GROUP ON CF GENETICS. Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. **Hum Genet**85, 436-445, 1990.

GHOSAL, S.; TAYLOR, C.J.; PICKERING, M.; McGAW, J. Head growth in cystic fibrosis following early diagnosis by neonatal screening. **Arch Dis Child**75, 191-193, 1996.

GIBSON, E.; COOKE, R.E. A Test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. **Pediatrics**23,545-549, 1959.

GIGLIO, L.; CANDUSSO, M.; D'ORAZIO, C.; MASTELLA, G.; FARAGUNA, D. Failure to thrive: The earliest feature of cystic fibrosis in infants diagnosed by neonatal screening. **Acta Paediatr**86, 1162-1165, 1997.

HAMMOND, B.K.; ABMAN, S.H.; SOKOL, R.J.; ACCURSO, F.J. Efficacy of Statewide Neonatal Screening for Cystic Fibrosis by Assay of Trypsinogen Concentration. **New Engl J Med**325, 769-774, 1991.

HAMMOND, K.B.; TURCIOS, N.L.; GIBSON, L.E. Clinical evaluation of the macroduct sweat collection system and conductivity analyzer in the diagnosis of cystic fibrosis. **J Pediatr**124, 255-260, 1994.

HEELEY, A.F.; BANGERT, S.K. The Neonatal Detection of Cystic Fibrosis by Measurement of Immunoreactive Trypsin in Blood. **Ann Clin Biochem**29, 361-376, 1992.

HEELEY, M.E.; WOOLF, D.A.; HEELEY, A.F. Indirect Measurements of Sweat Electrolyte Concentration in the Laboratory Diagnosis of Cystic Fibrosis. **Arch Dis Child**82,420-424, 2000.

HEMMILÄ, I.; DAKUBU, S.; MUKKALA, V.M.; SIITARI, H.; LÖVGREN, T. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. **Anal Biochem**137, 335-343, 1984.

HENDERSON, R.C.; MADSEN, C.D. Bone density in children and adolescents with cystic fibrosis. **J Pediatr**128, 28-34, 1996.

HOFFMAN, R.O.; ISENBERG, J.N.; POWELL, G.K. Carbohydrate malabsorption is minimal in school-age cystic fibrosis children. **Dig Dis Sci**32, 1071-1074, 1987.

HONÓRIO, L.F.O.; LUDWIG NETO, N.; BARBOSA, E.; PERIN, N.; GASTALDI, L.A.; FERREIRA, J.E. Avaliação da triagem neonatal para fibrose cística no Estado de Santa Catarina. **J Bras Pneumol**32, 1-2, 2006.

KATZNELSON, D.; SZEINBERG, A.; AUGARTEN, A.; YAHAV, Y. The critical first six months in cystic fibrosis: A syndrome of severe bronchiolitis. **Pediatr Pulmonol** 24, 134-136, 1997.

KEREM, E.; COREY, M./ KEREM, B. S.; DURIE, P.; TSUI, L.C.; LEVISON, H. Clinical and genetic comparisons of patients with cystic fibrosis with and without meconium ileus. **J Pediatr**114, 767-773, 1989.

KEREM, E.; COREY, M.; KEREM, B.S.; ROMMENS, J.; MARKIEWICZ, D.; LEVISON, H.; TSUI, L.C.; DUNE, P. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis - Analysis of the most common mutation (delta F508). **N Engl J Med**323, 1517-1522, 1990.

KING, D.N.; HEELEY, A.F.; WALSH, M.P.; KUZEMKO, J.A. Sensitive trypsin assay for dried-blood specimens as a screening procedure for the early detection of cystic fibrosis. **Lancet**314, 1217 – 1219, 1979.

KIRBY, L.T.; APPLGARTH, D.A.; DAVIDSON, A.G.F.; WONG, L.T.K.; HARDWICK, D.F. Use of a dried blood spot in immunoreactive trypsin assay for detection of cystic fibrosis in infants. **Clin Chem**27, 678-680, 1981.

KNOWLES, M.; GATZY, J.; BOUCHER, R. Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. **J Clin Invest**71, 1410-1417, 1983.

KNOWLES, M.R.; STUTTS, M.J.; SPOCK, A.; FISCHERN, N.; GATZY, J.T.; BOUCHER, R.C. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. **Science** 221,1067-1070, 1983.

KRISTIDIS, P. BOZON, D.; COREY, M.; MARKIEWICZ, D.; ROMMENS, J.; TSUI, L.C.; DURIE, P. Genetic determination of exocrine panereatie function in cystic fibrosis. **Am J Hum Genet**50, 1178–1184, 1992.

LABCONCO, INSTRUCTION MANUAL – DIGITAL CHLORIDOMETER, Model 442-5100 (115v/50 Hz). Kansas City, MO, USA, **Labconco Corporation**, 1-20, 2003.

LANNG, S. Diabetes mellitus in cystic fibrosis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**8,744-747, 1996.

LECOQ, I.; BROUARD, J.; LAROCHE, D.; FEREC, C.; TRAVERT, G. Blood immunoreactive trypsinogen concentration are genetically determined in healthy and cystic fibrosis newborn. **Acta Paediatrica**88, 338-341, 1999.

LeGRYS, V.A. Sweat Analysis Proficiency Testing for Cystic Fibrosis. **Pediatr Pulmonol**30, 476 – 480, 2000.

LeGRYS, V.A. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. **J Pediatr**129, 892-897, 1996.

LeGRYS, V.A.; McCOLLEY, S.A.; ZANHAI, L.; FARRELL, P.M. The Need for Quality Improvement in Sweat Testing Infants after Newborn Screening for Cystic Fibrosis. **J Pediatr**157, 1035-1037, 2010.

LeGRYS, V.A.; YANKASKAS, J.R.; QUITTELL, L.M.; MARSHALL, B.C.; MOGAYZEL, P.J. Diagnostic Sweat Testing: The Cystic Fibrosis Foundation Guidelines. **J Pediatr**151, 85-89, 2007.

LEZANA, J.L.; VARGAS, M.H.; KARAM-BECHARA, J.; ALDANA, R.S.; FURUYA, M.E.Y. Sweat conductivity and chloride titration for cystic fibrosis diagnosis in 3834 subjects. **J Cystic Fibrosis**2, 1-7, 2003.

LIGHT, T.S.; STERN, M.; SHWACHMAN, H. Measurement of the Electrical Conductivity of Sweat. **Clin Chem**3, 37-48, 1957.

MARTINS, C.S.B.; RIBEIRO, A.F.; COSTA, F.F. Frequency of the cystic fibrosis F508 mutation in a population from São Paulo State, Brasil. **Braz J Mes Biol Res**26,1037-1040, 1993.

MASTELLA, G. Sweat Testing : Can the Conductivity Analysis Take the Place of the Classic Gibson and Cooke Technique? **J Pediatría**86, 89-91, 2010.

MATTAR, A.C.V.; GOMES, E.N.; ADDE, F.V.; LEONE, C.; RODRIGUES, J.C. Comparison Between Classic Gibson and Cooke Technique and Sweat. **J Pediatría** 86, 57-60, 2010.

MAYELL, S.J.; MUNCK, A.; CRAIG, J.V.; SERMET, I.; BROWNLEE, K.G.; SCHWARTZ, M.J.; CASTELLANI, C.; SOUTHERN, K.W. European Consensus for the Evaluation and Management of Infants With an Equivocal Diagnosis Following Newborn Screening for Cystic Fibrosis. **J Cystic Fibrosis**8, 71-78, 2009.

MERGNI, G.F.; FESTINI, F.; TACCETTI, G.; REPETTO, T.; CHIARELLI, F. Sweat Chloride Concentrations are Higher in IRT- Positive Newborns With One CFTR Mutation Than in Other IRT- Positive Neonates. **J Cystic Fibrosis**4, 123-125, 2005.

MISHRA, A.; GREAVES, R.; SMITH, K.; CARLIN, J.B.; WOOTTON, A.; STIRLING, R. Diagnosis of Cystic Fibrosis by Sweat Testing: Age-Specific Reference Intervals. **J Pediatr**153,758-763, 2008.

MORAN, A.; HARDIN, D.; RODMAN, D. et ali. Diagnosis, screening and management of cystic fibrosis related diabetes mellitus: A consensus conference report. **Diabetes Res Clin Pract**45, 61-73, 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Analysis; Approved Guideline – Second Edition. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Pennsylvania, 13, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Blood Collection on Filter Paper for Neonatal Screening Programs – Second Edition; Approved Standard. **NCCLS Document LA4-A2**. Pennsylvania, 12, 1992.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Internal Quality Control: Principles and Definitions; Approved Guidelines. NCCLS Document C24-A. **National Committee for Clinical Laboratory Standards** - Approved Guidelines. NCCLS Document C24-A. Pennsylvania, 11, 1991.

OLMOY, A.; AMON, J.; KATZNELSON, D.; GRANAT, M.; CASPI, B.; CHEMKE, J. Pathological confirmation of cystic fibrosis in the fetus following prenatal diagnosis. **Am J Med Genet**28, 935-947, 1987.

PADOA, C.; GOLDMAN, A.; JENKINS, T.; RAMSAY, M. Cystic fibrosis carrier frequencies in populations of African origin. **J Med Genetics**36, 41-44, 1999.

QUINTOM, P.M. Physiological basis of cystic fibrosis: A historical perspective. **Physiol Rev**79, 3-22, 1999.

QUINTON, P. M. Chloride Impermeability in Cystic Fibrosis. **Nature**301, 421-422, 1983.

QUINTON, P.M. Cystic fibrosis: A disease in electrolyte transport. **Faseb J**4, 2709-2717, 1990.

QUINTON, P.M.; BIJMAN, J. Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. **N Engl J Med**308, 1185-1189, 1983.

RAM, S.I.; WEAVER, M.L.; KIRK, K.L. Regulation of Cl⁻ permeability in normal and cystic fibrosis sweat duct cells. **Am J Physiol**259, 842-846, 1990.

RASKIN, S. DNA Analysts of cystic fibrosis in Brasil by direct PCR amplification from Guthrie Cards. **J Hum Genetic**46, 665-669, 1993.

RASKIN, S. Estudo multicêntrico das bases de genética molecular e da epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras. 1993. 497f. **Tese (Doutorado em Genética)** – Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1993.

RIBEIRO, J.D.; RIBEIRO, M.A.G.O.; RIBEIRO, A.F. Controvérsias na FC – do pediatra ao especialista. **J Pediatria**78, 171-186, 2002.

ROCK, M.J.; MISCHLER, E.H.; FARRELL, M.P.; WEI, J.; BRUNS, W.T.; HASSEMER, J.D.; LAESSING, R.H. Newborn Screening For Cystic Fibrosis Is Complicated By Age-Related Decline In Immunoreactive Trypsinogen Levels. **Pediatrics**85, 1001-1007, 1990.

RODRIGUES, R.; GABETTA, C.S.; PEDRO, K.B.; VALDERATO, F.; FERNANDES, M.I.M.; MAGALHÃES, P.K.R.; JANUÁRIO, J.N.; MACIEL, L.M.Z. Fibrose cística e a triagem neonatal. **Cadernos de Saúde Pública**24, 475-484, 2008.

RODRIGUES, R.; MAGALHÃES, P.K.R.; FERNANDES, M.I.M.; GABETTA, C.S.; RIBEIRO, A.F.; PEDRO, K.P.; VALDERATO, F.; SANTOS, J.L.F.; SOUZA, R.M.; PAZIN FILHO, A.; MACIEL, L.M.Z. Neonatal Screening for Cystic Fibrosis in São Paulo State, Brazil: a Pilot Study. **Braz J Med Biol Res**42, 973-978, 2009.

ROMMENS, J.M.; IANNUZZI, M.C.; KEREM, B.; DRUMM, M.L.; MELMER, G.; DEAN, M.; ROZMAHEL, R.; COLE, J.L.; KENNEDY, D.; HIDAKA, N.; ZSIGA, M.; BUCHWALD, M.; RIORDAN, J.R.; TSUI, L.C.; COLLINS, F.S. Identification of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene: Chromosome walking and jumping. **Science**245,1059-1065, 1989.

ROSENSTEIN, B.J.; CUTTING, G.R. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. **J Pediatr**132, 589-595, 1998.

RUBINSTEIN, S.; MOSS, R.; LEWISTON, N. Constipation and meconium ileus equivalent in patients with cystic fibrosis. **Pediatrics** 78, 473 -479, 1986.

SÁNCHEZ-SOLIS, M.; SALCEDO, A.; VÁSQUEZ, C.; GARTNER, S. Por el Grupo de Trabajo Fibrosis Quística de La Sociedad Española de Neumología Pediátrica. Protocolo de diagnóstico y seguimiento de los enfermos con Fibrosis Quística. **An Esp Pediatr**50, 625-634, 1999.

SANTOS, G.P.C.; DOMINGOS, M.T.; WITTIG, E.O.; RIEDI, C.A.; ROSÁRIO, N.A. Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. **J Pediatr**81, 240 – 244, 2005.

SCHIDLOW, D.V.; TAUSSIG, L.M.; KNOWLES, M.R. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference Report on Pulmonary Complications of Cystic Fibrosis. **Pediatr Pulmonol**15, 187-198, 1993

SCREEVER, R.C.; SLY, W.S.; CHILDS, B.; BEAUDET, A.L.; VALLE, D.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, McGraw-Hill, 2001. 5121-5173.

SHWACHMAN, H.; MAHMOODIAN, A.; NEFF, R.K. The sweat test: sodium and chloride values. **J Pediatr**98, 576-578, 1981.

SOINI, E.; KOJOLA, H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates - a new generation of nonisotopic immunoassays. **Clin Chem**29, 65-68, 1983.

SOKOL, R.J.; DURIE, P.R. Recommendations for management of liver and biliary tract disease in cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Hepatobiliary Disease Consensus Group. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**28, S1-S13, 1999..

SOULTAN, Z.N.; FOSTER, M.M.; NEWMAN, N.B.; ANBAR, R.D. Sweat Chloride Testing in Infants Identified as Heterozygote Carriers by Newborn Screening. **J Pediatr**153, 857-859, 2008.

STERA, R.C.; BOAT, T.F.; DOERSCHUK, C.F. Obstrutive azospermia as a diagnostic criterion for the cystic fibrosis synoromg. **Lancet**1, 1401-1404, 1982.

THE CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM. Population Variation of Common Cystic Fibrosis Mutations. **Hum Mutat**4, 167-177, 1994.

THE CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. **N Engl J Med**330, 865-867, 1994.

THERREL, B.L.; LLOYD-PURYEAR, M. MANN, M.Y. Understanding Newborn Screening System Issues With Emphasis on Vystic Fibrosis Screening. **J Pediatr**147, S06-S10, 2005.

TSUI, L.C.; REMMENS, J.; KEREM, B.; RCZMAHEL, R.; ZTELENSKI, J.; KENNEDY, D. ET ali Molecular Genetics of cystic fibrosis. **Adv Exp Flgo Biol**290, 9-17, 1991.

WARREN, E.; LeGRYS, V.A.; ACHECHTER, M.S.; LAUGHON, M.M.; BARKER, P.M. Sweat-Testing in Preterm and Full-Term Infants Less Than 6 Weeks of Age. **Pediatric Pulmonol**40, 64-67, 2005.

WELSH, M.J.; SMITH, A.E. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. **Cell**2, 1251-1254, 1993.

WESCOR I. MACRODUCT SWEAT COLLECTION SYSTEM – **Instruction Service Manual**. Logan, Utah, WESCOR, INC, 2002.

WESCOR I. SWEAT CHEK - Sweat Conductivity Analyzer **Instruction Service Manual** Wescor Inc, 1999.

WILCKEN, B. Newborn screening for cystic fibrosis: Its evolution and a review of the current situation. **Screening** 2, 43-62, 1993.

WILCKEN, B.; WILEY, V.; SHERRY, G.; BAYLISS, U. Neonatal Screening for Cystic Fibrosis: A Comparison of Two Strategies for Case Detection in 1,2 Million Babies. **J Pediatr**127, 965-970, 1995.

WILFOND, B.S.; FARRELL, P.M.; LAXOVA, A.; MISCHLER, E. Severe hemolytic anemia associated with vitamin E deficiency in infants with cystic fibrosis. Implications for neonatal screening. **Clin Pediatr**33, 2-7, 1994.

WILSCHANSKI, M.; ZIELENSKI, J.; MARKIEWICZ, D.; TSUI, L.C.; COREY, M.; LEVISON, H.; DURIE, P.R. Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. **J Pediatr**127, 705-710, 1995.

WILSON, D.C.; PENCHARZ, P.B. Nutrition and cystic fibrosis. **Nutrition**14, 792-795, 1998.

YAMASHIRO, Y.; SHIMIZU, T.; OGUCHI, S.; SHIOYA, T.; NAGATA, S.; OHTSUKA, Y. The estimated incidence of cystic fibrosis in Japan. **J Pediatric Gastroenterol Nutr**24, 544-547, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – ARTIGO PARA SER SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO

ANEXO 3 - EQUIPAMENTO AUTODELFIA UTILIZADO NA TRIAGEM NEONATAL E PESQUISA DA IRT - MACRODUCT – UTILIZADO NO TESTE DA CONDUTIVIDADE NO SUOR - CLORIDRÔMETRO – UTILIZADO NA DOSAGEM QUANTITATIVA DO CLORETO NO SUOR



ANEXO 4 – RESULTADO DE EXAME DA TRIAGEM NEONATAL

 <p>FEPE - FUNDAÇÃO ECUMÊNICA DE PROTEÇÃO AO EXCEPCIONAL Avenida Alberto Coimbra Assis, 816 - Jd. São Manoel - CEP: 16015-170 161.362-3422 - Curitiba - Paraná - Brasil - www.fepe.org.br - info@fepe.org.br</p>	 <p>FEPE - FUNDAÇÃO ECUMÊNICA DE PROTEÇÃO AO EXCEPCIONAL Avenida Alberto Coimbra Assis, 816 - Jd. São Manoel - CEP: 16015-170 161.362-3422 - Curitiba - Paraná - Brasil - www.fepe.org.br - info@fepe.org.br</p>	<p>CONDIÇÃO</p> <p>RESULTADO NORMAL</p>
<p>IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE</p> <p>Nome Completo: DE MORAES, DAVI Data de Nascimento: 24/02/2003 Sexo: MASCULINO Data de Exame: 04/07/2003 Hora de Exame: 09:07:50 Mãe: DE MORAES, SUELI Endereço: 201114</p>	<p>EXAME NEONATAL - TESTE DO PEZINHO</p> <p>DATA: 04/07/2003 HORA: 09:07:50 NOME DO PAI: DE MORAES, DAVI NOME DA MÃE: DE MORAES, SUELI NOME DO LACTANTE: DE MORAES, DAVI DATA DO EXAME: 04/07/2003 HORA DO EXAME: 09:07:50 DATA DE NASCIMENTO: 24/02/2003 HORA DO NASCIMENTO: 09:07:50</p>	<p>UNIDADE SAÚDE DEBENHO 13040 1613623422</p> <p>RESPOSTA DO LACTANTE: NORMAL</p>
<p>TESTES COMPLEMENTARES</p> <p>TESTE DE BILIRUBINA: OK TESTE DE ALT: OK TESTE DE GOTAS: OK TESTE DE SANGUE: OK TESTE DE URINA: OK</p>	<p>VALORES DE REFERÊNCIA</p> <p>Índice de Qualidade: 1,12 Índice de Referência: 0,75 Índice de Qualidade: 20,89 Índice de Referência: 14 Índice de Qualidade: 1,32</p>	<p>PROGRAMA NACIONAL DE TRIAGEM NEONATAL - PARANÁ</p> <p>TESTE DO PEZINHO</p> <p>FEPE - Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Paraná</p>
<p>EXAME OBJETIVO E SUBJETIVO</p>		

ANEXO 5 – RESULTADO DO TESTE DO SUOR



FUNDAÇÃO ECUMÊNICA DE PROTEÇÃO AO EXCEPCIONAL
Escola de Educação Especial Ecumênica
Serviço de Referência em Triagem Neonatal
 Sede: Av. Prof. Lothário Meissner, 836 - Jardim Botânico - Curitiba - Paraná
 CEP: 80210-170 - Fone/Fax: (041) 3111-1800
 Subsede: Rua. Dr. Alarico Vieira Alencar, 7 - Bacacheri - Curitiba - Paraná
 CEP: 82520-760 - Fone/Fax: (041) 3362-5245
 Site: www.fepe.org.br



=====

TESTE DO SUOR

=====

MAE.....: [REDACTED]
 DATA DO TESTE.: 05/12/2008 HORA.: 07:27 DURACAO.: 30 MINUTOS
 CRIANÇA.....: [REDACTED] DNV.: 46764825
 NASCIMENTO....: 28/06/2008 RG.(Fepe): 1878550 / 08

RESULTADO DO TESTE DO SUOR - CONDUTIVIDADE

METODO.....: CONDUTIVIDADE
 APARELHO.....: SWEAT.CHEK (WESCOR)
 ESTIMULACAO DO SUOR POR IONTOFORESE POR PILOCARPINA
 RESULTADO CONDUTIVIDADE.....: 77.00 mmol/l

VALOR DE REFERENCIA
 NORMAL ATE 40 mmol/l
 LIMITROFE 40 - 70 mmol/lNECESSITA REPETIR
 POSITIVO maior ou igual - 70 mmol/l ... (CONSULTA MEDICA)

MENSAGEM.: PROCURAR SERVICO MEDICO PARA ORIENTACAO.
 MARCAR CONSULTA GRATUITA NO HOSPITAL DE CLINICAS
 SERVICO DE PNEUMOLOGIA PEDIATRICA.
 RUA GENERAL CARNEIRO, 181

RESULTADO DO TESTE DO SUOR - DOSAGEM QUANTITATIVA Cl

METODO.....: TITULACAO COULOMETRICA
 APARELHO.....: DIGITAL CHLORIDOMETER
 RESULTADO DA DOSAGEM.....: 62.00 mmol/lCl Suor

VALOR DE REFERENCIA
 NORMAL ATE 30 mmol/l
 LIMITROFE 30 - 50 mmol/lNECESSITA REPETIR
 POSITIVO maior ou igual - 50 mmol/l ... (CONSULTA MEDICA)

MENSAGEM.: PROCURAR SERVICO MEDICO PARA ORIENTACAO.
 MARCAR CONSULTA GRATUITA NO HOSPITAL DE CLINICAS
 SERVICO DE PNEUMOLOGIA PEDIATRICA.
 RUA GENERAL CARNEIRO, 181

RESULTADO DA TRIAGEM NEONATAL PARA FIBROSE CISTICA

METODO.....: IMUNOFLUORIMETRICO - DOSAGEM IRT (Tripsina Imunoreativa)
 APARELHO.....: AUTO DELFIA
 FIBROSE CISTICA (IRT): 129.00 ng/ml EM 22/07/2008

VALOR DE REFERENCIA >>> NORMAL ATE 70 ng/ml
 VALIDO SOMENTE ATE 30 DIAS DE VIDA DA CRIANCA

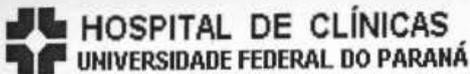
DRA. MOUSELINE - BIOQUIMICA
 CRF-9 Nr. 3910

Este bebe fez o "teste do suor" para diagnostico de Fibrose Cistica com uso de estimulante cutaneo de nitrato de pilocarpina.
 Raramente pode ocorrer reacao alergica, local ou difusa. Sugerimos neste caso que procure o seu medico para verificar a
 necessidade de tratamento.

C.N.P.J. 76.693.076/0001-01
 Declarada de Utilidade Pública Federal conforme decreto lei nº 50.517 de 02/05/1961 e lei nº 91, de 28/08/1935
 Registro no Conselho Nacional de Serviço Social (CNAS) nº 28987.008609/93-26
 Declarada de Utilidade Pública Estadual conforme lei nº 6280, de 02/06/1972
 Declarada de Utilidade Pública Municipal conforme lei nº 4003, de 06/12/1971



ANEXO 6 – APROVAÇÃO PELO CEP E FEPE



HOSPITAL DE CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



CEP/HC/UFPR

Curitiba, 26 de junho de 2008.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dra Mouseline Torquato Domingues
Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional

Prezado(a) Pesquisador(a):

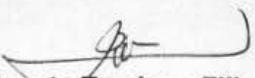
Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “O Teste do suor como diagnóstico confirmatório na triagem neonatal da Fibrose Cística no Estado do Paraná”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 24 de junho de 2008. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0117.0.208.000-08
Registro CEP: 271EXT025/2008-06

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 26 de dezembro de 2008.

Atenciosamente,



Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR



Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional
CENTRO DE PESQUISAS

Av. Prof. Lothário Meissner, 836 - Jardim Botânico
 Fone/Fax: (041) 362-1890
 80210-170 – Curitiba – Paraná



Curitiba, 27 de Maio de 2008

Ao Comitê de Ética em Pesquisa do HC/UFPR

Prezado Coordenador:

Declaramos que nós da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional, estamos de acordo com a condução do projeto de pesquisa **“O Teste do Suor como Diagnóstico Confirmatório na Triagem Neonatal da Fibrose Cística no Estado do Paraná”** sob a responsabilidade de Mouseline Torquato Domingos, nas nossas dependências, tão logo o projeto seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, até o seu final em Agosto de 2009.

Estamos cientes que os sujeitos de pesquisa serão os Recém Nascidos participantes da triagem neonatal no Paraná (Teste do Pezinho) do período de Janeiro de 2002 à Dezembro de 2007 e que o presente trabalho deve seguir a resolução 196/96 do CNS e complementares.

Sendo o que se apresenta aproveitamos para enviar nossas cordiais saudações.

Atenciosamente,

 José Alcides Marton da Silva
 Presidente da FEPE

C.N.P.J 78.693.076/0001-01

Declarada de Utilidade Pública Federal conforme decreto-lei nº 50.517, de 02/05/91 e lei nº 91, de 28/08/1935

Registro no Cons.Nac.De Serv.Social conforme processo 022.144/64, de 19/05/1964.

Declara de Utilidade Pública Estadual conforme lei nº 6280, de 06/06/1972.

Declarada de Utilidade Pública Municipal conforme lei nº 4003, de 06/12/1971.