

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**FIBROSE CÍSTICA: UM ESTUDO DA APRESENTAÇÃO  
FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO RECÉM-NASCIDO NO ESTADO  
DO RIO GRANDE DO SUL**

Grazielle Motta Rodrigues

Porto Alegre, dezembro de 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**FIBROSE CÍSTICA: UM ESTUDO DA APRESENTAÇÃO  
FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO RECÉM-NASCIDO NO ESTADO  
DO RIO GRANDE DO SUL**

Trabalho de Conclusão de Curso  
de graduação apresentado à  
Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como requisito  
para obtenção do grau de  
Farmacêutica.

Grazielle Motta Rodrigues  
Orientadora: Prof. Dra. Simone Martins de Castro  
Co-orientadora: MSc. Thaiane Rispoli Serrano

Porto Alegre, dezembro, 2018

*“É preciso força pra sonhar e perceber  
que a estrada vai além do que se vê”*

**Los Hermanos**

## Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora Prof. Dra. Simone Martins de Castro, por confiar à mim o desenvolvimento deste trabalho e por todos estes anos de orientação e parceria. Obrigada pelas dicas, conselhos e por sempre acreditar em mim.

À minha co-orientadora, Thaiane Rispoli, pela ajuda em todos os momentos, pela amizade e carinho nesses anos em que trabalhamos juntas. Obrigada por acreditar e confiar em mim às vezes mais do que eu mesma conseguia e por tentar me convencer em todos os momentos disso. Muito obrigada por tudo.

Aos amigos do CDCT, que muitas vezes foram minha válvula de escape durante os dias difíceis da graduação, tornaram o laboratório minha segunda casa e me ensinaram muito. Obrigada, vocês são *SHOW*. Agradeço, em especial, às amigas Gabriela das Neves, Betânia Ponce e Karine Andrade, que foram colegas de estágio e hoje são parte da minha vida. Vocês foram mais que colegas e mais que amigas. Amo vocês.

Às amigas Bianca Rocha e Micheli Ferla, que foram muito importantes durante esse período. Obrigada pela paciência nos momentos difíceis e por compartilharmos tanto carinho e amizade.

Aos amigos que hoje são profissionais dos quais eu me orgulho imensamente, Aline Kayser e Gilberto Soares, e às amigas que como eu seguem nesse caminho, Thamires Borges e Franciele Lopes. Obrigada por todos os momentos de cumplicidade, apoio e ajuda. Amo vocês por tudo que são e por tudo que dividimos.

E, por fim, à minha família. À minha mãe Celair e ao meu pai Loedi, que fizeram o possível para tornar essa jornada real. Muito obrigada pelo apoio incondicional e por me ensinarem a respeitar o tempo em que as coisas precisam acontecer. Vocês foram a base e o empurrãozinho de todos os dias pra que eu não desistisse nas primeiras dificuldades. Às minhas irmãs, Gisele e Simone, obrigada pela cumplicidade. Obrigada por serem o suporte que eu sempre tive e terei.

Ainda bem que a gente não faz nada sozinho.

Muito obrigada.

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista *Frontiers in Genetics* (anexo 1), na qualidade de “Artigo Original”. A versão em língua inglesa será elaborada após as correções e sugestões da banca revisora.

# Fibrose cística: um estudo da apresentação fenotípica e genotípica do recém-nascido no estado do Rio Grande do Sul.

Grazielle Motta Rodrigues<sup>1</sup>, Thaiane Rispoli Serrano<sup>2</sup> e Simone Martins de Castro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

**Autor correspondente:**

Profª Dra. Simone Martins de Castro  
Departamento de Análises  
Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.  
Avenida Ipiranga, 2752, sala 304B  
Porto Alegre, RS, Brasil. CEP 90.610-000  
[simonecastro13@gmail.com](mailto:simonecastro13@gmail.com)

## RESUMO

**Introdução:** A Fibrose Cística (FC) é uma doença monogênica, autossômica recessiva. É causada por mutações no gene *CFTR*, responsável por codificar a proteína CFTR, localizada principalmente na membrana apical de células epiteliais de diversos órgãos. As consequências da disfunção da proteína geralmente começam antes do nascimento do indivíduo com FC. As alterações do sistema gastrointestinal, do pâncreas e do sistema respiratório estão entre as primeiras manifestações clínicas. O objetivo deste trabalho foi descrever as características clínicas, genótípicas e laboratoriais mais frequentes em pacientes fibrocísticos do RS até o momento da primeira consulta.

**Metodologia:** Estudo transversal e descritivo dos recém-nascidos diagnosticados com FC, triados pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Rio Grande do Sul (SRTN/RS), no período de 2012 à 2018, submetidos ao estudo molecular.

**Resultados:** Entre os 61 pacientes incluídos neste estudo, 20% possuíam baixo peso ao nascimento e somente 9,8% eram assintomáticos na primeira consulta. Entre as manifestações clínicas mais frequentes, observou-se esteatorreia (31,1%) e tosse (29,5%). Íleo meconial manifestou-se em 24,6% dos recém-nascidos. O tripsinogênio imunorreativo (TIR) apresentou valores significativamente mais baixos em recém-nascidos com histórico de íleo meconial, e significativamente mais elevados em pacientes que possuíam a mutação p.Phe508del. Essa mutação foi observada em 66,7% do total de alelos estudados nos recém-nascidos fibrocísticos.

**Conclusão:** A interpretação da relação genótipo-fenótipo ainda é um desafio, pois a análise genética isolada não é suficiente para prever a gravidade da FC. A grande heterogeneidade fenotípica pode ser explicada devido a ação de influências ambientais e genes modificadores. Mais estudos devem ser realizados para o melhor entendimento do efeito do genótipo sobre o início e a evolução das manifestações clínicas do indivíduo com FC.

**Palavras-chave:** fibrose cística, genótipo-fenótipo, recém-nascido, triagem neonatal.

## 1. INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença monogênica, herdada geneticamente, que possui característica autossômica recessiva. Essa doença afeta aproximadamente 75.000 pessoas ao redor do mundo, sendo 44.000 só na Europa (Jennings e Flume, 2018; Orenti *et al.*, 2016). Segundo o Registro Brasileiro de Fibrose Cística do ano de 2016 (REBRAFC), existem aproximadamente 4.654 pacientes fibrocísticos registrados em centros de referência no Brasil (Filho *et al.*, 2016).

A FC é causada por mutações no gene denominado regulador da condutância transmembranar da fibrose cística (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* - *CFTR*). Esse gene é responsável por codificar a proteína CFTR localizada, principalmente, na membrana apical de células epiteliais de diversos órgãos, incluindo o trato respiratório, o pâncreas exócrino, o intestino, os vasos deferentes, o sistema hepatobiliar e as glândulas sudoríparas. A proteína CFTR desempenha um papel importante no equilíbrio hidroeletrolítico das secreções presentes na membrana luminal, mantendo a fluidez ciliar das células epiteliais e a viscosidade do muco (MacDonald *et al.*, 2007). Mutações no gene *CFTR* podem resultar em uma proteína defeituosa, o que leva a formação de uma maior quantidade e viscosidade do muco (MacDonald *et al.*, 2007). Atualmente, 2.031 mutações no gene já foram identificadas (disponível em <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>), sendo 336 dessas mutações conhecidamente patogênicas (disponível em <https://www.cftr2.org>) (Cutting *et al.* 2011). Essas mutações são classificadas de acordo com o mecanismo pelo qual irá interromper a síntese, o tráfego, o dobramento, a estabilidade ou a estrutura da proteína (classes I a VI) (De Boeck e Amaral, 2016).

No Brasil, o diagnóstico da FC foi incluído no Sistema Único de Saúde (SUS) em 2013 durante a fase III do Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde (PNTN/MS), o qual estabelece o rastreamento através da dosagem do tripsinogênio imunorreativo (TIR). O tripsinogênio é uma proteína precursora da enzima tripsina, elevada em recém-nascidos fibrocísticos até 30 dias de idade (Mishra *et al.*, 2005). Essa elevação ocorre devido à obstrução dos ductos pancreáticos, impedindo que o tripsinogênio alcance o intestino, onde é convertido em tripsina, gerando aumento da concentração desta proteína no sangue. Valores de TIR alterados (acima de 70 ng/mL) são repetidos antes dos 30 dias de idade (Therrell *et al.*, 2012; Rispoli *et al.*, 2018). No entanto, a dosagem do TIR pode ser imprecisa, levando a resultados falso-positivos, falso-negativos ou mesmo incertos (Farrell *et al.*, 2017). Quando a triagem neonatal é positiva, o recém-nascido é encaminhado para a etapa diagnóstica, que compreende a dosagem de eletrólitos no suor, a avaliação clínica e o teste genético para a pesquisa das seguintes mutações: p.Arg1162X, p.Gly85Glu, p.Arg117His, c.2657 + 5G>A, p.Gly542X, p.Arg334Trp, p.Trp1282X, p.Arg553X, c.1585-1G>A, c.2988 + 1G>A e p.Gly551Asp (Rispoli *et al.*, 2018).

A presença do suor salgado é uma característica fortemente sugestiva de FC. Indivíduos fibrocísticos possuem níveis elevados de íons cloro e sódio no suor, devido a disfunção da proteína CFTR, que leva a uma perda excessiva de sódio por glândulas sudoríparas. A dosagem dos eletrólitos é realizada através do teste do suor pela determinação das concentrações de íons cloreto e sódio por colorimetria e fotometria de chama, respectivamente (Gibson e Cooke, 1959). Concentrações de íon Cl<sup>-</sup> acima de 60 mmol/L representam um teste positivo. Valores até 29 mmol/L são considerados negativos e valores entre 30 e 59 mmol/L são intermediários, podendo ou não ser FC (Athanasio *et al.*, 2017).

A análise molecular das mutações relacionadas a FC pode ajudar a estabelecer o diagnóstico em pacientes em que o teste do suor é limítrofe. A mutação p.Phe508del é a mais frequente entre os pacientes com FC, estando presente em aproximadamente 70% dos alelos em estatística mundial (disponível em <https://www.cftr2.org>). Essa mutação é causada por uma deleção de três nucleotídeos, que resulta na ausência do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína de 1.480 aminoácidos, afetando o tráfego dessa até a superfície da célula (Marson *et al.*, 2013; De Boeck e Amaral, 2016).

Devido ao custo e ao grande espectro de mutações patogênicas já descritas, a análise molecular ainda é realizada em poucos estados do Brasil e muitas vezes restrita apenas à pesquisa da mutação p.Phe508del. No estado do Rio Grande do Sul (RS), o diagnóstico molecular é realizado a partir da pesquisa dessa mutação, seguida de um painel de investigação molecular com as 11 mutações mais frequentes no estado, quando necessário (Rispoli *et al.*, 2018).

As consequências de mutações no gene responsável pela FC sobre a disfunção da proteína CFTR geralmente começam antes do nascimento e alterações do sistema gastrointestinal estão entre as primeiras manifestações na FC (De Lisle e Borowitz, 2013). O íleo meconial ocorre em cerca de 20% dos pacientes fibrocísticos e é uma importante causa de obstrução intestinal, que pode ser identificada ainda no útero, por ultrassonografia da gestante durante o pré-natal (Oliveira *et al.*, 2002; Brennan e Schrijver, 2016). Esse quadro clínico é causado pelo aumento da viscosidade do mecônio o que causa obstrução física do íleo terminal e do intestino delgado próximo à obstrução (Vázquez *et al.*, 2013). Como consequência, ocorre a dilatação da porção ileal do intestino com mecônio adicional, gás e líquido, podendo evoluir para necrose isquêmica ou perfuração e extrusão do mecônio no peritônio (Sathe e Houwen, 2017).

Após o nascimento, uma das manifestações clínicas mais frequentes está associada à função pancreática. Devido à alta expressão do gene *CFTR* no pâncreas (Gillen e Harris, 2012), este órgão é fortemente afetado pela disfunção da proteína CFTR, e as manifestações da doença se devem à obstrução dos ductos pela secreção espessa acumulada. As glândulas exócrinas presentes no pâncreas são responsáveis pela secreção de enzimas digestivas no lúmen intestinal. Quando há obstrução pelo muco espesso, o acúmulo das enzimas pancreáticas nos ácinos leva a sua autodigestão, resultando em pancreatite (Yu e Sharma, 2018), formação de cistos e fibrose do tecido pancreático (Klimova *et al.*, 2017).

A insuficiência pancreática é uma manifestação presente em 63% de recém-nascidos fibrocísticos, e quase 30% dos neonatos que possuem o pâncreas suficiente se tornam insuficientes até os 36 meses de idade (Struyvenberg *et al.*, 2017). A presença de esteatorreia é um dos fatores mais utilizados para a classificação da insuficiência pancreática exócrina devido a alterações pancreáticas que resultam em má absorção de lipídeos (esteatorreia) e por consequência, baixo peso corporal (Walkowiak *et al.*, 2001; VanDevanter *et al.*, 2016).

Outra manifestação clínica importante é a redução da função pulmonar devido à disfunção da proteína CFTR, que leva a alteração do efluxo dos íons cloreto e a hiperabsorção não regulada dos íons de sódio, acarretando em desequilíbrio osmótico (Derichs *et al.*, 2011). Como consequência, ocorre a formação e o acúmulo de muco mais espesso na superfície das células epiteliais, além da produção de secreções mais viscosas nos tecidos exócrinos. Em decorrência dessas alterações, pacientes fibrocísticos são mais susceptíveis à colonização bacteriana crônica, à infecção e inflamação das vias aéreas, gerando o estímulo da tosse e exacerbação pulmonar (Wark e McDonald, 2018).

O grande número de mutações na fibrose cística e seu comportamento multissistêmico leva a uma ampla variedade fenotípica. Um diagnóstico precoce, ainda nos primeiros dias de vida, aumenta a sobrevida dos pacientes e melhora a qualidade de vida. Nosso objetivo foi descrever as características clínicas, genotípicas e laboratoriais mais frequentes em pacientes fibrocísticos triados pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do RS (SRTN/RS) até o momento da primeira consulta.

## **Materiais e métodos**

### **Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo transversal e descritivo. Foram incluídos neste estudo todos os recém-nascidos diagnosticados com FC pelo SRTN/RS, triados pelo SUS, no período de 2012 à 2018, que foram submetidos ao estudo molecular.

### **Crítérios de inclusão**

O diagnóstico de FC no estado do RS é baseado na dosagem de TIR, na dosagem de eletrólitos no suor e na pesquisa molecular. São necessárias duas amostras alteradas de TIR, coletadas em momentos distintos, com valores maiores que 70 ng/mL (Rispoli *et al.*, 2018; Therrell *et al.*, 2012). A primeira coleta é realizada de 3 a 5 dias após o nascimento, com a confirmação em uma segunda coleta realizada até 30 dias de vida (Athanzio *et al.*, 2017). Quando as duas dosagens estão acima do valor de referência, considera-se o teste de triagem positivo. A partir dessa etapa, o recém-nascido é encaminhado para estudos confirmatórios. Os exames confirmatórios contemplam: consulta com médico pneumologista pediátrico, estudo molecular no gene *CFTR* e a realização do Teste do Suor.

### **Crítérios de exclusão**

Foram excluídos do estudo os pacientes que tiveram o diagnóstico de FC tardio, baseados em critérios clínicos ou procedentes de rede privada. Também foram excluídos pacientes que não estavam com diagnóstico conclusivo até o encerramento deste estudo.

### **Coleta de dados**

Foram coletados, através da análise dos prontuários, os dados laboratoriais e os fenótipos clínicos obtidos na primeira consulta do recém-nascido no Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV/PMPA). Os dados coletados incluem dados epidemiológicos (data de nascimento, sexo, etnia, cidade de origem, idade na consulta, idade na realização dos testes de TIR e no teste do suor), dados antropométricos (peso ao nascimento, peso no momento da primeira consulta, ganho ponderal por dia até a primeira consulta) e dados laboratoriais da triagem neonatal (dosagens de TIR na primeira e segunda amostras, concentração de íons cloreto e sódio e massa de suor nas duas primeiras coletas realizadas). Foram coletadas também as informações de manifestações clínicas obtidas a partir do exame clínico do recém-nascido e da entrevista com os pais durante a consulta médica (presença de íleo meconial, suor salgado, tosse, taquipneia, dificuldade respiratória e esteatorreia) e dados genéticos das mutações encontradas durante a análise molecular.

### **Análise Estatística**

As variáveis quantitativas foram descritas por média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartil. As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e relativas. Para comparar médias, o teste *t-student* ou análise de variância

(ANOVA) foram aplicados. Em caso de assimetria, os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados, respectivamente. Na comparação de proporções, os testes qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher foram aplicados. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ) e as análises foram realizadas no programa SPSS versão 21.0.

## **Resultados**

Entre maio de 2012 e outubro de 2018 foram diagnosticados 61 pacientes com fibrose cística a partir do SRTN/RS: 25 (41%) eram do sexo masculino e 36 (59%) do sexo feminino. Destes pacientes, 56 (91,8%) eram brancos e 5 (8,2%) eram não brancos (incluem-se nesse percentual negros, pardos e outras etnias).

Destes recém-nascidos, 34 (55,7%) eram procedentes da região metropolitana do estado do RS. Os demais eram procedentes de outras regiões do estado: 15 (24,6%) eram da região noroeste, 6 (9,8%) da região centro-oriental, 3 (4,9%) da região sudeste, 1 (1,6%) da região sudoeste, 1 (1,6%) da região nordeste e 1 (1,6%) da região centro-ocidental (Figura 1).

Em relação aos dados clínicos, o peso ao nascimento apresentou uma média e desvio padrão de  $2.973 \pm 587$  gramas, no entanto 11 (20%) recém-nascidos apresentaram baixo peso ao nascimento (peso  $< 2.500$  g). Os dados clínicos na primeira consulta e dados laboratoriais, com mediana e amplitude interquartil estão demonstrados na Tabela 1.

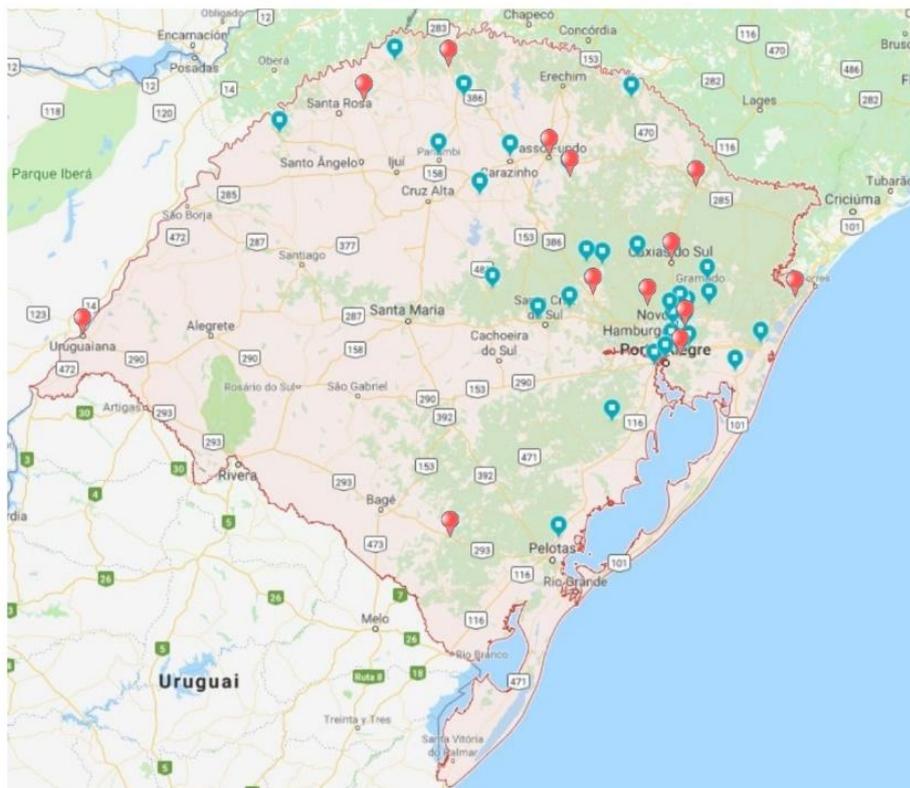
**Tabela 1** - Caracterização clínica e laboratorial de pacientes com fibrose cística, diagnosticados na rede SUS do estado do RS, entre 2012 à 2018.

Variável	Frequências
<b>Dados do nascimento</b>	
Peso ao nascer (g)- média ± DP	2.973 ± 587
Baixo peso ao nascer (< 2.500 g) - n (%)	11 (20)
<b>Dados na primeira consulta</b>	
Idade (dias) - mediana (P25 - P75)	35 (30 - 46)
Peso na consulta (g) - mediana (P25 - P75)	3.430 (2.897 - 4.197)
Ganho Ponderal (n=38)	
Não ganhou ou perdeu peso - n(%)	27 (71,1)
Ganho de peso adequado - n(%)	11 (28,9)
<b>Dados laboratoriais</b>	
TIR	
Primeira dosagem (ng/mL) - mediana (P25 - P75)	143 (92,9 - 177)
Idade do primeiro TIR (dias) - mediana (P25 - P75)	6 (4 - 6)
Segunda dosagem (ng/mL) - mediana (P25 - P75)	143 (115,8 - 199,3)
Idade do segundo TIR (dias)- mediana (P25 - P75)	14 (12,8 - 17,5)
Teste do suor (TS) - Primeira dosagem	
Normal - n(%)	3 (4,9)
Indeterminado - n(%)	9 (14,8)
Alterado - n(%)	49 (80,3)
Idade do primeiro TS (dias) - mediana (P25-P75)	34 (29-44,3)
Dosagens do TS	
Cloro 1 (mEq/L) - mediana (P25-P75)	101 (88,6-113,9)
Sódio 1(mEq/L) - mediana (P25-P75)	94,4 (70,7-109,5)
Massa 1 (mg) - mediana (P25-P75)	243,7 (167,9-280,6)
Cloro 2 (mEq/L)- mediana (P25-P75)	98,8 (84,8-117,4)
Sódio 2(mEq/L) - mediana (P25-P75)	94,8 (73,6-111)
Massa 2 (mg) - mediana (P25-P75)	256,5 (184,3-287,3)

DP = desvio padrão

Em relação à apresentação clínica na primeira consulta, apenas 6 (9,8%) recém-nascidos eram assintomáticos. Entre os 46 (75,4%) pacientes sintomáticos, 15 (24,6%) apresentaram íleo meconial ao nascimento. Suor salgado foi observado em 20 (32,8%) e esteatorreia foi relatado em 19 (31,1%) indivíduos. Entre as manifestações que envolvem o trato respiratório, foi observado tosse em 18 (29,5%), taquipneia em 7 (11,5%) e dificuldade respiratória foi relatado em 5 (8,2%) dos pacientes. Nove recém-nascidos (14,8%) não tinham informações sobre sintomatologia na evolução dos prontuários da primeira consulta.

Nos pacientes com histórico de íleo meconial (Tabela 2), observou-se valores menores na dosagem do primeiro TIR em comparação aos valores da primeira dosagem de TIR nos pacientes sem histórico de íleo meconial ( $p=0,003$ ), como demonstrado no Gráfico 1. Observou-se ainda, que a idade da segunda dosagem de TIR ocorre mais tardiamente nesses pacientes ( $p=0,008$ ), assim como a realização do teste suor ( $p=0,03$ ).



**Figura 1** - Distribuição geográfica de pacientes com fibrose cística diagnosticados pelo SRTN, entre os anos de 2012 e 2018, no estado do RS. Em azul, casos de FC sem histórico de íleo meconial e em vermelho, casos de FC com histórico de íleo meconial.

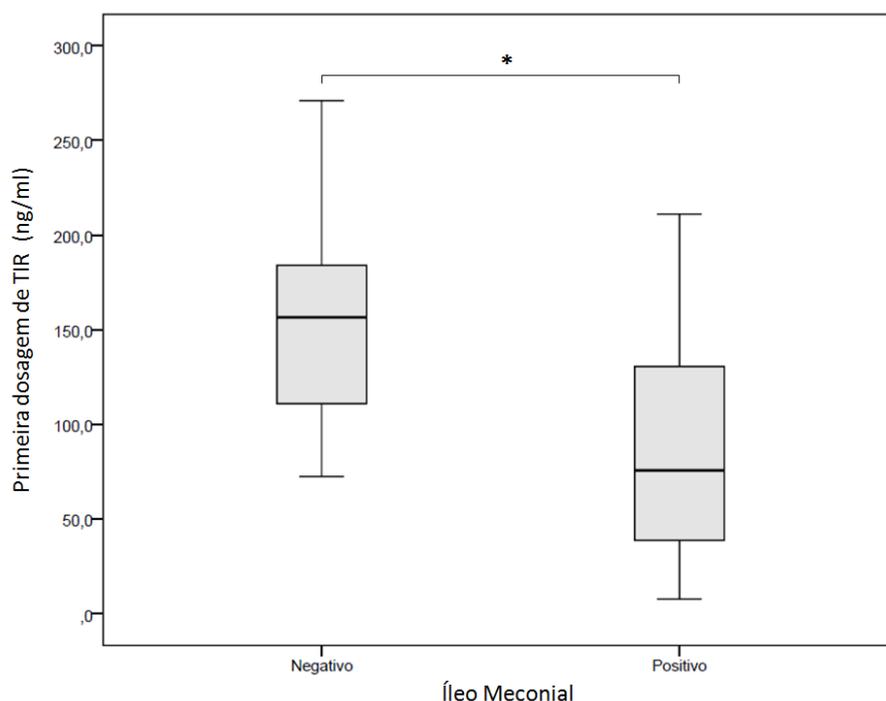
**Tabela 2** - Associação entre a presença ou ausência de íleo meconial e os diferentes dados clínicos dos recém-nascidos com FC no estado do RS.

Variáveis	n	Íleo Meconial	
		Presença	Ausência
Sexo - n(%)	49		
Masculino		4 (26,7)	16 (47,1)
Feminino		11 (73,3)	18 (52,9)
Etnia - n(%)	49		
Branca		15 (100)	31 (91,2)
Não branca		0 (0)	3 (8,8)
Peso ao nascer (g) - média ± DP	46	3.026 ± 797	2.959 ± 507
Baixo peso ao nascer (<2.500 g) - n(%)	9	2 (22,2)	7 (77,8)
Ganho ponderal (g/dia) - n(%)	35		
Não ganhou peso ou perdeu (<20 g/dia)		4 (80,0)	21 (70,0)
Ganhou peso adequado (>20 g/dia)		1 (20,0)	9 (30)
Idade na consulta (dias) - mediana (P25 - P75)	44	50 (32 - 101)	34 (10 - 39)
Sintomas - n(%)			
Suor Salgado	19	4 (21,1)	15 (78,9)
Tosse	15	1 (6,7)	14 (93,3)
Taquipneia	7	0 (0)	7 (100)
Dificuldade Respiratória	4	0 (0)	4 (100)
Esteatorreia	17	3 (17,6)	14 (82,4)
TIR	49		
Primeira dosagem (ng/mL) - mediana (P25 - P75)		75 (34 - 143)	156,5 (111 - 185) <sup>a</sup>
Idade do primeiro TIR (dias) - mediana (P25 - P75)		5 (5 - 8)	5 (4 - 5)
Segunda dosagem (ng/mL)- mediana (P25 - P75)		127 (93 - 306)	146 (117 - 175)
Idade do segundo TIR (dias)- mediana (P25 - P75)		19 (14 - 22)	13 (12 - 16) <sup>b</sup>
Teste do Suor	49		
Idade do Teste do Suor 1 (dias) - mediana (P25 - P75)		49,5 (32,5 - 101,25)	34 (29 - 39) <sup>c</sup>
Cloro 1 (mEq/L) - mediana (P25-P75)		109,6 (43,9 - 115,4)	98,4 (89,4 - 108,4)
Sódio 1(mEq/L) - mediana (P25-P75)		92,2 (50,4 - 106,7)	97,3 (72,6 - 109,7)
Massa 1 (mg) - mediana (P25-P75)		246,8 (176,5 - 303,5)	233,6 (173,9 - 286,5)
Cloro 2 (mEq/L)- mediana (P25-P75)		101,5 (87,7 - 120,5)	97,9 (84,1 - 113,5)
Sódio 2(mEq/L) - mediana (P25-P75)		87,5 (60,8 - 109,7)	95,6 (66,7 - 110,8)
Massa 2 (mg) - mediana (P25-P75)		253,8 (221,7 - 271,8)	263,6 (184,6 - 294,3)

n = número amostral

DP = desvio padrão

Teste qui-quadrado de Mann-Whitney: <sup>a</sup> p =0,003, <sup>b</sup> p =0,008, <sup>c</sup> p =0,03



**Gráfico 1** - Comparação entre os valores obtidos na primeira dosagem de TIR de pacientes que tiveram histórico de íleo meconial ao nascimento e os valores do TIR em recém-nascidos que não apresentaram íleo meconial.

\* Diferença estatisticamente significativa,  $p=0,003$ .

Foram observadas a presença de 8 diferentes mutações entre os pacientes com FC. Um paciente não possuía o resultado do teste genético no momento da coleta de dados, portanto para a análise genotípica, foram considerados 60 pacientes. O genótipo mais frequente foi homozigoto para a mutação p.Phe508del, observado em 31 (51,7%) dos pacientes. Os demais genótipos, assim como as frequências alélicas estão demonstradas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Frequência alélica e genotípica das mutações observadas nos recém-nascidos com fibrose cística, triados na rede pública, do estado do RS, no período de 2012 à 2018.

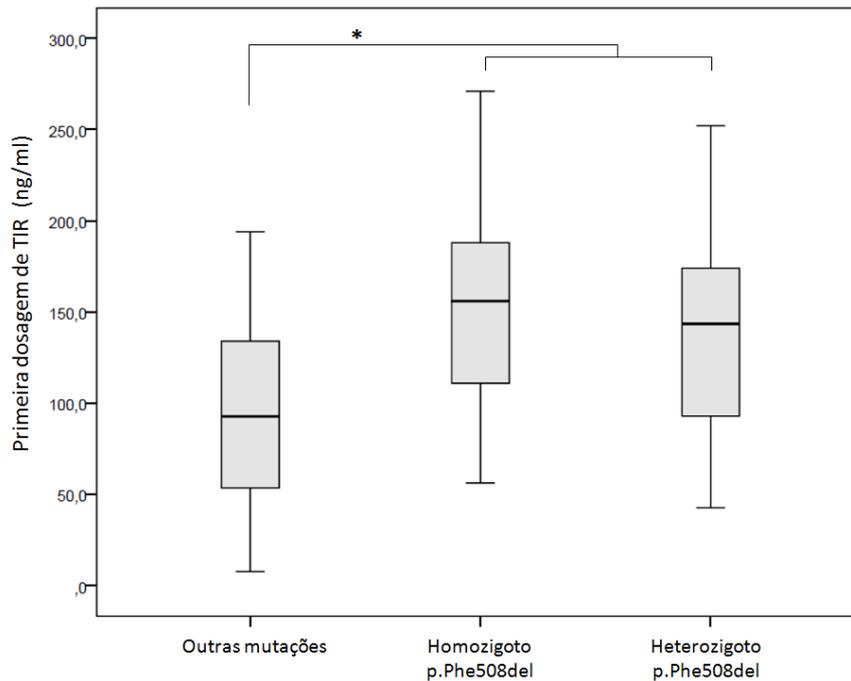
Mutações	Classes	Frequência	
		Alélica - n(%)	Genótipos
p.Phe508del	II	80 (66,7)	p.Phe508del / p.Phe508del 31 (51,7)
p.Gly542X	II	5 (4,2)	p.Phe508del / NI 13 (21,7)
c.2988+1G>A	I	4 (3,3)	p.Phe508del / c.2988+1G>A 2 (3,3)
p.Arg1162X	I	2 (1,7)	p.Phe508del / p.Gly542X 2 (3,3)
c.2657+5G>A	V	1 (0,8)	p.Phe508del / p.Gly85Glu 1 (1,7)
p.Gly85Glu	II	1 (0,8)	c.2657+5G>A / p.Arg1162X 1 (1,7)
c.1585-1G>A	I	1 (0,8)	c.2988+1G>A / NI 1 (1,7)
p.Arg334Trp	IV	1 (0,8)	c.2988+1G>A / p.Arg334Trp 1 (1,7)
Não identificado		25 (21)	p.Gly542X / p.Gly542X 1 (1,7)
			p.Gly542X / c.1585-1G>A 1 (1,7)
			p.Arg1162X / NI 1 (1,7)
			NI / NI 5 (8,3)
<b>Total</b>		<b>120 (100)</b>	<b>60 (100)</b>

NI= mutação não identificada até o momento

Entre pacientes homocigotos p.Phe508del, heterocigotos p.Phe508del e com outras mutações, não foi observada diferença estatisticamente significativa com relação ao sexo e à etnia. A média do peso de nascimento foi maior no grupo homocigoto do que nos demais, e os pacientes heterocigotos para mutação p.Phe508del apresentaram um número maior de neonatos com baixo peso ao nascimento. Entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas (Tabela 4).

A apresentação clínica dos recém-nascidos no momento da primeira consulta não mostrou diferença estatisticamente significante entre p.Phe508del homocigotos, heterocigotos e recém-nascidos com outras mutações.

Em relação aos parâmetros laboratoriais, recém-nascidos que possuem pelo menos um alelo com a mutação p.Phe508del (homocigotos ou heterocigotos) apresentaram os níveis da primeira dosagem de TIR significativamente maiores quando comparados aos recém-nascidos que possuíam outras mutações ( $p=0,043$ ), como demonstrado no Gráfico 2. As dosagens da segunda TIR não apresentaram diferença estatisticamente significativas entre os grupos.



**Gráfico 2** - Valores da primeira dosagem do tripsinogênio imunorreativo (TIR) de pacientes homozigotos e heterozigotos para a mutação p.Phe508del e pacientes com outras mutações.

\* Diferença estatisticamente significativa,  $p=0,043$ .

Quanto às dosagens de eletrólitos no suor, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos. As medianas e amplitudes interquartis das dosagens dos eletrólitos estão relacionadas na Tabela 4.

**Tabela 4** - Relação entre o fenótipo e o genótipo quanto à presença da mutação p.Phe508del (homozigose e heterozigose) e outras mutações em recém-nascidos com FC.

Número amostral Variáveis	p.Phe508del		Outras mutações
	n=31 Homozigoto	n=18 Heterozigoto	n=11
Sexo - n(%)			
Masculino	12 (38,7)	7 (38,9)	6 (54,5)
Feminino	19 (61,3)	11 (61,1)	5 (45,5)
Etnia - n(%)			
Branca	29 (93,5)	17 (94,4)	9 (81,8)
Não branca	2 (6,5)	1 (5,6)	2 (18,2)
Peso ao nascer (g) - média ± DP	3.020 ± 556	2.988 ± 595	2.788 ± 679
Baixo peso ao nascer (<2.500 g) - n(%)	5 (17,9)	4 (26,7)	2 (18,2)
Ganho ponderal (g/dia) - n(%)			
Não ganhou peso ou perdeu (<20 g/dia)	16 (80,0)	7 (58,3)	4 (66,7)
Ganhou peso adequado (>20 g/dia)	4 (20,0)	5 (41,7)	2 (33,3)
Apresentação clínica - n(%)			
Sintomático	22 (71,0)	14 (77,8)	9 (81,8)
Assintomático	3 (9,7)	3 (16,7)	0 (0)
Não informado	6 (19,4)	1 (5,6)	2 (18,2)
Sintomas - n(%)			
Íleo Meconial (n=14)	5 (16,1)	5 (27,8)	4 (36,4)
Suor Salgado (n=20)	9 (29,0)	6 (33,3)	5 (55,6)
Tosse (n=18)	10 (32,3)	5 (27,8)	3 (33,3)
Taquipneia (n=7)	3 (9,7)	2 (11,1)	2 (22,2)
Dificuldade Respiratória (n=5)	3 (9,7)	2 (11,1)	0 (0)
Esteatorreia (n=19)	11 (35,5)	5 (27,8)	3 (33,3)
TIR			
Primeira dosagem (ng/mL)- mediana (P25 - P75)	156 (111 - 192)	143,5 (89,6 - 177,5)	92,8 (34,9 - 157) <sup>a</sup>
Idade do primeiro TIR (dias)- mediana (P25 - P75)	6 (4 - 7)	5,5 (4 - 6)	4 (4 - 6)
Segunda dosagem - (ng/mL) mediana (P25 - P75)	145 (125,7 - 181,7)	164,5 (88,7 - 231,5)	116 (92,6 - 163,7)
Idade do segundo TIR (das) - mediana (P25 - P75)	14 (12- 17)	14 (13 - 19)	13 (12 - 17)
Teste do Suor			
Cloro 1 (mEq/L) - mediana (P25-P75)	101,6 (81,9 - 117,5)	102 (90,9 - 113,4)	99,5 (60,8 - 114,8)
Sódio 1(mEq/L) - mediana (P25-P75)	96,9 (71,9 - 119,3)	93 (84,6 - 100,5)	94,5 (62,1 - 109,9)
Massa 1 (mg) - mediana (P25-P75)	257,2 (193 - 287)	266 (144 - 305)	190,9 (162,4 - 252,0)
Cloro 2 (mEq/L)- mediana (P25-P75)	96,9 (84,5 - 116,76)	102,2 (86,9 - 118,6)	100,1 (57,2 - 114,1)
Sódio 2(mEq/L) - mediana (P25-P75)	96,4 (73,6 - 112,8)	96 (81,2 - 109,6)	77,8 (49,5 - 104,8)
Massa 2 (mg) - mediana (P25-P75)	254,9 (195,5 - 292,2)	256,5 (171 - 284)	261,7 (136,6 - 289,9)

DP = desvio padrão

Teste qui-quadrado de Kruskal-Wallis: <sup>a</sup> p=0,043

## Discussão

O diagnóstico de FC foi incluído durante a Fase III do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), visando a redução da morbimortalidade relacionada às patologias congênitas no Brasil (Ministério da Saúde, 2017). No RS, a triagem para FC é realizada pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Estado (SRTN/RS), a partir de um algoritmo que preconiza duas dosagens de TIR, dosagem dos eletrólitos no suor, avaliação clínica e teste genético (Rispoli *et al.*, 2018).

O TIR é uma proteína precursora da enzima pancreática tripsina, e encontra-se elevado em recém-nascidos com FC (Cabello *et al.*, 2003). Um dos fatores que pode gerar falso-negativo em pacientes fibrocísticos durante a triagem neonatal é a manifestação de íleo meconial, que se caracteriza pela falta da excreção do mecônio durante as primeiras 48h de vida. Essa manifestação está associada a episódios de obstrução intestinal, levando a necessidade de internações hospitalares (Oliveira *et al.*, 2002). O íleo meconial é uma manifestação precoce, que ocorre em cerca de 20% dos pacientes com FC (Del Ciampo *et al.*, 2015; Sathe e Houwen, 2017; Chang e Zabner, 2015). Entre os pacientes incluídos no estudo, 15 (24,6%) tiveram histórico de íleo meconial, uma frequência maior do que descrito em estudos anteriores no Brasil (Oliveira *et al.*, 2002; Filho *et al.*, 2016). Entre os pacientes com íleo meconial, 6 (9,84%) pacientes apresentaram valores de TIR abaixo do valor de referência de 70 ng/mL (Rispoli *et al.*, 2018; Therrell *et al.*, 2012), apresentando-se no momento da triagem como falso negativo.

A presença de íleo meconial é uma evidência suficiente para se determinar um diagnóstico presuntivo de FC, com ou sem uma triagem neonatal positiva (Farrell *et al.*, 2017). Isso ocorre porque o benefício das duas dosagens de TIR durante a triagem neonatal é menor em pacientes com íleo meconial, pois recém-nascidos fibrocísticos com essa complicação apresentam valores mais baixos de TIR (Del Ciampo *et al.*, 2015). Entre os pacientes diagnosticados no SRTN/RS que possuíam histórico de íleo meconial, os níveis de TIR foram significativamente mais baixos ( $p < 0,05$ ) do que naqueles pacientes sem essa complicação, demonstrado que de fato a presença de íleo meconial é um fator causador de resultados falso-negativos na triagem neonatal. É importante ressaltar que, até o momento da coleta dos dados, um recém-nascido não possuía dados clínicos ou genéticos, tendo somente histórico de íleo meconial e forte suspeita de FC. Em casos como esse, o paciente é encaminhado diretamente ao centro de referência para iniciar o tratamento enquanto aguarda a confirmação do diagnóstico (Mocelin *et al.*, 2017).

Além disso, pacientes com íleo meconial apresentaram a idade no momento da segunda dosagem de TIR e no momento da realização do teste do suor significativamente maior do que aqueles que não tiveram essa complicação. Essa diferença ocorre devido à necessidade de internações hospitalares, uma vez que em alguns casos é necessária correção cirúrgica (Efrati *et al.*, 2010).

Outro achado importante em relação à determinação dos níveis de TIR, é que essa dosagem foi significativamente maior em pacientes que possuem a mutação p.Phe508del em pelo menos um dos alelos do que naqueles pacientes que possuem outras mutações em ambos alelos (Gráfico 2). Isso ocorre pois acredita-se que a elevação dessa proteína esteja relacionada ao dano pancreático presente desde os primeiros momentos de vida do recém-nascido (Castellani *et al.*, 2016). Além disso, a p.Phe508del é uma mutação de classe II (Tabela 3), que resulta em alteração no tráfego da proteína até a superfície celular (De Boeck e Amaral, 2016), sendo considerada uma mutação grave. Quando presente em ambos alelos ou associada a outra mutação grave (classe I a III), resulta em maiores probabilidades de insuficiência pancreática (Ooi e

Durie, 2012). Essa característica pode elevar os níveis séricos de TIR, uma vez que pacientes fibrocísticos com essa mutação (homozigotos ou heterozigotos com outras mutações graves) produzem menos de 1% da proteína CFTR funcional, sendo quase todos insuficientes pancreáticos (Chang e Zabner, 2015).

Quanto ao peso no nascimento, 20% dos pacientes com FC do RS apresentaram baixo peso ao nascer (peso < 2.500g). Um estudo realizado na Dinamarca e no País de Gales mostrou que, respectivamente, 11,9% e 11% dos recém-nascidos com FC manifestaram essa característica no nascimento. Esse percentual é aproximadamente o dobro do percentual de baixo peso ao nascer em indivíduos não fibrocísticos (Schlüter *et al.*, 2018). Estes dados mostram que o peso no momento do nascimento é uma característica fenotípica importante, já que está associada à maior mortalidade e morbidade neonatal, e é considerado um fator de risco na sobrevivência do recém-nascido, impactando nos primeiros anos de vida (Tourinho e Reis, 2012).

Além disso, observamos que do momento do nascimento até o momento da primeira consulta, cerca de 70% dos recém-nascidos não obtiveram o ganho de peso adequado (20 g/dia) (Júnior *et al.*, 2007). Devido a uma limitação da coleta dessa informação em prontuários mais antigos, acredita-se que esse número possa ser maior, uma vez que só foi possível calcular o ganho ponderal para 38 dos 61 pacientes incluídos no estudo.

No nosso estudo, a esteatorreia (ou má absorção lipídica) foi relatada em 31% dos indivíduos e pode ser uma das causas do baixo ganho ponderal entre os pacientes fibrocísticos. Em um estudo com 39 crianças com FC, a má absorção lipídica foi observada em 59% dos indivíduos no momento da primeira consulta (Bronstein *et al.*, 1992). Dados do REBRAFC mostram que esteatorreia foi observada em 34% dos pacientes com FC do Brasil (Filho *et al.*, 2016). Essa manifestação clínica é um sintoma significativo de FC e está associada à insuficiência pancreática, que gera uma digestão e absorção lipídica defeituosa, afetando o desenvolvimento e crescimento do recém-nascido (Jarosław *et al.*, 2008; Sontag *et al.* 2006).

Entre as manifestações pulmonares observadas, a tosse foi o fenótipo mais frequente presente em 28,5% dos recém-nascidos. Essa frequência foi similar a encontrada em um estudo que avaliou a evolução da função pulmonar durante o primeiro ano de vida em recém-nascidos, no qual 21% dos indivíduos apresentaram tosse como uma manifestação clínica de FC entre a terceira semana de vida e um ano de idade (Nguyen *et al.*, 2014). A obstrução do fluxo aéreo é uma manifestação precoce e se apresenta mesmo na ausência de outros sintomas respiratórios, podendo ser um achado precoce de exacerbações pulmonares (Nguyen *et al.*, 2014; Athanazio *et al.*, 2017).

A mediana da idade da primeira consulta foi 35 dias, idade inferior a mediana encontrada no Brasil, de 57 dias (Ministério da Saúde, 2017). No entanto, no momento da primeira consulta, 31 (50,8%) pacientes apresentavam sintomas e apenas 6 (9,8%) recém-nascidos tiveram uma apresentação clínica completamente assintomática, tendo como único indício de FC os níveis de TIR elevados na triagem neonatal. Apesar dos dados mostrarem que no RS a primeira consulta ocorre mais cedo do que a mediana do país, muitos pacientes desenvolvem os sintomas entre o nascimento e o momento da primeira consulta. Indivíduos que tem seu diagnóstico baseado nos sintomas apresentam o dobro de complicações até o momento do diagnóstico do que aqueles indivíduos detectados em risco de FC durante a triagem neonatal, o que permite um prognóstico melhor a partir da instituição precoce da terapêutica (Mocelin *et al.*, 2017). Isso ressalta a importância da convocação desses pacientes para uma consulta mais previamente,

uma vez que o objetivo da triagem neonatal é permitir o diagnóstico antes da manifestação sintomática da doença.

Em relação à análise molecular, foi observado uma alta frequência da mutação p.Phe508del, presente em 66,7% dos alelos nas regiões norte, nordeste e leste do RS (Figura 1). Essa prevalência é mais elevada que no restante do país, segundo dados do REBRAFC, em que a frequência alélica da mutação p.Phe508del foi de 45,97% no Brasil (Filho *et al.*, 2016). Quando analisada a prevalência alélica dessa mutação entre regiões do Brasil, observa-se uma frequência maior no sul (49,7%) do que no norte (33%) (Filho *et al.*, 2016). Essa maior prevalência da mutação p.Phe508del no sul do Brasil pode ser explicada pela composição étnica Europeia do estado, uma vez que essa mutação apresenta frequência alélica de 61,73% na Europa (Orenti *et al.*, 2016).

Essa frequência mais elevada também se reflete no genótipo, uma vez que, segundo o REBRAFC de 2016 a frequência de homocigotos e de heterocigotos para a mutação p.Phe508del é, respectivamente, 25,1% e 25,3% no Brasil. Em nosso estudo, observamos 51% dos pacientes homocigotos para p.Phe508del e 20% heterocigotos com outras mutações. Esses dados demonstram que a alta frequência alélica da mutação pode ser fruto do efeito fundador da colonização do estado, uma vez que essa mutação é muito prevalente em homocigose no RS.

Embora nosso estudo tenha possibilitado uma análise entre dados genéticos e a apresentação clínica do recém-nascido fibrocístico, o número limitado de pacientes dificulta correlações entre genótipo e fenótipo. Além disso, a interpretação dessa relação ainda é um desafio, pois a análise genética isolada não é suficiente para prever a gravidade da doença. Isso ocorre pois a grande heterogeneidade fenotípica existente entre pacientes com as mesmas mutações pode ser consequência de modificadores da CFTR, que incluem genes modificadores e influências ambientais que podem alterar a função da proteína e impactar no fenótipo do indivíduo (Chang e Zabner, 2015). Um levantamento de dados multicêntrico, possibilitaria um número maior de recém-nascidos triados, permitindo assim uma conclusão do efeito do genótipo sobre o início e a evolução das manifestações clínicas do indivíduo com FC.

## Referência

- Athanzio, Rodrigo Abensur, Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho, Alberto Andrade Vergara, Antônio Fernando Ribeiro, Carlos Antônio Riedi, Elenara da Fonseca Andrade Procianoy, Fabíola Villac Adde, et al. 2017. “Brazilian Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Cystic Fibrosis.” *Jornal Brasileiro de Pneumologia: Publicacao Oficial Da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia* 43 (3): 219–45. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562017000000065>.
- Boeck, Kris De, and Margarida D Amaral. 2016. “Progress in Therapies for Cystic Fibrosis.” *The Lancet. Respiratory Medicine* 4 (8): 662–74. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00023-0).
- Brennan, Marie-Luise, and Iris Schrijver. 2016. “Cystic Fibrosis: A Review of Associated Phenotypes, Use of Molecular Diagnostic Approaches, Genetic Characteristics, Progress, and Dilemmas.” *The Journal of Molecular Diagnostics* 18 (1): 3–14. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2015.06.010>.
- Bronstein, M N, R J Sokol, S H Abman, B A Chatfield, K B Hammond, K M Hambidge, C D Stall, and F J Accurso. 1992. “Pancreatic Insufficiency, Growth, and Nutrition in Infants Identified by Newborn Screening as Having Cystic Fibrosis.” *The Journal of Pediatrics* 120 (4 Pt 1): 533–40. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)82478-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)82478-3).
- Cabello, Giselda M.K., Pedro H. Cabello, Silvia R.S. Roig, Armando Fonseca, Eulália C.D. Carvalho, and Octavio Fernandes. 2003. “Rastreamento Da Fibrose Cística Usando-Se a Análise Combinada Do Teste de IRT Neonatal e o Estudo Molecular Da Mutação DeltaF508.” *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 39 (1): 15–20. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442003000100004>.
- Castellani, Carlo, John Massie, Marci Sontag, and Kevin W Southern. 2016. “Newborn Screening for Cystic Fibrosis.” *The Lancet. Respiratory Medicine* 4 (8): 653–61. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00053-9).
- Chang, Eugene H., and Joseph Zabner. 2015. “Precision Genomic Medicine in Cystic Fibrosis.” *Clinical and Translational Science* 8 (5): 606–10. <https://doi.org/10.1111/cts.12292>.
- Ciampo, Ieda Regina Lopes Del, Tainara Queiroz Oliveira, Luiz Antonio Del Ciampo, Regina Sawamura, Lidia Alice Gomes Monteiro Marin Torres, Albin Eugenio Augustin, Maria Inez Machado Fernandes, et al. 2015. “Manifestações Precoces Da Fibrose Cística Em Paciente Prematuro Com Íleo Meconial Complexo Ao Nascimento.” *Revista Paulista de Pediatria* 33 (2): 241–45. <https://doi.org/10.1016/j.rpped.2014.12.004>.
- Cutting, Garry, Carlo Castellani, J. Michael Collaco, Mary Corey, Michelle Huckaby Lewis, Chris Penland, Karen Siklosi Raraigh, Johanna Rommens, and Anne Stephenson. 2011. “CFTR2.” 2011. [https://www.cftr2.org/about\\_cftr](https://www.cftr2.org/about_cftr).
- Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto. 2011. “Cystic Fibrosis Mutation Database.” 2011. <http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html>.
- Derichs, Nico, Byung-Ju Jin, Yuanlin Song, Walter E. Finkbeiner, and A. S. Verkman. 2011. “Hyperviscous Airway Periciliary and Mucous Liquid Layers in Cystic Fibrosis Measured by Confocal Fluorescence Photobleaching.” *The FASEB Journal* 25 (7): 2325–32. <https://doi.org/10.1096/fj.10-179549>.
- Efrati, Ori, Judith Nir, Drora Fraser, Malena Cohen-Cymerknoh, David Shoseyov, Daphna Vilozni, Dalit Modan-Moses, et al. 2010. “Meconium Ileus in Patients With Cystic Fibrosis Is Not a Risk Factor for Clinical Deterioration and Survival: The Israeli Multicenter Study.” *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 50 (2): 173–78. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a3bfdd>.

- Farrell, Philip M., Terry B. White, Clement L. Ren, Sarah E. Hempstead, Frank Accurso, Nico Derichs, Michelle Howenstine, et al. 2017. "Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation." *The Journal of Pediatrics* 181 (February): S4–S15.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.09.064>.
- Filho, Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva, Francisco José Caldeira Reis, Paulo José Cauduro Maróstica, Rodrigo Abensur Athanazio, Neiva Damaceno, Adilson Yuuji Hira, and Angela Tavares Paes. 2016. "Registro Brasileiro de Fibrose Cística 2016." São Paulo. [www.gbefc.org.br](http://www.gbefc.org.br).
- Gibson, Lewis E., and Robert E. Cooke. 1959. "A TEST FOR CONCENTRATION OF ELECTROLYTES IN SWEAT IN CYSTIC FIBROSIS OF THE PANCREAS UTILIZING PILOCARPINE BY IONTOPHORESIS." *Pediatrics* 23 (3). [http://pediatrics.aappublications.org/content/23/3/545.long?sso=1&sso\\_redirect\\_count=1&nfstatus=401&nftoken=00000000-0000-0000-0000-000000000000&nfstatusdescription=ERROR%3A+No+local+token](http://pediatrics.aappublications.org/content/23/3/545.long?sso=1&sso_redirect_count=1&nfstatus=401&nftoken=00000000-0000-0000-0000-000000000000&nfstatusdescription=ERROR%3A+No+local+token).
- Gillen, Austin E, and Ann Harris. 2012. "Transcriptional Regulation of CFTR Gene Expression." *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 4 (January): 587–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201896>.
- Jarosław Walkowiak, Aleksandra Lisowska, Michal Blaszczyński. 2008. "The Changing Face of the Exocrine Pancreas in Cystic Fibrosis: Pancreatic Sufficiency, Pancreatitis and Genotype." *European Journal of Gastroenterology &* 20 (3): 157–60. <https://doi.org/10.1097/meg.0b013e3282f36d16>.
- Jennings, Mark T., and Patrick A. Flume. 2018. "Cystic Fibrosis: Translating Molecular Mechanisms into Effective Therapies." *Annals of the American Thoracic Society* 15 (8): 897–902. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201802-075FR>.
- Júnior, Dioclécio Campos and Lopez, Fabio Ancona. 2007. *Filhos - Da Gravidez Aos 2 Anos de Idade - SBP*. Edited by Manole. <http://www.sbp.com.br/publicacoes/publicacao/pid/filhos-da-gravidez-aos-2-anos-de-idade/>.
- Klimova, Blanka, Kamil Kuca, Michal Novotny, and Petra Maresova. 2017. "Cystic Fibrosis Revisited – a Review Study." *Medicinal Chemistry* 13 (2): 102–9. <https://doi.org/10.2174/1573406412666160608113235>.
- Lisle, Robert C De, and Drucy Borowitz. 2013. "The Cystic Fibrosis Intestine." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (9): a009753. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009753>.
- MacDonald, Kelvin D, Karen R McKenzie, and Pamela L Zeitlin. 2007. "Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Protein Mutations: 'class' Opportunity for Novel Drug Innovation." *Paediatric Drugs* 9 (1): 1–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17291132>.
- Marson, Fernando Augusto de Lima, Carmen Silvia Bertuzzo, Maria Ângela Gonçalves de Oliveira Ribeiro, Antônio Fernando Ribeiro, and José Dirceu Ribeiro. 2013. "Screening for F508del as a First Step in the Molecular Diagnosis of Cystic Fibrosis." *Jornal Brasileiro de Pneumologia: Publicacao Oficial Da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia* 39 (3): 306–16. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132013000300007>.
- Ministério da Saúde. 2017. "Indicadores Da Triagem Neonatal No Brasil." 2017. <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-da-triagem-neonatal/indicadores-da-triagem-neonatal-no-brasil>.
- Mishra, Avantika, Ronda Greaves, and John Massie. 2005. "The Relevance of Sweat Testing for the Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Genomic Era." *The Clinical*

- Biochemist.*                      *Reviews*                      26                      (4):                      135–53.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648884>.
- Mocelin, H, GB Fischer, SM Castro, T Grandi, M Chapper, T Rispoli, and PB Sanseverino. 2017. “Triagem Neonatal Para Fibrose Cística No SUS No Rio Grande Do Sul.” [http://www.sprs.com.br/sprs2013/bancoimg/170615164232bcped\\_06\\_01\\_a02.pdf](http://www.sprs.com.br/sprs2013/bancoimg/170615164232bcped_06_01_a02.pdf).
- Nguyen, The Thanh-Diem, Lena P Thia, Ah-Fong Hoo, Andrew Bush, Paul Aurora, Angie Wade, Jane Chudleigh, Sooky Lum, Janet Stocks, and London Cystic Fibrosis Collaboration (LCFC). 2014. “Evolution of Lung Function during the First Year of Life in Newborn Screened Cystic Fibrosis Infants.” *Thorax* 69 (10): 910–17. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-204023>.
- Oliveira, M C L A, F J C Reis, A P A F Monteiro, and F J Penna. 2002. “Effect of Meconium Ileus on the Clinical Prognosis of Patients with Cystic Fibrosis.” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas* 35 (1): 31–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743612>.
- Ooi, Chee Y, and Peter R Durie. 2012. “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene Mutations in Pancreatitis.” *Journal of Cystic Fibrosis : Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 11 (5): 355–62. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.05.001>.
- Orenti A, Zolin A, Naehrlich L, van Rens J et al. 2016. “ECFS Patient Registry - Annual Data Report - 2016 Data.” [www.ecfs.eu/ecfspr](http://www.ecfs.eu/ecfspr).
- Rispoli, Thaiane, Simone Martins de Castro, Tarciana Grandi, Mayara Prado, Letícia Filippin, Cláudia Maria Dornelles da Silva, José Eduardo Vargas, and Lucia Maria Rosa Rossetti. 2018. “A Low-Cost and Simple Genetic Screening for Cystic Fibrosis Provided by the Brazilian Public Health System.” *The Journal of Pediatrics* 199 (August): 272–277.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.03.047>.
- Sathe, Meghana, and Roderick Houwen. 2017. “Meconium Ileus in Cystic Fibrosis.” *Journal of Cystic Fibrosis : Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 16 Suppl 2 (November): S32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.06.007>.
- Schlüter, Daniela K, Rowena Griffiths, Abdulfatah Adam, Ashley Akbari, Martin L Heaven, Shantini Paranjothy, Anne-Marie Nybo Andersen, et al. 2018. “Impact of Cystic Fibrosis on Birthweight: A Population Based Study of Children in Denmark and Wales.” *Thorax*, July, [thoraxjnl-2018-211706](https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-211706). <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-211706>.
- Sontag, Marci K, Mary Corey, John E Hokanson, Julie A Marshall, Steve S Sommer, Gary O Zerbe, and Frank J Accurso. 2006. “Genetic and Physiologic Correlates of Longitudinal Immunoreactive Trypsinogen Decline in Infants with Cystic Fibrosis Identified through Newborn Screening.” *The Journal of Pediatrics* 149 (5): 650–57. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.07.026>.
- Struyvenberg, Maarten R, Camilia R Martin, and Steven D Freedman. 2017. “Practical Guide to Exocrine Pancreatic Insufficiency - Breaking the Myths.” *BMC Medicine* 15 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0783-y>.
- Therrell, Bradford L., W. Harry Hannon, Gary Hoffman, Jelili Ojodu, and Philip M. Farrell. 2012. “Immunoreactive Trypsinogen (IRT) as a Biomarker for Cystic Fibrosis: Challenges in Newborn Dried Blood Spot Screening.” *Molecular Genetics and Metabolism* 106 (1): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.02.013>.
- Tourinho, Amanda Braga, and Lilian Barros de Souza Moreira Reis. 2012. “Peso Ao Nascer: Uma Abordagem Nutricional.” *Com. Ciências Saúde* 23 (1): 19–30.

- [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/revista\\_ESCS\\_v23\\_n1\\_a02\\_peso\\_ao\\_nascer.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/revista_ESCS_v23_n1_a02_peso_ao_nascer.pdf).
- VanDevanter, Donald R., Jennifer S. Kahle, Amy K. O’Sullivan, Slaven Sikirica, and Paul S. Hodgkins. 2016. “Cystic Fibrosis in Young Children: A Review of Disease Manifestation, Progression, and Response to Early Treatment.” *Journal of Cystic Fibrosis* 15 (2): 147–57. <https://doi.org/10.1016/J.JCF.2015.09.008>.
- Vázquez Mora, Yordany, Rolando Dornes Ramón, and Niurka Abreu Figueredo. 2013. “Imagenologic Diagnosis of the Meconial Ileus.” *Mediciego* 19 (S1). <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=43286>.
- Walkowiak, J., K.-H. Herzig, M. Witt, A. Pogorzelski, R. Piotrowski, E. Barra, A. Sobczynska-Tomaszewska, et al. 2001. “Analysis of Exocrine Pancreatic Function in Cystic Fibrosis: One Mild CFTR Mutation Does Not Exclude Pancreatic Insufficiency.” *European Journal of Clinical Investigation* 31 (9): 796–801. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2001.00876.x>.
- Wark, Peter, and Vanessa M McDonald. 2018. “Nebulised Hypertonic Saline for Cystic Fibrosis.” *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 9 (September). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001506.pub4>.
- Yu, Elaine, and Sandeep Sharma. 2018. *Cystic Fibrosis*. StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29630258>.

### **Original Research Article**

Original Research Articles describe the hypothesis, study, and methods of original research. The results of the research is reported, interpreted and may include a discussion of possible implications. Original Research Articles have a maximum word count of 12,000, are peer-reviewed, copy-edited, receive a DOI, are citable, published in PDF and HTML format, and submitted for indexing in digital archives, such as PubMed Central. Authors are required to pay a fee to publish an Original Research Article. The most outstanding Original Research Articles, selected democratically via the Frontiers Evaluation System, will be invited to write a prestigious Focused Review in the corresponding field journal.

- Abstract max. length: 2,000 characters
- Running title (5 words)
- Figures and tables: 15
- Manuscript max. length: 12,000 words

### **Manuscript**

#### **Language Style**

Authors are requested to follow American English spelling. For any questions regarding style Frontiers recommends authors to consult the Chicago Manual of Style.

#### **Title**

The title is centered, and in 16 point bold Times New Roman font at the top of page. Except for special names (e.g., GABAergic), capitalize only the first letter of the title.

#### **Authors and Affiliations**

All names are listed together and separated by commas. Ensure to provide exact and correct author names as these will be indexed in official archives. Any later changes may be difficult. Affiliations should be keyed to the author's name with superscript numbers. Affiliations should be listed as follows: Laboratory, Institute, Department, Organization, City, State abbreviation (USA, Canada, Australia), and Country (without detailed address information such as city zip codes or street names).

*Example:* Max Maximus, Department of Excellence, International University of Science, New York, NY, USA.

The Corresponding Author should be marked with an asterisk. Please provide in a separate paragraph the exact contact address (this time including street name and city zip code) and email of the corresponding author. Please see the following example.

Correspondence:

Dr. Max Maximus

International Institute of Neuroscience

Department of Physiology

Laboratory of Sensory Integration

Cajal Street 2460,

New York, NY, 59066, USA  
[maximus@gmail.com](mailto:maximus@gmail.com)

If one of the authors has a change of address, list the new address below the correspondence details using a superscript symbol †, and use the same symbol to indicate the author in the author list.

### **Running**

Title For article types requiring it, the running title should be a maximum of 5 words in length.

### **Abstract**

As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. References should not be cited in the abstract. The text of the abstract section should be in 12 point normal Times New Roman. See section 5 table for abstract length and requirement.

### **Keywords**

All article types: you may provide up to 8 keywords; at least one is mandatory.

### **Text**

The body text is in 12 point normal Times New Roman. New paragraphs will be separated with a single empty line. The entire document should be single-spaced and should contain line numbers in order to facilitate the review process. Your manuscript should be written using either LaTeX or MS-Word.

### **Sections**

Your manuscript is organized by headings and subheadings.

For Original Research Articles, Clinical Trial Articles and Technology Reports, the following sections are mandatory. Please note that the Material and Methods section can be placed in any of the following ways: before Results, before Discussion or after Discussion:

1. Introduction Succinct, with no subheadings.
2. Materials and Methods This section may be divided by subheadings. The section should contain sufficient details so that when read in conjunction with cited references, all procedures can be repeated.
3. Results This section may be divided by subheadings. Footnotes should not be used and have to be transferred into the main text.
4. Discussion This section may be divided by subheadings. Discussions should cover the key findings of the study: discuss any prior art related to the subject so to place the novelty of the discovery in the appropriate context; discuss the potential shortcomings and limitations on their interpretations; discuss their integration into the current understanding of the problem and how this advances the current views; speculate on the future direction of the research and freely postulate theories that could be tested in the future.

### **References**

All citations in the text, figures or tables must be in the reference list and vice-versa. Please make sure that the references are accurate and that ALL authors are listed in the reference list. Citations should be called according to the last name of the first author,

followed by the year.

The references should only include articles that are published or in press. Unpublished data, submitted manuscripts, or personal communications should be cited within the text only. Personal communications should be documented by a letter of permission.

For general questions regarding reference style, please refer to the Chicago Manual of Style.

### ***Figures and Tables***

#### **General Style Guidelines for Images and Figures**

Check that each table and figure is mentioned in the text and in numerical order. Make sure that permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the web). Please note that it is obligatory to follow figure instructions. Figures provided, which are not according to the guidelines will cause substantial delay during the production process. The numbers of figures and tables allowed are shown in the summary table in section 5. High-resolution images must be submitted separately in the formats described below.

#### **Figure and Table Legends**

Figure and table legends are the same as body text (12 point normal Times New Roman, single spaced). Legends should be preceded by a label, for example "Figure 1." or "Table 4.". Figure legends should be placed at the end of the manuscript. Please use only a single paragraph for the legend. Figure panels are referred to by bold capital letters in brackets: (A), (B), (C), (D), etc.

#### **General style guidelines for Tables**

Tables should be insert into the manuscript. If you use a word processor, build your table in word. If you use a LaTeX processor, build your table in LaTeX. Na empty line should be left before and after table.