

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS**

**VINÍCIUS BUAES DAL'MASO**

**CONTRIBUIÇÃO DA ANÁLISE MOLECULAR DO GENE CFTR NA  
INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA DE PACIENTES COM SUSPEITA DE  
FIBROSE CÍSTICA LEVE OU DOENÇA ATÍPICA**

Porto Alegre

2012

VINÍCIUS BUAES DAL'MASO

**CONTRIBUIÇÃO DA ANÁLISE MOLECULAR DO GENE CFTR NA  
INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA DE PACIENTES COM SUSPEITA DE  
FIBROSE CÍSTICA LEVE OU DOENÇA ATÍPICA**

Dissertação entregue como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Pneumológicas, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*Orientador:* Prof. Dr. Paulo de Tarso Roth Dalcin

Porto Alegre  
2012

## CIP - Catalogação na Publicação

Dal Maso, Vinícius Buaes  
Contribuição da análise molecular do gene CFTR na  
investigação diagnóstica de pacientes com suspeita de  
fibrose cística leve ou doença atípica. / Vinícius Buaes  
Dal Maso. -- 2012.  
70 f.

Orientador: Paulo de Tarso Roth Dalcin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Fibrose Cística. 2. Fenótipo. 3. Genótipo. I.  
Dalcin, Paulo de Tarso Roth, orient. II. Título.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pacientes com fibrose cística e seus familiares.

## AGRADECIMENTOS

À minha esposa, Pâmela, pela paciência, apoio e compreensão.

Aos meus pais Dante e Margareth e irmão César pelo incentivo e confiança.

Ao Dr Paulo Dalcin pela valiosa orientação, paciência e também pela fundamental contribuição em minha formação médica.

À Dra Maria Luiza Saraiva-Pereira e seus colaboradores do Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela dedicação e apoio ao trabalho.

Ao Dr Lucas Mallmann pelo apoio e colaboração na coleta de dados.

A todos os colegas e equipe do ambulatório de fibrose cística do HCPA que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Aos coordenadores e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da UFRGS pelos ensinamentos e auxílio.

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA e as empresas privadas Roche e United Medical pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A fibrose cística (FC) é diagnosticada na presença de achados fenotípicos, história familiar ou triagem neonatal positiva acompanhada de evidência laboratorial de disfunção da CFTR, seja pelo teste do suor, diferença de potencial nasal ou pela identificação de duas mutações conhecidas como causa de FC nos genes da CFTR.

**Objetivos:** Avaliar a contribuição da análise molecular do gene CFTR na investigação diagnóstica da fibrose cística em pacientes com suspeita de FC leve ou doença atípica. Secundariamente, comparar as características dos pacientes em 3 grupos: grupo com identificação de duas mutações conhecidas como causadoras da FC, grupo com identificação de apenas uma mutação e grupo sem mutação identificada. **Métodos:** Estudo transversal em adolescentes e adultos ( $\geq 14$  anos). Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica, laboratorial e radiológica; espirometria, microbiologia do escarro, ecografia hepática, teste do suor e análise molecular do gene CFTR. **Resultados:** Foram avaliados 37 pacientes com achados fenotípicos de FC, com ou sem confirmação pelo teste do suor. Houve predomínio do sexo feminino (75,7%) com média de idade de  $32,5 \pm 13,6$  anos. A análise molecular contribuiu para o diagnóstico definitivo de FC em 3 casos (8,1%) dentre 37 pacientes em avaliação. Em 7 pacientes (18,9%) foram identificadas apenas uma mutação causadora de FC e em 26 pacientes (70,3%) não foram identificadas mutações. Nenhuma característica clínica estudada se associou com o diagnóstico genético. A mutação p.F508del foi a mais comum, encontrada em 5 pacientes. A associação de p.V232D e p.F508del foi encontrada em 2 pacientes. Outras mutações encontradas foram: p.A559T, p.D1152H, p.T1057A, p.I148T, p.V754M, p.P1290P e p.R1066H e p.T351S. **Conclusão:** A análise molecular da região codificante do gene CFTR apresentou contribuição limitada para investigação diagnóstica de pacientes com suspeita de fibrose cística leve ou doença atípica. Além disso, não houve associação entre as características clínicas e o diagnóstico genético.

**Palavras-chaves:** fibrose cística, proteína reguladora da condutância transmembrana da fibrose cística, fenótipo, genótipo, diagnóstico.

## ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is diagnosed in the presence of phenotypic findings, family history or positive neonatal screening accompanied by laboratory evidence of CFTR dysfunction, either by sweat test, nasal potential difference or the identification of two mutations known to cause CF in the CFTR gene. **Objectives:** To evaluate the contribution of molecular analysis of CFTR gene in cystic fibrosis diagnostic investigation in patients with suspected mild FC or atypical disease. Secondly, to compare the characteristics of patients into 3 groups: group with identification of two mutations known to cause CF, group with identification of just one mutation and group without mutations. **Methods:** Cross-sectional study in adolescent and adult ( $\geq 14$  years). The patient underwent clinical, laboratory and radiological spirometry, sputum microbiology, liver ultrasound, sweat test and molecular analysis of the CFTR gene. **Results:** We evaluated 37 patients with phenotypic findings of FC, with or without confirmation by the sweat test. There was a predominance of females (75.7%) with a mean age of  $32.5 \pm 13.6$  years. Molecular analysis contributed to the definitive diagnosis of CF in 3 cases (8.1%) among 37 patients under evaluation. In 7 patients (18.9%) were identified only one mutation that causes CF and in 26 patients (70.3%) were not identified mutations. No clinical feature studied was associated with genetic diagnosis. The P.F508del mutation was the most common, found in 5 patients. The association p.V232D and p.F508del was found in 2 patients. Other mutations found were: p.A559T, p.D1152H, p.T1057A, p.I148T, p.V754M, and p.P1290P p.R1066H and p.T351S. **Conclusion:** Molecular analysis of the CFTR gene coding region showed limited contribution to the diagnostic investigation of patients with suspected cystic fibrosis mild or atypical disease. Moreover, there was no association between clinical features and genetic diagnosis.

**Keywords:** cystic fibrosis, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, phenotype, genotype, diagnosis

**LISTA DE ABREVIACES**

FC – Fibrose Cística

CFTR - Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

IMC – Indice de Massa Corporal

DMRFC - Diabetes relacionada à fibrose cística

VEF1 – Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo

CVF – Capacidade Vital Forçada

VEF1/CVF – ndice de *Tiffenau*

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Características gerais dos pacientes com suspeita de FC leve ou atípica .....	35
<b>Tabela 2</b> – Comparação das características entre os indivíduos com duas mutações identificadas, com uma mutação e sem mutação identificada. ....	36
<b>Tabela 3</b> – Mutações identificadas.....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 FIBROSE CÍSTICA .....	1
<b>1.1.1 Descrição</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.2 Histórico</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.3 Epidemiologia</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.4 Fisiopatologia</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.5 Manifestações Clínicas</b> .....	<b>5</b>
1.1.5.1 Sinusopulmonar .....	5
1.1.5.2 Gastrointestinais e Nutricionais .....	6
1.1.5.3 Distúrbios Endócrinos e Aspectos Reprodutivos .....	8
<b>1.1.6 Diagnóstico</b> .....	<b>9</b>
1.1.6.1 Teste do suor .....	10
1.1.6.2 Diferença de Potencial Nasal (DPN) .....	10
1.1.6.3 Análise Molecular .....	11
<b>1.1.7 Terminologia</b> .....	<b>12</b>
1.1.7.1 Fibrose Cística Clássica ou Típica .....	13
1.1.7.2 Fibrose Cística Não Clássica ou Atípica .....	13
<b>1.1.8 Prognóstico</b> .....	<b>14</b>
1.2 PROGRAMA DE ADULTOS .....	14
<b>2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO</b> .....	<b>16</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
3.1 PRINCIPAL .....	17
3.2 SECUNDÁRIO .....	17
<b>4 PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1 DELINEAMENTO .....	18
4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	18
<b>4.2.1 População</b> .....	<b>18</b>
<b>4.2.2 Critérios de Inclusão</b> .....	<b>18</b>
<b>4.2.3 Critérios de Exclusão</b> .....	<b>19</b>

4.3 MEDIDAS E INSTRUMENTOS .....	19
<b>4.3.1 Avaliações</b> .....	<b>19</b>
4.3.1.1 Avaliação Clínica.....	19
4.3.1.2 Avaliação da Função Pulmonar.....	20
4.3.1.3 Escore Clínico .....	20
4.3.1.4 Escore Hepático .....	21
4.3.1.5 Análise Microbiológica.....	22
4.3.1.6 Análise Molecular .....	23
<b>5 ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>24</b>
<b>6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>25</b>
<b>7 ARTIGO .....</b>	<b>26</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
8.1 PRINCIPAL .....	46
8.2 SECUNDÁRIA.....	46
<b>9 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>56</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FIBROSE CÍSTICA

### 1.1.1 Descrição

Fibrose cística (FC) é uma doença genética, multissistêmica, autossômica recessiva causada por mutações em um gene localizado no braço longo do cromossomo 7, responsável pela codificação da proteína reguladora da condutância transmembrana da FC (do inglês *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* – CFTR).<sup>1,2</sup> Essa proteína se localiza na membrana apical das células epiteliais com a função de regular e participar do transporte de eletrólitos, através das membranas celulares.<sup>3</sup>

Trata-se de uma doença genética, mais comum na população caucasiana. Após a sua descrição em 1938, a doença tinha um prognóstico quase que uniformemente fatal no primeiro ano de vida. Porém, a média de sobrevida aumentou dramaticamente nas últimas quatro décadas.<sup>2</sup>

Os achados clínicos incluem principalmente doença sinusopulmonar crônica, colonização ou infecção respiratória crônica com patógenos típicos, anormalidades gastrointestinais, nutricionais e concentração elevada de eletrólitos no suor.<sup>4</sup> Com grande variabilidade fenotípica, os pacientes podem ser classificados como portadores de doença típica (clássica) ou de doença atípica (não-clássica).<sup>5</sup>

A mutação gênica mais comumente encontrada é a F508del, representando a ausência do aminoácido fenilalanina na posição 508. Entretanto, mais de 1900 mutações causadoras de FC já foram descritas.<sup>6,7</sup>

### 1.1.2 Histórico

As primeiras observações aconteceram já no século XVIII e XIX, quando se notou que as crianças com o suor salgado morriam precocemente. Os relatos iniciais da associação de insuficiência pancreática e doença pulmonar aconteceram em 1935 com Fanconi<sup>8</sup>.

Em 1938 Dorothy Andersen descreveu as características clínicas, anatomopatológicas e epidemiológicas da FC<sup>9</sup>. Em 1950 foi criado o termo mucoviscidose por Farber.

Já em 1953 Di Sant'Agnese e colaboradores observaram pela primeira vez que os eletrólitos no suor estavam aumentados nesses pacientes<sup>10</sup>, sendo padronizado o teste de suor por Gibson & Cooke em 1959<sup>11</sup>. No mesmo ano, foi publicado o escore clínico de Schwachman o qual é utilizado até hoje<sup>12</sup>.

A descrição de infertilidade por obstrução do deferente e tubos seminíferos aconteceu em 1968<sup>8</sup>.

Em 1985, um grupo de pesquisadores localizou o gene de FC, e também realizou o sequenciamento em 1989<sup>13,14</sup>.

Nas décadas de 1990 e 2000, várias pesquisas foram realizadas a fim de promover o diagnóstico precoce e medidas de tratamento visando melhor qualidade de vida e maior sobrevida<sup>15</sup>.

### 1.1.3 Epidemiologia

A incidência da doença é de 1:3.500 nascidos vivos na população caucasiana, 1:15.000 em afro-americanos e 1:31.000 em asiáticos<sup>17,18</sup>.

De acordo com os dados da Cystic Fibrosis Foundation de 2010, observou-se que mais de 800 casos novos de FC são diagnosticados a cada ano nos Estados Unidos, chegando a 26272 pacientes cadastrados<sup>16</sup>.

Nas últimas 4 décadas, a sobrevida dos pacientes com fibrose cística tem aumentado consideravelmente, chegando a 36,9 anos em 2006<sup>1</sup> e 38,3 anos em

2010<sup>16</sup>. O número de pacientes com mais de 18 anos em 1990 era aproximadamente 30% do total, aumentando para mais de 47% em 2010. Além disso, a maioria desses pacientes é casado, possui emprego e ingressou na faculdade<sup>16</sup>.

A maior parte dos pacientes com FC é de origem caucasiana (94%), não havendo predomínio significativo entre os sexos (52% são masculinos). Tendo em vista que a maioria dos adultos com fibrose cística possui entre 18 e 30 anos, aumentou também o número de adultos mais velhos sendo 25% entre 30 e 39 anos e 10% acima de 40 anos<sup>1</sup>.

Mais de 1900 mutações já foram descritas, e conforme os dados norte-americanos 91,7% das pessoas possuem as mutações identificadas nesse país. Mais que 88% delas possuem pelo menos uma cópia da mutação delta F508<sup>16</sup>.

No Brasil, a prevalência estimada mais próxima da população caucasiana européia é na região sul – 1:2.500<sup>20</sup>. Apesar dos dados sobre incidência e prevalência no Brasil não serem totalmente fidedignos, talvez pela baixa porcentagem do total de casos diagnosticados<sup>21</sup>, estudos regionais mostram dados estatísticos variáveis que sugerem uma incidência em torno de 1:7.000 no país como um todo<sup>22</sup>. Em Porto Alegre, a estimativa de incidência é de 1:2.745 nascidos vivos<sup>23</sup>.

#### **1.1.4 Fisiopatologia**

A fibrose cística é uma doença genética, autossômica recessiva, causada por mutações em um gene localizado no braço longo do cromossoma 7<sup>2,13</sup>. O gene codifica uma proteína denominada regulador da condutância transmembrana da FC (CFTR, em inglês, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)<sup>14</sup>.

A proteína CFTR funciona como um canal de cloro nas membranas epiteliais, regulando o transporte e o balanço de eletrólitos e água<sup>4</sup>. As mutações do gene da FC promovem ausência ou disfunção da CFTR, causando prejuízo na condutância de cloretos através da membrana apical das células epiteliais com aumento da absorção celular de sódio<sup>25</sup>. O resultado é uma secreção desidratada,

espessa e viscosa associada com obstrução luminal, destruição e cicatrização nos ductos exócrinos<sup>26,27</sup>.

As manifestações da doença ocorrem na presença de dois alelos com mutações no gene da FC, geralmente com envolvimento multissistêmico. A FC leva a alterações patológicas em órgãos em que a CFTR é expressa, incluindo células epiteliais dos pulmões, seios da face, pâncreas, fígado, sistema reprodutor, glândulas sudoríparas e salivares<sup>25</sup>.

O desenvolvimento nas técnicas de análise molecular permitiu a identificação de mais de 1900 mutações da CFTR, conforme Banco de Dados de Mutações da Fibrose Cística (*Cystic Fibrosis Mutation Database* – <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). As mutações genéticas têm sido classificadas em 6 classes, dividindo-se em severas (I, II e III) e leves (IV, V, VI); baseado no mecanismo molecular alterado<sup>28,29</sup>.

Na classe I, a CFTR não é sintetizada; na classe II, ela é inadequadamente processada no retículo endoplasmático; na classe III, ela é inadequadamente regulada; na classe IV, ela apresenta uma condutância anormal; na classe V, ocorre um defeito parcial de produção; e na classe VI, ocorre uma degradação acelerada<sup>4,30</sup>.

As formas não clássicas da FC têm sido associadas com mutações que reduzem, mas não eliminam a função da proteína CFTR<sup>31</sup>.

Em geral, os indivíduos homozigotos para as classes I-III possuem insuficiência pancreática, diabetes, altas taxas de íleo meconial, mortalidade precoce, declínio mais rápido da função pulmonar, maior desnutrição e hepatopatia<sup>28</sup>. Já os pacientes de classe IV e V possuem uma doença mais leve, suficiência pancreática e maior sobrevivência<sup>32,33</sup>.

As alterações mais impactantes da FC são nas vias aéreas, na qual a disfunção genética promove infecções pulmonares crônicas com patógenos específicos. Nos pulmões, a depleção de líquido na mucosa reduz o funcionamento e a estabilidade ciliar, diminuindo a depuração muco ciliar. A consequência disso é um ciclo vicioso com retenção de secreção, infecção, inflamação e surgimento de bronquiectasias<sup>35</sup>.

## 1.1.5 Manifestações Clínicas

### 1.1.5.1 Sinusopulmonar

Embora a FC afete vários órgãos, o pulmão é responsável pela maior morbidade e mortalidade. O processo inflamatório e a infecção pulmonar crônica promovem declínio da função pulmonar resultando em sintomas como a tosse e expectoração crônica<sup>36</sup>.

Níveis elevados de interleucina-8, interleucina-6 e leucotrienos bem como redução dos níveis de citocinas antiinflamatórias e proteases foram encontrado nas vias aéreas dos pacientes com FC<sup>26</sup>.

Os principais sintomas encontrados nos pacientes com FC são associados à presença dos tampões mucosos nos brônquios, inflamação e bronquiectasias. Essas costumam surgir nos lobos superiores, podendo progredir para todos os lobos restantes<sup>1</sup>.

A doença sinusopulmonar crônica na FC se manifesta por: colonização ou infecção persistente com patógenos típicos, tosse ou expectoração crônica, anormalidades persistentes na radiografia de tórax, obstrução das vias aéreas com sibilância e alçaponamento aéreo, pólipos nasais, anormalidades radiográficas ou tomográficas dos seios paranasais e baqueteamento digital<sup>2</sup>.

O acompanhamento da função pulmonar, avaliado pela espirometria, é realizado pelo volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) como parâmetro prognóstico da doença. O declínio progressivo se inicia na adolescência, com uma taxa média de redução no VEF<sub>1</sub> de 1 a 4% ao ano<sup>1,38</sup>. Quando o VEF<sub>1</sub> chega a 30%, os pacientes geralmente iniciam com limitação funcional importante e internações mais frequentes, momento em que se considera a realização do transplante pulmonar bilateral<sup>39</sup>.

A colonização e infecção bacteriana crônica na FC ocorrem de maneira progressiva de acordo com a idade e com o curso da doença pulmonar. No início, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenza* são os mais comuns. Aos 18 anos, aproximadamente 80% dos pacientes são colonizados cronicamente pela

*Pseudomonas aeruginosa*<sup>1,2</sup>, sendo que as cepas mucoides estão associadas com deterioração mais rápida do quadro clínico<sup>2</sup>.

A *Burkholderia cenocepacia*, um espécie genômica específica da *B. cepacia*, é a bactéria relacionada com rápido declínio da função pulmonar e pior prognóstico. Essa bactéria geralmente é resistente ao tratamento antipseudomonas habitual, havendo necessidade de atenção especial pela possibilidade de transmissão através do contato entre os pacientes com FC<sup>1,40</sup>.

Outras infecções que podem tornar o tratamento da FC um desafio maior são: *P. aeruginosa* multirresistente (17-25%)<sup>41</sup>, micobacteriose não tuberculosa (7-13%)<sup>42</sup> e a aspergilose broncopulmonar alérgica (2-7%)<sup>43</sup>.

Existem episódios intermitentes de piora aguda dos sintomas, definidos como exacerbação pulmonar, os quais determinam piora da qualidade de vida, maior velocidade de declínio da função pulmonar e maior custo para o tratamento<sup>36</sup>.

A inflamação bronquiolar e brônquica crônica de predomínio neutrofílico é responsável pelo surgimento das bronquiectasias. Essas áreas são predispostas à hemoptise, podendo ser maciça em 4,1% dos casos. A impactação brônquica do muco espesso pode também ocasionar atelectasia lobar ou segmentar. Lesões císticas e áreas bolhosas facilitam o surgimento de pneumotórax (16% a 20% dos adultos)<sup>30</sup>.

A maioria dos pacientes com FC e doença pulmonar avançada possui elevação da pressão na artéria pulmonar, geralmente de grau leve e relacionada à destruição parenquimatosa ou hipoxemia<sup>44</sup>. O sono também geralmente é alterado, com interrupções frequentes, relacionado parcialmente à gravidade da doença pulmonar<sup>45</sup>.

#### 1.1.5.2 Gastrointestinais e Nutricionais

As manifestações mais precoces da FC são relacionadas a alterações gastrointestinais e nutricionais. Destruição do tecido pancreático acinar, obstrução do ducto pancreático, insuficiência pancreática exócrina e doença hepática crônica são exemplos<sup>46,2</sup>.

O estado nutricional possui relação com a progressão da doença pulmonar. Vários fatores contribuem para a desnutrição como má absorção crônica, infecções sinusopulmonares recorrentes, inflamação crônica, aumento do gasto energético e ingesta precária. Dessa forma, pacientes com FC que possuem melhor estado nutricional possuem melhor sobrevida. Recomenda-se um índice de massa corporal de 22 kg/m<sup>2</sup> para as mulheres adultas e de 23 kg/m<sup>2</sup> para os homens adultos<sup>46,47</sup>.

Uma das primeiras manifestações da FC, logo após o nascimento, pode ser o íleo meconial (11 a 20%) causado pelo ressecamento do bolo fecal. De forma similar nos adultos, a síndrome da obstrução intestinal distal promove quadro clínico compatível com obstrução intestinal do intestino delgado<sup>1,2</sup>.

A insuficiência pancreática exócrina acontece em aproximadamente 90% dos pacientes com FC e necessitam suplementação de enzimas pancreáticas (amilase, lipase e protease) a fim de evitar a má absorção crônica. Mesmo com o uso dessas enzimas, os pacientes apresentam certo grau de má absorção. Doses extras de vitaminas lipossolúveis (A,D,E e K) também são recomendadas<sup>1</sup>.

Sintomas de refluxo gastro esofágico (RGE) podem ser observados com uma prevalência de 35-81% dos pacientes com FC<sup>48</sup>. Essa condição pode piorar o estado nutricional<sup>49</sup>. A ingesta aumentada com dieta hipercalórica, manobras de fisioterapia, medicações e a tosse crônica contribuem para a condição<sup>48</sup>.

A incidência cumulativa de doença hepática varia entre 27-35% dos pacientes com FC e é considerada a segunda causa de morte nessa população<sup>50,52</sup>. Dados de necropsia mostram até 70% de alguma alteração hepática, porém aproximadamente 5 a 10% dessa população desenvolvem cirrose multilobular com hipertensão portal<sup>51</sup>. Assim há necessidade de avaliação anual para rastreamento de hepatopatia, geralmente com mensuração de enzimas hepáticas e ecografia para escore hepático (borda hepática, nodularidade e ecogenicidade periportal)<sup>51,53</sup>. O padrão áureo para diagnóstico é a biópsia hepática com a opção do ácido ursodesoxicólico para tratamento adicional<sup>53</sup>.

### 1.1.5.3 Distúrbios Endócrinos e Aspectos Reprodutivos

A diabetes relacionada à fibrose cística (DMRFC) é a comorbidade comum nos pacientes com fibrose cística, ocorrendo em aproximadamente 20% dos adolescentes e 40-50% dos adultos. O defeito básico parece ser devido a precipitação de proteínas viscosas nos ductos pancreático biliar com consequente obstrução ductal e lesão ou destruição do tecido pancreático, reduzindo o número de células beta. Dessa forma, a DMRFC é causada primariamente pela insuficiência de insulina, embora níveis flutuantes de resistência insulínica sejam comuns<sup>55</sup>.

O surgimento clínico da DMRFC se associa ao declínio acentuado do estado clínico, função pulmonar e sobrevida, especialmente nas mulheres<sup>56</sup>. Ao contrário dos pacientes com outros tipos de diabetes, não há casos documentados de morte relacionada a doença aterosclerótica em pacientes com DMRFC<sup>55</sup>.

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA), os pacientes com fibrose cística devem realizar rastreamento anual com teste de tolerância oral da glicose a partir dos 10 anos de idade, com os critérios diagnósticos habituais. Não se recomenda o uso de hemoglobina glicosilada como teste de rastreamento. O tratamento deve ser realizado com insulina a fim de atingir o alvo glicêmico adequado. Além disso, os pacientes devem ser monitorados anualmente para as complicações do diabetes após 5 anos do diagnóstico de DMRFC<sup>57</sup>.

A prevalência de alterações esqueléticas na população de adultos com FC, em decorrência de distúrbios do cálcio, é alta. Em revisão sistemática a prevalência de osteoporose em adultos com fibrose cística foi de 23,5% e a de fraturas vertebral e não vertebral de 14% e 19,7% respectivamente<sup>58</sup>. Osteopenia é observada em 38%<sup>59</sup>.

Recentes dados sugerem que a disfunção da CFTR afeta a atividade celular óssea. A baixa densidade mineral óssea tem etiologia multifatorial como fatores genéticos, insuficiência pancreática, desnutrição, corticoterapia, níveis inadequados de hormônios sexuais, níveis elevados de citocinas inflamatórias, inatividade e má absorção da vitamina D. Os bifosfonados mostraram melhorar a densidade mineral óssea em pacientes com fibrose cística<sup>61</sup>.

Aproximadamente 99% dos homens com FC apresentam infertilidade por ausência congênita bilateral dos canais deferentes. A produção de esperma, por

outro lado, acontece normalmente permitindo técnica de reprodução assistida com aspiração microepididimária e fertilização *in vitro*<sup>1</sup>. As mulheres com FC não parecem ter diminuição significativa da fertilidade e podem ter bom desfecho se associada com boa função pulmonar e nutricional<sup>62</sup>.

### 1.1.6 Diagnóstico

O significativo avanço no diagnóstico e tratamento da FC nas últimas décadas ajudou a melhorar o entendimento da doença, estimulando uma reavaliação dos critérios diagnósticos. A maioria dos pacientes é diagnosticada antes do primeiro ano de vida, porém a idade de início dos sintomas é variável. Além disso, o entendimento da ampla variedade de fenótipos existentes nos pacientes com FC, bem como os avanços do teste de eletrólitos no suor ajudaram a melhorar a acurácia do diagnóstico da FC<sup>18</sup>.

Os pacientes diagnosticados na idade adulta habitualmente possuem mais sintomas respiratórios crônicos. Por outro lado, geralmente apresentam doença pulmonar mais leve, menor taxa de infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, menor prevalência de insuficiência pancreática, apresentam menos complicações e parecem viver mais do que os pacientes que receberam o diagnóstico antes dos 18 anos<sup>63</sup>.

A triagem neonatal, também conhecida no Brasil como “teste do pezinho”, é o método de rastreamento da doença e não de diagnóstico. Nos casos positivos, os neonatos são encaminhados para realizar o teste diagnóstico definitivo<sup>18</sup>. A partir de junho de 2012, o Rio Grande do Sul passou a realizar de rotina a pesquisa de fibrose cística nos pacientes do Sistema Único de Saúde.

A FC é diagnosticada na presença de pelo menos um achado clínico fenotípico, já descritos anteriormente (doença sinusopulmonar crônica, manifestações gastrointestinais e nutricionais, síndromes perdedoras de sal e anormalidades urogenitais), história familiar de FC ou triagem neonatal positiva acompanhada de evidência laboratorial de disfunção da CFTR (teste do suor positivo ou diferença de potencial nasal positivo ou pela identificação de duas mutações conhecidas como causa de FC nos genes da CFTR<sup>18,2</sup>.

#### 1.1.6.1 Teste do suor

A avaliação dos eletrólitos no suor tem sido o principal método utilizado para diagnóstico desde a sua padronização em 1959 em um método conhecido como Gibson-Cooke<sup>11</sup>.

Embora a avaliação genética das mutações da CFTR tenha ganhado espaço no diagnóstico da FC nos últimos anos, o teste do suor continua sendo o teste padrão áureo para demonstrar a disfunção da CFTR na prática clínica<sup>18</sup>. Isso se deve à combinação de uma alta sensibilidade (98%) e alta especificidade (95%) associada a baixo custo do teste<sup>65</sup>.

A técnica realizada é a iontoforese pela pilocarpina para estimular a secreção pelas glândulas de suor, seguido de coleta em gaze, filtro de papel ou sistema Macroduct (Wescor, Logan, UT, USA) e análise da concentração de cloro<sup>18</sup>, pois foi identificado como principal eletrólito afetado na FC<sup>64</sup>. O valor de suor mínimo aceitável é de 75 mg no procedimento de Gibson-Cooke e de 15 µL para o sistema Macroduct<sup>2</sup>.

O teste deve ser realizado pelo menos duas vezes para confirmação do diagnóstico, com intervalo de semanas entre eles. O ponto de corte para diagnóstico é de cloro acima de 60 mEq/l, em amostra adequada. Valores entre 40 e 60 mEq/l são considerados limítrofes ou intermediários; e valores inferiores a 40 mEq/l são considerados normais<sup>2,18</sup>.

Entretanto, o teste do suor normal ou limítrofe não exclui o diagnóstico de FC. Esses pacientes deverão realizar testes adicionais. Aproximadamente 3,5% dos pacientes com diagnóstico de FC possuem cloro menor que 60 mEq/l e somente 1,2% com menos de 40 mEq/l<sup>66</sup>.

#### 1.1.6.2 Diferença de Potencial Nasal (DPN)

Testes adicionais são utilizados para auxiliar o diagnóstico em pacientes com sintomas gastrointestinais ou pulmonares menos específicos de FC. O teste de

DPN pode ser particularmente útil nos pacientes com teste de cloro no suor limítrofe ou inconclusivo<sup>67</sup>.

Os achados indicativos de FC incluem a presença de uma alta diferença de potencial basal, maior inibição da DPN após perfusão nasal com amilorida e pouca ou nenhuma alteração após a perfusão do epitélio com solução livre de cloretos com isoproterenol<sup>2,68</sup>.

Recomenda-se também que a DPN seja avaliada 2 vezes, em momentos diferentes. Porém, poucos centros altamente especializados são capacitados para realizar a técnica com padronização adequada<sup>2,19</sup>.

### 1.1.6.3 Análise Molecular

Nos pacientes em que o teste do suor é limítrofe, a análise molecular pode ajudar a estabelecer o diagnóstico. Tanto a análise quanto a interpretação do genótipo da FC requer a utilização de técnicas apropriadas a fim de identificar as mutações CFTR, critérios padronizados para definir quais as mutações são causadoras de FC e o entendimento da relação genótipo e fenótipo da FC<sup>18</sup>.

A presença de mutações conhecidas como causadoras de FC em cada um dos genes da CFTR (homozigoto), associada a um fenótipo clínico compatível ou história familiar positiva estabelece diagnóstico de FC (doença molecular confirmada). Entretanto, o achado de uma mutação (heterozigoto) ou nenhuma mutação não exclui o diagnóstico de FC<sup>2</sup>. Dessa forma, o diagnóstico deve estar associado a presença de achados clínicos<sup>69</sup>.

As duas mutações da CFTR podem ser localizadas no trans em 2 cromossomos separadas ou no cis no mesmo cromossomo. As mutações podem variar conforme a população estudada, diferindo os caucasianos dos hispânicos, africanos e asiáticos<sup>18</sup>.

A sensibilidade da genotipagem para FC depende inteiramente do número de mutações testadas e da etnia dos indivíduos testados<sup>5,88</sup>. Geralmente a baixa sensibilidade ocorre devido a esse grande número de mutações conhecidas e pela disponibilidade que os painéis comerciais disponíveis só estudam uma minoria

dessas mutações. Poucos centros estão capacitados para realizar o sequenciamento genético para o diagnóstico dos casos atípicos<sup>2,70,71</sup>.

O desenvolvimento nas técnicas de análise molecular proporcionou melhor entendimento da doença. Atualmente mais de 1900 mutações da CFTR foram identificadas. Essas mutações, como já descrito, foram então classificadas em 5 classes, dividindo-se em severas (I, II e III) e leves (IV, V)<sup>28,29</sup>. O mecanismo molecular alterado em cada classe foi discutido anteriormente na sessão de fisiopatologia.

A mutação gênica mais comumente encontrada é a F508del (ausência do aminoácido fenilalanina na posição 508), porém a frequência difere entre as populações sendo aproximadamente 47% no Brasil<sup>72</sup>. Em análise de pacientes brasileiros com FC, a F508del e outras quatro mutações (G542X, N1303K, G551D e R553X) representaram 56% dos alelos de FC<sup>7,73</sup>. O espectro de mutações de FC no Brasil indica forte influência europeia, particularmente similar ao da população italiana<sup>74</sup>. Em estudo gaúcho, realizado no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a mutação F508del foi encontrada em 48,7% dos alelos, enquanto que, adicionando as demais mutações comuns, o percentual de alelos caracterizados atingiu os 54,5%<sup>87</sup>.

### **1.1.7 Terminologia**

Desde a descoberta do gene da CFTR, se observou uma grande heterogeneidade nas manifestações clínicas da FC<sup>75</sup>. Por um lado, os pacientes podem iniciar os sintomas desde a infância e apresentar pior prognóstico, e por outro, alguns pacientes podem manifestar doença muito mais leve ou manifestações atípicas. Nesse último grupo, o diagnóstico pode ser firmado já quando adulto e o prognóstico pode ser muito melhor<sup>76</sup>.

#### 1.1.7.1 Fibrose Cística Clássica ou Típica

O termo FC clássica ou típica é utilizado quando o paciente possui um ou mais dos achados fenotípicos já descritos e o teste do suor positivo, conforme os critérios diagnósticos (cloro maior que 60 mEq/l em pelo menos 2 avaliações). A maioria dos pacientes com FC são classificados nesse grupo e podem ter suficiência ou insuficiência pancreática exócrina. A doença pode se manifestar de forma mais agressiva e rápida<sup>5</sup>. Aproximadamente 70% possuem F508del, sendo 25% homocigotos para essa mutação<sup>77</sup>.

Pacientes com doença leve geralmente possuem diagnóstico mais tardio, VEF1 (% predito) aos 20 anos de aproximadamente 93,4 %  $\pm$  19,3 e costumam não apresentar insuficiência pancreática<sup>90</sup>.

#### 1.1.7.2 Fibrose Cística Não Clássica ou Atípica

A FC não clássica ou atípica é a forma descrita para os pacientes que também possuem fenótipo compatível em pelo menos um órgão ou sistema e o teste do suor normal (cloro menor que 40 mEq/l) ou limítrofe (cloro entre 40 e 60 mEq/l).

Nessa situação, há necessidade de realização de testes adicionais para a confirmação diagnóstica com comprovação de disfunção da CFTR, como a análise molecular e a DPN.

A identificação de duas mutações causadoras de FC confirma a disfunção de CFTR e do diagnóstico de FC atípica. A identificação de uma mutação torna o diagnóstico inconclusivo. A ausência de mutações torna o diagnóstico de FC pouco provável, sendo recomendada a investigação de diagnósticos diferenciais, como a discinesia ciliar e a imunodeficiência<sup>5,71</sup>.

A maioria desses pacientes possuem suficiência pancreática e doença pulmonar leve. Eventualmente, os pacientes podem apresentar envolvimento em um único órgão com cirrose biliar focal com hipertensão portal, pancreatite recorrente, sinusite crônica, polipose nasal ou infertilidade secundária a agenesia congênita bilateral dos ductos deferentes<sup>77</sup>.

A doença pulmonar, embora geralmente mais leve, demonstra aspectos fenotípicos similares aos da forma clássica, como infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* e predomínio das lesões nos lobos superiores. A ocorrência de fenótipos menos comuns e mutações não usuais da CFTR, particularmente em adolescentes mais velhos ou adultos podem indicar FC atípica, porém torna a confirmação do diagnóstico mais difícil<sup>78</sup>.

Geralmente, os pacientes com FC não clássica possuem mutações de CFTR das classes IV e V. Comparativamente as outras classes, há redução significativa de mortalidade nesse grupo, sendo a classe IV com as menores taxas de mortalidade, porém sem diferença significativa em relação à classe V<sup>32</sup>.

### 1.1.8 Prognóstico

Nas últimas 4 décadas, a sobrevida dos pacientes com fibrose cística tem aumentado consideravelmente, chegando a 36,9 anos em 2006<sup>1</sup> e 38,3 anos em 2010<sup>16</sup>. Em 1950, a expectativa de vida era inferior a 1 ano e poucos conseguiam ingressar na escola. Entre a década de 70 e 80 começaram a surgir os primeiros adultos e a expectativa de vida atingiu os 18 anos. O desenvolvimento da terapia por antibióticos anti *Pseudomonas* e a reposição de enzimas pancreáticas foi importante para o aumento da sobrevida.

## 1.2 PROGRAMA DE ADULTOS

O registro da *Cystic Fibrosis Foundation* em 2010 mostrou que 47% da população de pacientes com FC eram adultos, demonstrando aumento desses pacientes comparativamente a 1990 quando a taxa era de apenas 30%<sup>16</sup>. Assim, o desenvolvimento de centros especializados no tratamento dos pacientes adultos se tornou essencial. Os centros de tratamento da FC devem dispor de uma equipe multidisciplinar com pneumologista, enfermeiro, fisioterapeuta, nutricionista, assistente social e psicólogo. Os objetivos primários da equipe de tratamento incluem: assegurar atendimento otimizado, facilitar o acesso aos recursos

terapêuticos e possibilitar melhora na qualidade de vida e independência de cada paciente<sup>19</sup>.

A passagem de um paciente da equipe pediátrica para a clínica de adultos é uma situação comum para aqueles que não têm problemas de saúde. Para pacientes com doenças crônicas como a FC, que desenvolveram uma relação próxima e de confiança com uma equipe pediátrica, a transferência pode ser difícil. Uma das opções utilizadas para a transição é o acompanhamento conjunto com a equipe pediátrica por um período<sup>79</sup>.

Os adultos geralmente possuem doença pulmonar mais grave, alta prevalência de DM e maiores alterações psicossociais, reforçando a abordagem multidisciplinar. A adolescência, especialmente, se caracteriza por uma fase de mudanças importantes, que podem ser afetadas na fibrose cística e devem ser discutidas na equipe, como o desenvolvimento físico e sexual; o desenvolvimento de identidade própria, autonomia e independência; relações interpessoais e planejamento futuro<sup>19</sup>.

## 2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) é centro de referência para diagnóstico e tratamento da FC e, desde 1998, é desenvolvido um programa multidisciplinar para adultos com a doença.

Esse programa possui aproximadamente 95 pacientes, sendo 80 com diagnóstico confirmado através do teste do suor e/ou da pesquisa de mutações. Dentre os pacientes com diagnóstico confirmado, há um número significativo de pacientes com diagnóstico tardio, com suficiência pancreática e doença pulmonar mais leve.

Outros pacientes foram encaminhados ao ambulatório devido suspeita clínica de FC através da presença de achados fenotípicos compatíveis, porém não tiveram confirmação diagnóstica avaliada pelo teste de eletrólitos do suor, os quais foram normais ou limítrofes. Adicionalmente, foi realizada pesquisa das seis mutações mais frequentes no CFTR através das análises disponíveis para diagnóstico no HCPA, incluído a F508del.

Esse contexto exigiu a interface entre a pneumologia clínica e a genética para utilizar técnicas que possibilitassem a identificação de mutações no grupo de pacientes sem confirmação diagnóstica ou com doença leve.

Outro aspecto relevante é a pequena quantidade de estudos e dados brasileiros sobre as mutações do gene da CFTR, especialmente em pacientes adultos e com doença atípica. Sabe-se que a população brasileira possui uma ampla variação na frequência das mutações da CFTR, aparentemente pela diferente composição étnica entre os estados<sup>80</sup>.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Principal**

Avaliar a contribuição da análise molecular do gene CFTR na investigação diagnóstica de pacientes adolescentes e adultos com suspeita de fibrose cística leve ou doença atípica.

#### **3.2 Secundários**

Comparar as características dos pacientes em 3 grupos: grupo com identificação de duas mutações conhecidas como causadoras da FC (diagnóstico molecular confirmado de FC), grupo de indivíduos com identificação de apenas uma mutação conhecida como causadora da FC e grupo de indivíduos sem mutação identificada.

## **4 PACIENTES E MÉTODOS**

### **4.1 DELINEAMENTO**

Estudo transversal, realizado em um único centro, buscando avaliar a contribuição da análise molecular do gene CFTR na investigação diagnóstica de pacientes adolescentes e adultos com suspeita de fibrose cística leve (com confirmação pelo teste do suor) ou doença atípica (sem confirmação pelo teste do suor).

### **4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO**

#### **4.2.1 População**

A população do estudo compreendeu os pacientes com idade igual ou superior a 14 anos, acompanhados no Serviço de Pneumologia do HCPA, com diagnóstico confirmado ou presumido de FC.

#### **4.2.2 Critérios de Inclusão**

- Pacientes com achados fenotípicos de FC, com ou sem confirmação pelo teste do suor.
- Pacientes com idade igual ou superior a 14 anos;
- Pacientes que assinarem o termo de consentimento pós-informação.

### **4.2.3 Critérios de Exclusão**

Pacientes que tiverem outra doença identificada como causa dos achados fenotípicos como, por exemplo, discinesia ciliar ou deficiência imunológica primária; pacientes gestantes; e pacientes que não aceitaram participar ou assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

## **4.3 MEDIDAS E INSTRUMENTOS**

### **4.3.1 Avaliações**

#### **4.3.1.1 Avaliação Clínica**

Durante consulta ambulatorial de rotina, os pacientes que estavam em investigação diagnóstica de FC e os pacientes com suspeita de fibrose cística leve ou doença atípica foram abordados quanto à sua participação no estudo e analisados quanto aos critérios de inclusão e exclusão.

A caracterização diagnóstica foi realizada revisando os achados fenotípicos e os resultados dos testes de suor de cada caso. Essas informações foram obtidas através de avaliação clínica e retrospectivamente em registro de base de dados desenvolvida pela equipe multidisciplinar de FC.

O teste do suor foi considerado positivo quando houvesse uma dosagem de cloretos maior que 60 mEq/L em pelo menos dois testes realizados em momentos diferentes e com amostra adequada (peso > 75 mg).

As características clínicas da doença foram obtidas utilizando ficha específica (Anexo A), preenchida pelos pesquisadores.

#### 4.3.1.2 Avaliação da Função Pulmonar

A espirometria é solicitada de rotina pela equipe médica em cada consulta. Ela é realizada na Unidade de Fisiologia Pulmonar do Serviço de Pneumologia do HCPA com o paciente em posição sentada, utilizando o equipamento *Jaeger – v 4.31a* (Jaeger, Wuertzburg, Alemanha), dentro dos critérios de aceitabilidade técnica das Diretrizes para Testes de Função Pulmonar da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia<sup>81</sup>. Três sucessivas curvas expiratórias forçadas foram realizadas, sendo registrada a com valores maiores.

Os parâmetros registrados foram capacidade vital forçada (CVF) em litros e em percentagem do previsto, o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) em litros e em percentagem do previsto e a relação VEF<sub>1</sub>/CVF em valor absoluto e em percentagem do previsto. Para expressar as variáveis funcionais pulmonares em percentagem do previsto para sexo, idade e altura foram utilizados nomogramas para tal fim. Os fluxos aéreos também foram analisados de acordo com os critérios das referidas Diretrizes para Testes de Função Pulmonar<sup>81</sup>.

#### 4.3.1.3 Escore Clínico

O escore de Shwachman-Kulczycki<sup>12</sup> foi descrito em 1958 após um estudo longitudinal com 105 fibrocísticos acompanhados durante 5 anos a partir do diagnóstico. A partir disso, percebeu-se a necessidade de um sistema de avaliação clínica e de gravidade, além da inclusão da função pulmonar na avaliação<sup>82</sup>.

Esse sistema de avaliação foi um marco no histórico da FC, sendo respeitado e amplamente utilizado com instrumento de avaliação da gravidade da doença<sup>83</sup>.

O escore foi elaborado com o objetivo de comparar as manifestações clínicas entre os pacientes, detectar os efeitos do tratamento e contribuir para a determinação de critérios diagnósticos<sup>82</sup>.

A avaliação considera quatro diferentes características (atividade geral, exame físico, nutrição e achados radiológicos do tórax), sendo cada uma delas

pontuadas em uma escala de 5 a 25 pontos (melhor desempenho, maior pontuação), sendo que um escore final de 100 pontos representaria o paciente em ótima condição clínica<sup>12</sup>.

#### 4.3.1.4 Escore Hepático

Quando apenas critérios clínicos são considerados, a hepatopatia é encontrada em 1,4 a 7% dos pacientes com FC<sup>84</sup>, aumentando significativamente quando associada à bioquímica e à ecografia<sup>85</sup>.

As limitações do exame clínico, a realização de biópsia hepática como procedimento invasivo e a controvérsia da triagem bioquímica tornaram necessário o desenvolvimento de técnicas de imagem não invasivas, como a ultra-sonografia, para o diagnóstico mais precoce da hepatopatia<sup>84</sup>.

Williams e colaboradores<sup>54</sup> desenvolveram um sistema de escore ultrassonográfico para auxiliar a identificação de pacientes com hepatopatia associada à FC. Este sistema considera três características ultrassonográficas: parênquima hepático (pontuação 1 = normal, 2 = grosseiro e 3 = irregular), borda hepática (pontuação 1 = lisa e 3 = nodular) e fibrose periportal (pontuação 1 = ausente, 2 = moderada e 3 = grave). O escore final igual a 3 é consistente com um fígado normal. Escores crescentes são sugestivos de doença hepática progressiva. Um escore de 8 a 9 é compatível com cirrose hepática estabelecida.

Essa pontuação é útil não só para identificar pacientes com cirrose, mas também para pacientes com doença mais leve (escore 4-7), através do diagnóstico mais precoce e na monitoração do tratamento<sup>86</sup>.

O sistema de avaliação ultrassonográfica pelo escore de Williams é utilizado na rotina do HCPA e o registro foi obtido a partir da interpretação do ecografista em exame realizado por ocasião da avaliação de rotina.

#### 4.3.1.5 Análise Microbiológica

Foram revisados os exames bacteriológicos de escarro realizados na rotina clínica nos últimos 12 meses. A identificação da *Pseudomonas aeruginosa* (cepas mucoides e não mucoides), *Staphylococcus aureus* (meticilina sensível e resistente), *Burkholderia cepacia* e *Haemophilus influenza* foram registrados quando identificados pelo menos duas vezes em amostras de escarro coletadas na rotina clínica.

A rotina ambulatorial de avaliação bacteriológica do escarro envolve a coleta de uma amostra a cada consulta (em geral, a cada 60 dias) ou em cada internação hospitalar.

A realização do exame bacteriológico do escarro segue a rotina descrita a seguir. O escarro é semeado em 6 tipos de ágar: Brucela, Azida Sangue, Chocolate, MacConkey, seletivo para *B. cepacia* e seletivo para *P. aeruginosa*.

Após 24 horas na estufa, é feita uma triagem para averiguar se houve crescimento de colônias nos ágar. Geralmente, o crescimento ideal das colônias ocorre com uma incubação de 48h para os ágar Brucela, Azida Sangue e Chocolate e incubação de 72h para os ágar MacConkey, seletivo para *B. cepacia* e seletivo para *P. aeruginosa*.

Para a identificação das bactérias gram-positivas, as colônias são semeadas em caldos de cultura por 4 a 5 horas. Após, é feito um antibiograma em meio sólido.

Para bactérias gram-negativas, é feita uma série bioquímica e um antibiograma. Bactérias não-fermentadoras podem não ser identificadas na série bioquímica. Para estes casos, é realizada uma semi-automação em aparelho específico (Mini-API). O último recurso para descartar *B. cepacia* e *P. aeruginosa* é a reação em cadeia da polimerase (PCR) feito na biologia molecular.

Foram considerados pacientes infectados com *Haemophilus influenza*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* os pacientes com pelo menos duas amostras de escarro positivas para essas bactérias no último ano de avaliação.

#### 4.3.1.6 Análise Molecular

O isolamento de DNA foi realizado a partir de uma amostra de 5 mL de sangue, coletada através de punção venosa em frasco contendo EDTA como anti-coagulante, e o mesmo foi armazenado sob refrigeração.

A extração de DNA dos pacientes foi realizada por meio do protocolo de precipitação em excesso de sais e proteinase K<sup>89</sup>. A concentração de DNA foi determinada pelo método fluorimétrico *Quant-iT*<sup>®</sup> (*Invitrogen*), utilizando o aparelho *Qubit*<sup>™</sup> (*Invitrogen*).

A região codificante do gene CFTR foi amplificada pela reação em cadeia de polimerase (PCR) usando *primers* que foram desenhados para amplificação específica das regiões codificantes do gene. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose para confirmação da amplificação. Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados através de protocolo que utiliza as enzimas Exonuclease I (Exo I) (*Amersham Biosciences*) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (*Amersham Biosciences*).

O sequenciamento dos fragmentos foi realizado utilizando o kit *Big Dye*<sup>™</sup> *Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*) pelo método de terminação fluorescente no analisador genético *ABI PRISM*<sup>™</sup> *3130xl* (*Applied Biosystems*). As análises foram obtidas através do *DNA Sequencing Software v 5.2* (*Applied Biosystems*)<sup>89</sup>.

## **5 ASPECTOS ÉTICOS**

Os pacientes foram incluídos no estudo somente após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Para os pacientes abaixo de dezoito anos foi solicitada a autorização do responsável.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão Científica e de Ética do HCPA, registro número 08-549.

## 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram digitados em uma base de dados no programa Microsoft® Microsoft® Excel 2008, sendo processados e analisados com auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 18.0.

Para fins de análise, os pacientes foram divididos em três grupos: grupo com identificação de duas mutações conhecidas como causadoras da FC (diagnóstico molecular confirmado de FC), grupo de indivíduos com identificação de apenas uma mutação conhecida como causadora da FC e grupo de indivíduos sem mutação identificada.

Foi realizada uma análise descritiva para as variáveis em estudo em cada grupo considerado. Os dados quantitativos foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou como mediana (desvio interquartilico – DI). Os dados qualitativos foram expressos em n (% de todos os casos).

A análise dos dados quantitativos sem distribuição normal foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. A análise dos dados quantitativos com distribuição normal foi realizada pela análise de variância para um fator, utilizando o teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Os dados qualitativos foram analisados através do teste do qui-quadrado, utilizando, se necessário, correção de Yates ou teste exato de Fisher.

Todos os testes estatísticos utilizados foram bicaudais, sendo estabelecido um nível de significância de 5%.

Para o cálculo de tamanho amostral, foi considerada a estratégia de população fechada. Existem no Programa de Adultos 100 pacientes em acompanhamento. Desses, 80 têm diagnóstico de FC, dos quais 20 preenchem critérios de doença leve. Os 20 pacientes sem diagnóstico confirmado possuem achados fenotípicos compatíveis, porém com teste do suor com valores normais ou limítrofes. Foram estudados um total de 37 pacientes.

## 7 ARTIGO

**Título:** Contribuição da análise molecular do gene CFTR na investigação diagnóstica de pacientes com suspeita de fibrose cística leve ou doença atípica.

**Autores:** Vinícius Buaes Dal'Maso<sup>1</sup>, Lucas Mallmann<sup>2</sup>, Marina Siebert<sup>3</sup>, Laura Simon<sup>4</sup>, Maria Luiza Saraiva-Pereira<sup>5</sup>, Paulo de Tarso Roth Dalcin<sup>6</sup>

### **Credenciais e Afiliações dos Autores**

<sup>1</sup> Médico Pneumologista; aluno do Programa de Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Professor Assistente, Universidade de Passo Fundo.

<sup>2</sup> Médico, Residência Médica em Medicina Interna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

<sup>3</sup> Farmacêutica, aluna do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental – HCPA.

<sup>4</sup> Biomédica, aluna do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental – HCPA.

<sup>5</sup> Professora Associada, Departamento de Bioquímica, UFRGS; Laboratório de Identificação Genética – Centro de Pesquisa Experimental e Serviço de Genética do HCPA.

<sup>6</sup> Médico Pneumologista, Serviço de Pneumologia, HCPA; Professor Associado, Faculdade de Medicina, UFRGS.

**Endereço, Telefone e e-mail para correspondência:**

Vinícius Buaes Dal'Maso

Rua Uruguai 1953, Passo Fundo, RS, Brasil

CEP: 99010-110

Telefone: 54-3311 6711

E-mail: [dalmaso@upf.br](mailto:dalmaso@upf.br)

**Abreviaturas:**

FC – Fibrose Cística

CFTR - Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

IMC – Índice de Massa Corporal

VEF1 – Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo

CVF – Capacidade Vital Forçada

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Financiamento do Estudo**

O presente estudo recebeu suporte financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

O presente estudo recebeu doação de empresas privadas: United medical e Roche.

## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar a contribuição da análise molecular do gene CFTR na investigação diagnóstica da fibrose cística em pacientes com suspeita de FC leve ou doença atípica. Secundariamente, comparar as características dos pacientes em 3 grupos: grupo com identificação de duas mutações conhecidas como causadoras da FC, grupo com identificação de apenas uma mutação e grupo sem mutação identificada. **Métodos:** Estudo transversal em adolescentes e adultos ( $\geq 14$  anos). Os voluntários foram submetidos à avaliação clínica, laboratorial e radiológica; espirometria, microbiologia do escarro, ecografia hepática, teste do suor e análise molecular do gene CFTR. **Resultados:** Foram avaliados 37 pacientes com achados fenotípicos de FC, com ou sem confirmação pelo teste do suor. Houve predomínio do sexo feminino (75,7%) com média de idade de  $32,5 \pm 13,6$  anos. A análise molecular contribuiu para o diagnóstico definitivo de FC em 3 casos (8,1%) dentre 37 pacientes em avaliação. Em 7 pacientes (18,9%) foram identificadas apenas uma mutação causadora de FC e em 26 pacientes (70,3%) não foram identificadas mutações. Nenhuma característica clínica estudada se associou com o diagnóstico genético. A mutação p.F508del foi a mais comum, encontrada em 5 pacientes. A associação de p.V232D e p.F508del foi encontrada em 2 pacientes. Outras mutações encontradas foram: p.A559T, p.D1152H, p.T1057A, p.I148T, p.V754M, p.P1290P e p.R1066H e p.T351S. **Conclusão:** A análise molecular da região codificante do gene CFTR apresentou contribuição limitada para investigação diagnóstica de pacientes com suspeita de fibrose cística leve ou doença atípica. Além disso, não houve associação entre as características clínicas e o diagnóstico genético.

**Palavras-chaves:** fibrose cística, proteína reguladora da condutância transmembrana da fibrose cística, fenótipo, genótipo, diagnóstico.

## ABSTRACT

**Objectives:** To evaluate the contribution of molecular analysis of CFTR gene in cystic fibrosis diagnostic investigation in patients with suspected mild FC or atypical disease. Secondly, to compare the characteristics of patients into 3 groups: group with identification of two mutations known to cause CF, group with identification of just one mutation and group without mutations. **Methods:** Cross-sectional study in adolescent and adult ( $\geq 14$  years). The volunteers underwent clinical, laboratory and radiological spirometry, sputum microbiology, liver ultrasound, sweat test and molecular analysis of the CFTR gene. **Results:** We evaluated 37 patients with phenotypic findings of FC, with or without confirmation by the sweat test. There was a predominance of females (75.7%) with a mean age of  $32.5 \pm 13.6$  years. Molecular analysis contributed to the definitive diagnosis of CF in 3 cases (8.1%) among 37 patients under evaluation. In 7 patients (18.9%) were identified only one mutation that causes CF and in 26 patients (70.3%) were not identified mutations. No clinical feature studied was associated with genetic diagnosis. The P.F508del mutation was the most common, found in 5 patients. The association p.V232D and p.F508del was found in 2 patients. Other mutations found were: p.A559T, p.D1152H, p.T1057A, p.I148T, p.V754M, and p.P1290P p.R1066H and p.T351S. **Conclusion:** Molecular analysis of the CFTR gene coding region showed limited contribution to the diagnostic investigation of patients with suspected cystic fibrosis mild or atypical disease. Moreover, there was no association between clinical features and genetic diagnosis.

**Keywords:** cystic fibrosis, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, phenotype, genotype, diagnosis

## INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é uma doença com herança autossômica recessiva, causada por mutações em um gene localizado no braço longo do cromossomo 7, responsável pela codificação da proteína reguladora da condutância transmembrana da FC (do inglês *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR)<sup>1,2</sup>.

Embora o diagnóstico de FC seja usualmente feito na infância (70% dos casos no primeiro ano de vida), a frequência do diagnóstico na adolescência e na vida adulta tem aumentado, em decorrência da maior suspeita clínica e disponibilidade de técnicas de diagnóstico<sup>3</sup>.

A FC apresenta variabilidade de expressão entre os acometidos. O diagnóstico é baseado nos achados fenotípicos, na história familiar, na triagem neonatal e na realização do teste do suor, pela iontoforese quantitativa pela pilocarpina<sup>4</sup>.

Considerado padrão áureo para diagnóstico de FC, o teste do suor<sup>5</sup> é considerado positivo quando houver dosagem de cloreto maior que 60 mEq/L em pelo menos dois testes realizados em momentos diferentes. Em casos com valores limítrofes ou normais, testes diagnósticos adicionais são necessários e a pesquisa de mutações no genes CFTR deve ser realizada<sup>6,7</sup>. Tal análise apresenta alta especificidade para FC, porém baixa sensibilidade. Esse fato é explicado pela existência de grande número de mutações conhecidas (mais de 1900), mas de só uma minoria ser incluídas nos painéis comerciais disponíveis<sup>2,8</sup>. Apesar das ressalvas desse método, a pesquisa de mutações vem crescendo como método diagnóstico.

A identificação de duas mutações causadoras de FC confirma o diagnóstico de FC atípica. A identificação de uma mutação torna o diagnóstico inconclusivo. A ausência de mutações torna o diagnóstico de FC pouco provável, sendo recomendada a investigação de diagnósticos diferenciais, como a discinesia ciliar e as imunodeficiências<sup>9</sup>

O objetivo deste trabalho foi avaliar o quanto a análise molecular da região codificante do gene CFTR auxilia na investigação diagnóstica de pacientes adolescentes e adultos com suspeita de FC leve ou doença atípica; e comparar as características dos pacientes em 3 grupos: grupo com identificação de duas

mutações no gene CFTR (diagnóstico molecular confirmado de FC), grupo de indivíduos com identificação de apenas uma mutação e grupo de indivíduos sem mutação identificada.

## **MÉTODOS**

O delineamento constituiu-se em um estudo transversal, realizado em único centro, buscando avaliar a contribuição da análise molecular do gene CFTR na investigação diagnóstica de pacientes adolescentes e adultos com suspeita de fibrose cística leve (doença confirmada pelo teste do suor com doença pulmonar leve sem insuficiência pancreática) ou doença atípica (fenótipo clínico compatível sem confirmação pelo teste do suor).

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sob o número de protocolo 08-549. Termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os pacientes. O projeto de pesquisa recebeu doações de empresas privadas (Roche e United Medical), porém estes apoiadores não tiveram direito de participar no delineamento do estudo, execução, análise e divulgação dos resultados.

A população do estudo foi constituída por pacientes atendidos no ambulatório para adolescentes e adultos com FC do Serviço de Pneumologia do HCPA (Porto Alegre, RS, Brasil). Foram incluídos indivíduos com idade igual ou superior a 14 anos com achados fenotípicos de FC (baqueteamento digital, bronquiectasias, infecção bacteriana crônica por germes típicos, insuficiência pancreática exócrina) com ou sem confirmação pelo teste do suor.

Foram excluídos do estudo: pacientes que tiverem outra doença identificada como causa dos achados fenotípicos como, por exemplo, discinesia ciliar ou deficiência imunológica primária; pacientes gestantes; e pacientes que não aceitaram participar ou assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os pacientes foram selecionados em consultas de rotina no período de 2009 a 2010 e entrevistados por um dos membros da equipe de pesquisa, utilizando ficha de coleta de dados composta pelas seguintes variáveis: idade, sexo, estado civil, etnia, história familiar para FC, presença de baqueteamento digital e IMC.

Os pacientes realizaram o teste oral de tolerância à glicose de 2 h, exceto aqueles com diagnóstico prévio já definido de diabetes melito através de glicemia de jejum, conforme critério da American Diabetes Association<sup>10.11</sup>. A avaliação de sinusopatia crônica foi complementada com o uso da tomografia de seios da face.

O escore clínico de Shwachman-Kulczycki<sup>12</sup> foi utilizado para a mensuração da gravidade geral da doença. A avaliação considera quatro diferentes características (atividade geral, exame físico, nutrição e achados radiológicos do tórax), sendo cada uma delas pontuadas em uma escala de 5 a 25 pontos (melhor desempenho, maior pontuação), sendo que o escore final de 100 pontos representaria o paciente em ótima condição clínica.

Foram revisados os exames bacteriológicos de escarro realizados na rotina clínica nos últimos 12 meses. A identificação da *Pseudomonas aeruginosa* (cepas mucoides e não mucoides), *Staphylococcus aureus* (meticilina sensível e resistente), *Burkholderia cepacia* e *Haemophilus influenza* foram registrados quando identificados pelo menos duas vezes em amostras de escarro coletadas na rotina clínica, em intervalo maior do que 30 dias.

A espirometria foi realizada no Serviço de Pneumologia do HCPA, utilizando o equipamento *MasterScreen*, v 4.31 (*Jaeger, Wuerzburg, Germany*), dentro dos critérios de aceitabilidade técnica das Diretrizes para Testes de Função Pulmonar da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia<sup>13</sup>. Foram registrados capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) e VEF<sub>1</sub>/CVF. O teste foi realizado em três manobras aceitáveis e o melhor teste foi registrado. Todos os parâmetros foram expressos em percentual do previsto para idade, altura e sexo<sup>14</sup>.

Na avaliação hepática, foi utilizado o sistema de escore ultrassonográfico de Williams<sup>15</sup> para o diagnóstico de doença hepática na FC. Este sistema considera três características ultrassonográficas: parênquima hepático (pontuação 1 = normal, 2 = grosseiro e 3 = irregular), borda hepática (pontuação 1 = lisa e 3 = nodular) e fibrose periportal (pontuação 1 = ausente, 2 = moderada e 3 = grave). O escore final igual a 3 é consistente com fígado normal, sendo escores crescentes sugestivos de doença hepática progressiva. O escore de 8 a 9 é compatível com cirrose hepática estabelecida. Este sistema de avaliação ultrassonográfica é utilizado na rotina do

HCPA e o registro foi obtido a partir da interpretação do ecografista em exame realizado por ocasião da avaliação de rotina.

A análise molecular foi realizada no Serviço de Genética do HCPA. Uma amostra de 5 mL de sangue periférico foi coletada para extração do DNA. A região codificante do gene CFTR foi amplificada por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR). O sequenciamento dos fragmentos foi realizado utilizando o kit Big Dye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing (Applied Biosystems) pelo método de terminação fluorescente em um analisador genético (ABI PRISM™ 3130xl Genetic Analyzer). As análises foram obtidas pelo AB DNA Sequencing Software v 5.2 (Applied Biosystems). Foi realizado o sequenciamento dos 27 exons do gene CFTR. As regiões flanqueadoras exons/introns também foram incluídas no sequenciamento. O polimorfismo do íntron 8 também foi analisado.

#### *Análise Estatística*

As informações foram processadas e analisadas com auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 18.0.

Foi realizada análise descritiva, sendo os dados quantitativos apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou como mediana (amplitude interquartilica – AI). Os dados qualitativos foram expressos em n (% de todos os casos).

Na análise estatística, os pacientes foram divididos em três grupos: grupo com identificação de duas mutações conhecidas como causadoras da FC, grupo de indivíduos com identificação de apenas uma mutação conhecida como causadora da FC e grupo de indivíduos sem mutação identificada.

A comparação entre os três grupos foi feita pela análise de variância para um fator para variáveis contínuas com distribuição normal; pelo teste de Kruskal-Wallis para variáveis ordinais ou para variáveis contínuas sem distribuição normal; e para variáveis categóricas pelo teste do qui-quadrado, utilizando, se necessário, correção de Yates ou teste exato de Fisher.

O nível de significância do estudo foi estabelecido em 0,05 e todos os testes utilizados foram bicaudais.

## RESULTADOS

No período de maio de 2009 a novembro de 2010 foram avaliados 37 pacientes com achados fenotípicos de FC, com ou sem confirmação pelo teste do suor. Nenhum paciente selecionado se recusou a participar do estudo. Todos eles concluíram as avaliações preconizadas pela pesquisa.

A Tabela 1 mostra as características gerais dos pacientes. O grupo mostrou predomínio do sexo feminino, com 28 mulheres (75,7%) e 9 homens (24,3%). A média de idade foi de  $32,5 \pm 13,6$  anos, (variando de 14-67 anos). A grande maioria era de *S. aureus* etnia caucasiana (apenas 1 era não caucasiano) e 16 pacientes (43,2%) referiram ter algum familiar (primeiro e segundo grau) com diagnóstico confirmado de FC. Cinco pacientes (13,5%) tinham diagnóstico de insuficiência pancreática exócrina. A média do IMC foi de  $22,4 \text{ Kg/m}^2 \pm 3,85$  (variação: 15,3 a  $30 \text{ Kg/m}^2$ ). Baqueteamento digital foi encontrado em 21,6% dos pacientes. Apenas 3 pacientes (8,1%) apresentaram critério diagnóstico de diabete melito e 13 (35,1%) para sinusopatia crônica. Em relação a microbiologia do escarro, a *P. aeruginosa* foi a bactéria isolada mais frequentemente (43,2%), seguida do (35,1%). O *H. influenza* foi identificado em 7 pacientes (18,9%). A *B. cepacia* foi isolada em 5,4% dos pacientes. A média do VEF<sub>1</sub> em % do previsto foi de  $68,31 \pm 25,4\%$ , a da CVF foi de  $80 \pm 19,4\%$  e a da relação VEF<sub>1</sub>/CVF foi de  $71,68 \pm 17,34\%$ . Os eletrólitos no suor foram avaliados em duas amostras, sendo que o peso médio da primeira amostra foi de  $242 \pm 85,99$  mg e da segunda  $228,50 \pm 95$  mg. A concentração de cloreto em mEq/L na primeira amostra foi de  $54 \pm 26,14$  e de  $51,76 \pm 23,37$  na segunda.

**Tabela 1** – Características gerais dos pacientes com suspeita de FC leve ou atípica <sup>a</sup>

Variáveis	Pacientes n = 37
Sexo	
Masculino	9 (24,3)
Feminino	28 (75,7)
Idade, anos <sup>b</sup>	32,5 ± 13,6
Etnia	
Caucasóide	36 (97,3)
Não Caucasóide	1 (2,7)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	22,4 ± 3,85
História Familiar de FC	16 (43,2)
Insuficiência Pancreática Exócrina	5 (13,5)
Baqueteamento Digital	8 (21,6)
Diabete melito	3 (8,1)
Sinusopatia Crônica	13 (35,1)
Bacteriologia do Escarro	
<i>P. aeruginosa</i>	16 (43,2)
<i>P. aeruginosa (mucóides)</i>	7 (18,9)
<i>P. aeruginosa (não mucóides)</i>	10 (27,0)
<i>S. aureus</i>	13 (35,1)
<i>S. aureus metilicina sensível</i>	12 (32,4)
<i>S. aureus metilicina resistente</i>	2 (5,4)
<i>B. cepacia</i>	2 (5,4)
<i>H. influenza</i>	7 (18,9)
VEF <sub>1</sub> (litros) <sup>b</sup>	2,2 ± 0,95
VEF <sub>1</sub> (% previsto) <sup>b</sup>	68,31 ± 25,4
CVF (litros) <sup>b</sup>	2,99 ± 0,9
CVF (% previsto) <sup>b</sup>	80 ± 19,4
VEF <sub>1</sub> /CVF <sup>b</sup>	71,68 ± 17,34
Sódio no suor (mEq/L) - Amostra 1 <sup>b</sup>	57,57 ± 27,34
Cloreto no suor (mEq/L) - Amostra 1 <sup>b</sup>	54 ± 26,14
Peso (mg) - Amostra 1 <sup>b</sup>	242,34 ± 85,99
Sódio no suor (mEq/L) – Amostra 2 <sup>b</sup>	57,19 ± 22,12
Cloreto no suor (mEq/L) - Amostra 2 <sup>b</sup>	51,76 ± 23,37
Peso (mg) - Amostra 2 <sup>b</sup>	228,50 ± 95

FC: Fibrose cística; IMC: Índice de massa corporal; VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF: Capacidade vital forçada. <sup>a</sup> Valores expressos em n (%), exceto onde indicado.

<sup>b</sup>Valores expressos em média ± dp

**Tabela 2** – Comparação das características entre os indivíduos com duas mutações identificadas, com uma mutação e sem mutação identificada.<sup>a</sup>

Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	P
	Duas mutações	Uma mutação	Ausência	
	n=4	n=7	n=26	
Sexo				
Masculino	1 (25,0)	0 (0)	8 (30,8)	0,242
Feminino	3 (75,0)	7 (100,0)	18 (69,2)	
Idade, anos <sup>b</sup>	30,8 ± 10,9	30 ± 9,95	33 ± 14,43	0,851
Etnia				
Caucasóide	4 (100)	7 (100)	25 (96,2)	0,805
Não Caucasóide	0 (0)	0 (0)	1 (3,8)	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	22,87 ± 3,7	23,3 ± 2,3	22,2 ± 4,3	0,801
História Familiar de FC	3 (75)	2 (28,6)	11 (42,3)	0,322
Insuficiência Pancreática Exócrina	2 (50,0)	0 (0)	3 (11,5)	0,570
Baqueteamento Digital	0 (0)	0(0)	8 (30,8)	0,115
TTOG				
Intolerância a glicose	0 (0)	2 (28,6)	4 (15,4)	0,624
Diabetes	0 (0)	1 (14,3)	2 (7,7)	
Sinusopatia Crônica	2 (50)	4 (57,1)	7 (26,9)	0,266
Bacteriologia do Escarro				
<i>P. aeruginosa</i>	1 (25,0)	5 (71,4)	10 (38,5)	0,218
<i>P. aeruginosa (mucóides)</i>	1 (25,0)	3 (42,9)	3 (11,5)	
<i>P. aeruginosa (não mucóides)</i>	0 (0)	3 (42,9)	7 (26,9)	
<i>S. aureus</i>	3 (75,0)	3 (42,9)	7 (26,9)	0,154
<i>S. aureus metilina sensível</i>	2 (50,0)	3 (42,9)	7 (26,9)	
<i>S. aureus metilina resistente</i>	1 (25,0)	1 (14,3)	0 (0)	
<i>B. cepacia</i>	0 (0)	0 (0)	2 (7,7)	0,639
<i>H. influenza</i>	0 (0)	1 (14,3)	6 (23,1)	0,516
Escore Shwachman-Kulckzicki <sup>c</sup>	80,0 (32,5)	75,0 (20)	70,0 (31,3)	0,748
Escore Hepático <sup>c</sup>	3,0 (0)	3,0 (0)	3 (0)	0,399
Presença de Bronquiectasias	2 (50,0)	6 (85,7)	19 (73,1)	0,439
VEF <sub>1</sub> (litros) <sup>b</sup>	3,01 ± 0,71	2,44 ± 0,7	2,2 ± 1,13	0,317
VEF <sub>1</sub> (% previsto) <sup>b</sup>	89,72 ± 26,0	72,2 ± 14,7	68,22 ± 29,04	0,338
CVF (litros) <sup>b</sup>	3,7 ± 0,4	3,23 ± 0,5	2,9 ± 1,2	0,359
CVF (% previsto) <sup>b</sup>	95,5 ± 16,13	81,7 ± 6,2	78,5 ± 23,22	0,320
VEF <sub>1</sub> /CVF <sup>b</sup>	80,32 ± 12,5	74,8 ± 14,1	73,7 ± 19,02	0,785
Sódio suor (mEq/L) - Amostra 1 <sup>b</sup>	56,8 ± 20,3	59,14 ± 27,3	56,5 ± 28,0	0,973
	53,8 ± 15,7	61,3 ± 23,10	51,34 ± 27,7	
Cloreto suor (mEq/L) - Amostra 1 <sup>b</sup>	53,33± 10,3	56,4 ± 27,8	58,1 ± 22,2	0,941

Sódio suor (mEq/L) – Amostra 2 <sup>b</sup>	49,7 ± 10,50	52,2 ± 26,0	52,2 ± 24,4	0,985
Cloreto suor (mEq/L) - Amostra 2 <sup>b</sup>				
Resultado teste suor				
Normal	1 (25,0)	1 (14,3)	12 (46,2)	0,306
Limítrofe	2 (50,0)	3 (42,9)	4 (15,4)	
Alterado	1 (25,0)	3 (42,9)	10 (38,5)	

FC: Fibrose cística; IMC: Índice de massa corporal; TTOG: Teste de tolerância oral a glicose; VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF: Capacidade vital forçada. <sup>a</sup>Valores expressos em n (%), exceto onde indicado. <sup>b</sup>Valores expressos em média ± dp. <sup>c</sup>Valores expressos em mediana (amplitude interquartílica). Análise de variância para um fator para variáveis contínuas com distribuição normal ou teste de Kruskal-Wallis (variáveis ordinais ou contínuas sem distribuição normal); teste do qui-quadrado (variáveis categóricas), utilizando, se necessário, correção de Yates ou teste exato de Fisher.

A Tabela 2 compara as características entre indivíduos com duas ou mais mutações identificadas, apenas 1 mutação ou ausência de mutação identificada como causadora de FC. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação ao sexo, idade, etnia e história familiar de FC. A presença de insuficiência pancreática exócrina não diferiu estatisticamente entre os três grupos (2 casos no grupo com duas mutações, nenhum caso no grupos com 1 mutação e 3 casos no grupo sem mutação identificada). O achado de baqueteamento digital, o IMC, a presença de diabetes melito e sinusopatia crônica também não diferiram entre os grupos. Em relação à avaliação microbiológica do escarro, não se identificou diferença significativa entre os grupos para a identificação de *P. aeruginosa*, *S.aureus*, *H. influenza* e *B. cepacia*. Não foi observada diferença significativa entre os grupos para o escore clínico de Shwachman-Kulckzicki), para o escore hepático de Williams nem para a presença de bronquiectasias. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os três grupos para as médias da CVF % do previsto, do VEF<sub>1</sub> em % do previsto e da relação VEF<sub>1</sub>/CVF. As dosagens de sódio e de cloretos no suor não diferiram entre os grupos. O resultado do teste do suor classificado como normal, limítrofe e alterado não diferiu entre os três grupos. No grupo com duas mutações identificadas, foi observado 1 caso com resultado normal, 2 casos com resultados limítrofes e 1 caso alterado. No grupo com uma mutação, foi observado 1 caso com resultado normal, 3 com resultados limítrofes e 3 com resultados alterados. No grupo sem mutação identificada, foram observados 12 casos com resultados normais, 4 limítrofes e 10 alterados.

As mutações identificadas na análise molecular estão descritas na Tabela 3. A mutação p.F508del foi a mais comum, encontrada em 5 pacientes. A associação de p.V232D e p.F508del foi encontrada em 2 pacientes do grupo 1. Foram identificadas 3 mutações no mesmo paciente (p.T351S, p.F508del no primeiro alelo e p.P1290P no segundo). Outras mutações encontradas foram: p.A559T, p.D1152H, p.T1057A, p.I148T, p.V754M, p.P1290P e p.R1066H.

**Tabela 3 – Pacientes com mutações identificadas**

Paciente	Mutações (Classe)	
	Alelo 1	Alelo 2
Grupo 1 (duas ou mais mutações)		
1	p.T351S /p.F508del	p.P1290P
2	p.A559T	p.D1152H
3	p.V232D	p.F508del
4	p.V232D	p.F508del
Grupo 2 (uma mutação)		
5	p.T1057A	
6	p.I148T	
7	p.V754M	
8	p.P1290P	
9	p.F508del	
10	p.F508del	
11	p.R1066H	

## DISCUSSÃO

Este estudo transversal avaliou pacientes com achados fenotípicos compatíveis com FC que foram encaminhados a um ambulatório de referência para adolescentes e adultos com a doença para diagnóstico e tratamento. A análise molecular do gene CFTR contribuiu para o diagnóstico definitivo de FC em 4 casos (10,8%) dentre 37 pacientes em avaliação. Em 7 pacientes (18,9%) foi identificada apenas uma mutação causadora de FC e em 26 pacientes (70,3%) não foram identificadas mutações. Nenhuma característica clínica estudada se associou com o diagnóstico genético. Houve tendência da presença de insuficiência pancreática exócrina ser mais frequente nos casos com diagnóstico genético confirmado, porém não atingiu significância estatística. Dos pacientes com diagnóstico genético, apenas 1 apresentava teste do suor classificado como alterado. Por outro lado, o teste do suor foi alterado em 3 dos 7 casos com uma mutação identificada e em 10 dos 26 casos sem mutação identificada.

As características clínicas e os motivos do encaminhamento incluíram: doença sinusopulmonar crônica, colonização broncopulmonar por germes sugestivos de FC, baqueteamento digital, história familiar positiva para FC, anormalidades gastrointestinais e anormalidades nutricionais<sup>2</sup>. Todos os pacientes já haviam realizado teste do suor em pelo menos duas amostras.

Dentre os 4 casos no presente estudo com diagnóstico genético de FC, um deles pode ser caracterizado como doença clássica leve, pois tinha manifestações tardias da doença e teste do suor alterado; enquanto os outros três podem ser caracterizados como doença atípica, pois tinha eletrólitos do suor com valores limítrofes ou normais.

O desenvolvimento nas técnicas de análise molecular permitiu a identificação de mais de 1900 mutações da CFTR, conforme Banco de Dados de Mutações da FC (*Cystic Fibrosis Mutation Database* – <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). As mutações genéticas têm sido classificadas em seis classes, dividindo-se em graves (I, II e III) e leves (IV, V e VI); baseado no mecanismo molecular alterado<sup>16,17</sup>. Na classe I, a CFTR não é sintetizada; na classe II, ela é inadequadamente processada no retículo endoplasmático; na classe III, ela

é inadequadamente regulada; na classe IV, ela apresenta uma condutância anormal; na classe V, ocorre um defeito de produção e na classe VI ocorre uma degradação acelerada<sup>18,19</sup>. As formas não clássicas da FC têm sido associadas com mutações que reduzem, mas não eliminam a função da proteína CFTR<sup>20</sup>. Em geral, os indivíduos homozigotos para as classes I-III possuem insuficiência pancreática, diabetes, altas taxas de íleo meconial, mortalidade precoce, declínio mais rápido da função pulmonar, maior desnutrição e hepatopatia<sup>16</sup>. Já os pacientes de classe IV e V possuem uma doença mais leve, suficiência pancreática e maior sobrevivência<sup>20,21</sup>.

Mutações no gene da CFTR não são identificadas em 1 a 1,5% dos pacientes com FC clássica. Em casos de FC não clássica, vários fatores são importantes para estabelecer o diagnóstico correto. Nesse estudo, a análise molecular abrangeu a região codificante e as regiões flangeadoras exons/introns. Mutações localizadas em regiões promotoras e em sequências regulatórias distantes não são avaliadas<sup>16</sup>. Entretanto, a frequência de mutações nessas regiões são mais raras e, provavelmente, não explicariam todos os casos da nossa amostra.

A mutação mais frequente é a F508del (ausência do aminoácido fenilalanina na posição 508), porém a frequência difere entre as populações sendo aproximadamente 47% no Brasil<sup>23,24</sup>. Em análise de pacientes brasileiros com FC, Raskin et al mostraram que a F508del e outras quatro mutações (G542X, N1303K, G551D e R553X) representaram 56% dos alelos de FC<sup>25</sup>. O espectro de mutações de FC no Brasil indica forte influência europeia, particularmente similar ao da população italiana<sup>27</sup>. Em estudo prévio do HCPA, a mutação F508del foi encontrada em 48,7% dos alelos<sup>28</sup>.

A sensibilidade da genotipagem para FC depende inteiramente do número de mutações testadas e da etnia dos indivíduos testados<sup>25</sup>. Geralmente a baixa sensibilidade ocorre devido a esse grande número de mutações conhecidas e pela disponibilidade que os painéis comerciais disponíveis só estudam uma minoria dessas mutações<sup>2</sup>. No presente estudo, deve-se considerar o fato de que a população de pacientes foi selecionada pelo encaminhamento de casos com maior dificuldade diagnóstica para um centro de referência para adultos com FC.

McWilliams et al<sup>28</sup> relataram, em 2000, 6 casos de FC com diagnóstico na vida adulta, com doença pulmonar supurativa, função pancreática preservada e todos com apenas uma mutação identificada. Concluíram que o espectro diagnóstico

dos pacientes investigados na vida adulta é diferente daqueles com diagnóstico na infância.

Groman et al<sup>29</sup> publicaram estudo, em 2002, avaliando se as alterações na função da CFTR function são responsáveis por todo o espectro de variantes dos fenótipos de FC. Realizaram análise genética da CFTR em 74 pacientes com fibrose cística não clássica. Vinte e nove pacientes tiveram duas mutações identificadas no gene CFTR, 15 tiveram apenas 1 mutação identificada e 30 não tiveram mutações identificadas. À semelhança de nosso estudo, a comparação das características clínicas e das concentrações do teste do suor não diferiu entre os grupos com duas, uma ou nenhuma mutações. Concluíram que fatores outros que mutações no gene CFTR produzem fenótipos clinicamente indistinguíveis da fibrose cística não clássica causada pela disfunção da CFTR.

Gilljam et al<sup>30</sup> em 2004 publicaram estudo avaliando as características clínicas e parâmetros diagnósticos de pacientes com diagnóstico de FC na vida adulta. Dentre 1051 indivíduos com diagnóstico de FC, 73% (7%) tiveram diagnóstico da doença na vida adulta. Dos 46 pacientes com diagnóstico depois de 1990, o teste do suor pode estabelecer diagnóstico em 30 casos (65%), a análise de mutações em 15 casos (33%) e a combinação dos testes em 31 casos (67%). A medida da diferença do potencial nasal isoladamente confirmou o diagnóstico nos 15 casos remanescentes (33%). Concluíram que os pacientes que se apresentam com a doença na vida adulta geralmente apresentam suficiência pancreática, teste do suor inconclusivo e alta prevalência de mutações que não são evidenciadas na infância.

O presente estudo possui algumas limitações. Primeiro, a principal limitação advém do tamanho amostral pequeno, em especial do número de casos com diagnóstico confirmado, que impede a generalização dos achados na comparação das características clínicas dos três grupos e limita a validade externa. Uma outra limitação é que não foi realizada a técnica de diferença do potencial nasal, pois não dispúnhamos deste método em nossa instituição.

A implicação clínica deste estudo consiste na demonstração da dificuldade diagnóstica enfrentada pelo especialista que avalia esta população de indivíduos

adolescentes e adultos com suspeita clínica de FC. A investigação diagnóstica requer testes diagnósticos adicionais ao teste do suor. O teste do suor não possui especificidade suficiente para descartar a doença neste grupo de pacientes.

Como conclusão, na população de pacientes com achados compatíveis com FC e encaminhados para avaliação em programa de referência para adolescentes e adultos com a doença, a análise molecular da região codificante do gene CFTR contribuiu para o diagnóstico definitivo de FC em 3 casos (8,1%) e possibilitou a identificação das mutações em um paciente com doença leve, já confirmada pelo teste do suor. Pacientes com eletrólitos no suor alterados e sem mutações identificadas, provavelmente possuem alterações ainda desconhecidas. Nenhuma característica clínica se associou com o diagnóstico genético.

## REFERÊNCIAS

1. Boyle MP. Adult cystic fibrosis. JAMA 2007; 298(15):1787-1793.
2. Dalcin PT, Abreu E Silva FA. Cystic fibrosis in adults: diagnostic and therapeutic aspects. J Bras Pneumol 2008; 34(2):107-117.
3. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 2010 Annual Report. Bethesda, Cystic Fibrosis Foundation; 2012.
4. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR et al. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. J Pediatr. 2008 August ; 153(2): S4–S14.
5. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. Pediatrics 1959; 23(3):545-549
6. Chmiel JF, Drumm ML, Konstan MW, Ferkol TW, Kerckmar CM. Pitfall in the use of genotype analysis as the sole diagnostic criterion for cystic fibrosis. Pediatrics.1999;103(4 Pt 1):823-6.
7. Boyle MP. Nonclassic cystic fibrosis and CFTR related diseases. Curr Opin Pulm Med. 2003;9(6): 498-503.
8. Karczeski B, Cutting G. Diagnosis of cystic fibrosis, CFTR-related disease and screening. Prog Respir Res. 2006;34:69-76
9. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. Thorax 2006; 61; 627-635
10. Standards of Medical Care in Diabetes 2012. Diabetes\_Care. 2012 Jan;35 Suppl 1:S11-63.
11. Moran A, Brunzell C, Cohen RC, Katz M, Marshall BC, Onady G et al. CFRD Guidelines Committee. Clinical care guidelines for cystic fibrosis-related diabetes: a position statement of the American Diabetes Association and a

- clinical practice guideline of the Cystic Fibrosis Foundation, endorsed by the Pediatric Endocrine Society. *Diabetes Care* 2010;33:2697–2708
12. Shwachman H, Kulczycki LL. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis; studies made over a five- to fourteen-year period. *AMA J Dis Child* 1958; 96(1):6-15.
  13. Diretrizes para Testes de Função Pulmonar. Sociedade Brasileira de Pneumologia. *J Pneumol* 28 (Supl 3) 2002.
  14. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26(2):319-338.
  15. Williams SG, Evanson JE, Barrett N, Hodson ME, Boulton JE, Westaby D et al. An ultrasound scoring system for the diagnosis of liver disease in cystic fibrosis. *J Hepatol* 1995;22:513–21
  16. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008 (7): 179-196.
  17. Wallis C. Atypical cystic fibrosis – diagnostic and management dilemmas. *J R Soc Med* 2003; 96 (Suppl. 43):2-10
  18. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003; 361(9358):681-689.
  19. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992;256(5058):774-779
  20. Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin PL, Cutting GR. Variant Cystic Fibrosis Phenotypes in the absence of CFTR mutations. *N Engl J Med* 2002, 347 (6): 401-407
  21. McKone EF, Goss CH, Aitken ML. CFTR Genotype as a Predictor of Prognosis in Cystic Fibrosis. *Chest* 2006; 130: 1441-1447
  22. Choo-Kang LR, Zeitlin PL. Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defects and opportunities for therapy. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6(6):521-529.

23. Raskin S, Pereira L, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Valentim L et al. High allelic heterogeneity between Afro-Brazilians and Euro-Brazilians impacts cystic fibrosis genetic testing. *Genet Test* 2003; 7 (3): 213–218.
24. Faucz FR, Souza DA, Olandoski M, Raskin S. et al. CFTR Allelic Heterogeneity in Brazil: Historical and Geographical Perspectives and Implications for Screening and Counseling for Cystic Fibrosis in this Country. *J Hum Genet* 2010 Feb;55(2):71-6
25. Raskin S, Phillips JA, Kaplan G, McClure M, Vnencak-Jones C, Rozov T et al. Geographic heterogeneity of 4 common worldwide cystic fibrosis non-DF508 mutations in Brazil. *Hum Biol* 1999; 71 (1): 111–121
26. Bossi A, Casazza G, Padoan R, Milani S. What is the incidence of cystic fibrosis in Italy? Data from the National Registry (1988-2001). *Hum Biol* 2004; 76 (3): 455–467.
27. Streit C, Burlamaque-Neto AC, de Abreu e Silva F, Giugliani R, Saraiva Pereira ML et al. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Gen Metab.* 2003; 78: 259-64.
28. McWilliams T, Wilsher M, Kolbe J. Cystic Fibrosis diagnosed in adult patients. *N Z Med J*, 200; 113:6-8
29. Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin PL, Cutting GR et al. Variant Cystic Fibrosis Phenotypes in the absence of CFTR mutations. *N Engl J Med* 2002;347:401-7.
30. Gilljam M, Ellis L, Corey M, Zielenski J, Durie P, Tullis DE. Clinical Manifestations of Cystic Fibrosis Among Patients With Diagnosis in Adulthood. *Chest* 2004; 126:1215–1224.

## 8 CONCLUSÕES

### 8.1 PRINCIPAL

Este estudo transversal avaliou pacientes com achados fenotípicos compatíveis com FC que foram encaminhados a um ambulatório de referência para adolescentes e adultos com a doença para diagnóstico e tratamento. A análise molecular do gene CFTR contribuiu para o diagnóstico definitivo de FC em 3 casos (8.1%) dentre 37 pacientes em avaliação. Em 7 pacientes (18,9%) foram identificadas apenas uma mutação causadora de FC e em 26 pacientes (70,3%) não foram identificadas mutações.

### 8.2 SECUNDÁRIA

Nenhuma característica clínica estudada se associou com o diagnóstico genético. Houve uma tendência da presença de insuficiência pancreática exócrina ser mais frequente nos casos com diagnóstico genético confirmado, porém não atingiu significância estatística. Dos pacientes com diagnóstico genético, apenas 1 apresentava teste do suor classificado como alterado. Por outro lado, o teste do suor foi alterado em 3 dos 7 casos com uma mutação identificada e em 10 dos 26 casos sem mutação identificada.

## 9 PERSPECTIVAS

O diagnóstico de FC na adolescência e na vida adulta de casos com doença atípica e doença leve melhorou a partir do desenvolvimento de técnicas de análise molecular genética e do desenvolvimento do potencial nasal (ainda restrito a poucos centros de referência).

Ainda faltam caracterizar melhor as situações em que existem achados fenotípicos da doença, alteração da CFTR (expressa por teste do suor ou potencial nasal alterados) e ausência de mutações conhecidas como causadoras da doença. Da mesma forma, é preciso entender melhor os achados de pacientes com identificação de apenas uma mutação e achados fenotípicos de FC.

O maior conhecimento da gravidade clínica e evolução prognóstica destes casos será importante para definir se o grau de investigação diagnóstica pode interferir nos desfechos prognósticos. Portanto, este é um campo que precisa ser melhor investigado.

## REFERÊNCIAS

1. Boyle MP. Adult cystic fibrosis. JAMA 2007; 298(15):1787-1793.
2. Dalcin PT, Abreu E Silva FA. Cystic fibrosis in adults: diagnostic and therapeutic aspects. J Bras Pneumol 2008; 34(2):107-117.
3. Ratjen FA. Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. Respir Care 2009; 54(5):595-605.
4. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. Lancet 2003; 361(9358):681-689.
5. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. Thorax 2006; 61; 627-635.
6. Wallis C. Atypical cystic fibrosis – diagnostic and management dilemmas. J R Soc Med 2003; 96 (Suppl. 43):2-10
7. Faucz FR, Gimenez J, Ramos MD, et al. Cystic fibrosis in a southern Brazilian population: characteristics of 90% of the alleles. Clin Genet 2007 (72): 218-223.
8. Ribeiro JD, Ribeiro MA, Ribeiro AF. [Controversies in cystic fibrosis--from pediatrician to specialist]. J Pediatr (Rio J ) 2002; 78 Suppl 2:S171-S186.
9. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. Am J Dis Child. 1938;56:344-99.
10. Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA et al. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. Pediatrics 1953; 12(5):549-563.
11. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. Pediatrics 1959; 23(3):545-549
12. Shwachman H, Kulczycki LL. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis; studies made over a five- to fourteen-year period. AMA J Dis Child 1958; 96(1):6-15.

13. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066–73
14. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-1080.
15. Super M. Milestones in Cystic Fibrosis. *Br Med Bull* 1992;48(4):713-37
16. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 2010 Annual Report. Bethesda, Cystic Fibrosis Foundation; 2012.
17. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med* 2007; 28(2):279-288.
18. Farrell P, Roseinstein B, et al. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr*. 2008 August ; 153(2): S4–S14.
19. Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B et al. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest* 2004; 125(1 Suppl):1S-39S.
20. Reis FJC, Damasceno N. Fibrose Cística. *Jornal de Pediatria* 1998; 74(1):76-94.
21. Lemos AC, Matos E, Franco R, Santana P, Santana MA. Fibrose cística em adultos: aspectos clínicos e espirométricos. *J Bras Pneumol*. 2004; 30(1):9-13
22. Raskin S, Pereira-Ferrari L, et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *Cyst Fibros*. 2008 Jan;7(1):15-22.
23. Marostica PJC, Santos JA, Souza OWAS. Estimativa da incidência de fibrose cística em Porto Alegre: análise a partir da frequência da mutação delta F508 em recém-nascidos normais. *Revista da AMRIGS* 1995; 39(3):205-207
24. Alvarez A, Ribeiro AF, et al. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. *J Ped*. 2004; 80(5):371-9
25. Ackerman MJ, Clapham DE. Ion channels--basic science and clinical disease. *N Engl J Med* 1997; 336(22):1575-1586.

26. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 352(19):1992-2001.
27. Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev* 1999; 79(1 Suppl):S3-S22.
28. Castellani C, Cuppens H, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008 (7): 179-196.
29. Gan KH, Veeze HJ, van den Ouweland AM, et al. A cystic fibrosis mutation associated with mild lung disease. *N Engl J Med* 1995;333:95–9
30. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992;256(5058):774-779
31. Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, et al. Variant Cystic Fibrosis Phenotypes in the absence of CFTR mutations. *N Engl J Med* 2002, 347 (6): 401-407
32. McKone EF, Goss CH, Aitken ML. CFTR Genotype as a Predictor of Prognosis in Cystic Fibrosis. *Chest* 2006; 130: 1441-1447
33. Choo-Kang LR, Zeitlin PL. Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defects and opportunities for therapy. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6(6):521-529.
34. Bush A, Alton EFW, Davies JC et al. Cystic Fibrosis in the 21st Century. *Prog Respir Res*. Basel, Karger, 2006, vol 34, pp 122–130.
35. Morrissey BM. Pathogenesis of bronchiectasis. *Clin Chest Med* 2007; 28(2):289-296.
36. Goss CH, Quittner AL. Patient-reported outcomes in cystic fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:378–386.
37. Kerem E, Reisman J, Corey M et al. Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992; 326(18):1187-1191.
38. Mayer-Hamblett N, Rosenfeld M, Emerson J, et al. Developing cystic fibrosis lung transplant referral criteria using predictors of 2-year mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(12 pt 1):1550-1555.

39. Liou TG, Adler FR, Huang D. Use of lung transplantation survival models to refine patient selection in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(9):1053-1059.
40. Lipuma JJ. Update on the *Burkholderia cepacia* complex. *Curr Opin Pulm Med.* 2005;11(6):528-533.
41. Merlo CA, Boyle MP, Diener-West M, et al. incidence and risk factors for multiple antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Chest.* 2007;132(2):562-568.
42. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ Jr, et al. Nontuberculous mycobacteria, I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(6):828-834.
43. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis state of the art: cystic fibrosis foundation consensus conference. *Clin Infect Dis.* 2003;37(suppl 3):S225-S264.
44. Tonelli AR, Fernandez-Bussy S, Lodhi S, et al. Prevalence of pulmonary hypertension in end-stage cystic fibrosis and correlation with survival. *J Heart Lung Transplant.* 2010 Aug;29(8):865-72.
45. Jankelowitz L, Reid KJ, Wolfe L, et al. Cystic fibrosis patients have poor sleep quality despite normal sleep latency and efficiency. *Chest.* 2005 May;127(5):1593-9.
46. Matel JL, Mila CE. Nutrition in Cystic Fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2009 Oct;30(5):579-86
47. Milla CE. Nutrition and lung disease in cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 2007; 28(2):319-330.
48. Blondeau K, Dupont LJ, Mertens V, et al. Gastro-oesophageal reflux and aspiration of gastric contents in adult patients with cystic fibrosis. *Gut.* 2008 Aug;57(8):1049-55.
49. Mousa HM, Woodley FW. Gastroesophageal reflux in cystic fibrosis: current understandings of mechanisms and management. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012 Jun;14(3):226-35.

50. Rowland M, Bourke B. Liver disease in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2011; 17:461–466
51. Dominique Debray D, Kelly D. Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease. *J Cyst Fibros* 2011; 10: S29–S36
52. Colombo C, Battezzati PM, Crosignani A et al. Liver disease in cystic fibrosis: A prospective study on incidence, risk factors, and outcome. *Hepatology* 2002; 36(6):1374-1382.
53. Efrati O, Barak A, Modan-Moses D et al. Liver cirrhosis and portal hypertension in cystic fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15(10):1073-1078.
54. Williams SG, Evanson JE, Barrett N, et al. An ultrasound scoring system for the diagnosis of liver disease in cystic fibrosis. *J Hepatol* 1995;22:513–21
55. Moran A, Brunzell C, Cohen RC, et al. CFRD Guidelines Committee. Clinical care guidelines for cystic fibrosis-related diabetes: a position statement of the American Diabetes Association and a clinical practice guideline of the Cystic Fibrosis Foundation, endorsed by the Pediatric Endocrine Society. *Diabetes Care* 2010;33:2697–2708
56. Milla CE, Billings J, Moran A. Diabetes is associated with dramatically decreased survival in female but not male subjects with cystic fibrosis. *Diabetes Care* 2005; 28:2141–2144
57. Standards of Medical Care in Diabetes 2012. *Diabetes Care*. 2012 Jan;35 Suppl 1:S11-63.
58. Haworth CS. Impact of Cystic Fibrosis in Bone Health. *Curr Opin Pulm Med*. 2010 Nov;16(6):616-22.
59. Paccou J, Zeboulon N, Combescure C et al. The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int* 2010; 86(1):1-7
60. Boyle MP. Update on maintaining bone health in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2006; 12(6):453-458.

61. Conwell LS, Chang AB. Bisphosphonates for osteoporosis in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Apr 18;4:CD002010.
62. Gilljam M, Antoniou M, Shin J, et al. Pregnancy in cystic fibrosis: fetal and maternal outcome. *Chest* 2000;118(1):85-91.
63. Widerman E, Millner L, Sexauer W et al. Health status and sociodemographic characteristics of adults receiving a cystic fibrosis diagnosis after age 18 years. *Chest* 2000; 118(2):427-433.
64. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 1983;301:421–2.
65. Desax MC, Ammann RA, Hammer J, et al. Nanoduct(R) sweat testing for rapid diagnosis in newborns, infants and children with cystic fibrosis *Eur J Pediatr* 2008 Mar;167(3):299-304.
66. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Annual Data Report to the Center Directors. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation; 2005.
67. Wilson DC, Ellis L, Zielenski J, Corey M, Ip WF, Tsui LC, et al. Uncertainty in the diagnosis of cystic fibrosis: possible role of in vivo nasal potential difference measurements. *J Pediatr* 1998;132:596–9.
68. Standaert TA, Boitano L, Emerson J, Milgram LJ, Konstan MW, Hunter J, et al. Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: an outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatr Pulmonol* 2004;37:385–92.
69. Chmiel JF, Drumm ML, Konstan MW, Ferkol TW, Kerckmar CM. Pitfall in the use of genotype analysis as the sole diagnostic criterion for cystic fibrosis. *Pediatrics.*1999;103(4 Pt 1):823-6.
70. Karczeski B, Cutting G. Diagnosis of cystic fibrosis, CFTR-related disease and screening. *Prog Respir Res.* 2006;34:69-76.
71. Boyle MP. Nonclassic cystic fibrosis and CFTR related diseases. *Curr Opin Pulm Med.* 2003;9(6): 498-503.
72. Raskin S, Pereira L, Reis F et al. High allelic heterogeneity between Afro-Brazilians and Euro-Brazilians impacts cystic fibrosis genetic testing. *Genet Test* 2003; 7 (3): 213–218.

73. Raskin S, Phillips JA, Kaplan G et al. Geographic heterogeneity of 4 common worldwide cystic fibrosis non-DF508 mutations in Brazil. *Hum Biol* 1999; 71 (1): 111–121
74. Bossi A, Casazza G, Padoan R et al. What is the incidence of cystic fibrosis in Italy? Data from the National Registry (1988-2001). *Hum Biol* 2004; 76 (3): 455–467.
75. Orenstein BM, Winnie GB, Altman H. Cystic fibrosis: a 2002 update. *J Pediatr* 2002;140:156–64.
76. Goss CH, Rosenfeld M. Update on cystic fibrosis epidemiology. *Curr Opin Pulm Med* 2004;10:510–4.
77. Paranjape SM, Zeitlin PL. Atypical Cystic Fibrosis and CFTR-Related Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008 Dec;35(3):116-23.
78. Kerem E. Atypical CF and CF related diseases. *Paediatr Respir Rev* 2006; 7(Suppl 1):S144–146.
79. Flume P, Taylor L, Anderson D, et al. Transition Programs in Cystic Fibrosis Centers: Perceptions of Team Members. *Pediatr Pulmonol*. 2004; 37:4–7.
80. Faucz FR, Souza DA, Olandoski M, et al. CFTR Allelic Heterogeneity in Brazil: Historical and Geographical Perspectives and Implications for Screening and Counseling for Cystic Fibrosis in this Country. *J Hum Genet*. 2010 Feb;55(2):71-6.
81. Diretrizes para Testes de Função Pulmonar. Sociedade Brasileira de Pneumologia. *J Pneumol* 28 (Supl 3) 2002.
82. Santos C, Ribeiro J, Ribeiro A, et al. Critical analysis of scoring systems used in the assessment of Cystic Fibrosis severity: State of the art. *J Bras Pneumol* 2004; 30(3) 286-298
83. Kanga J, Kuhn R, Craigmyle L, et al. Cystic fibrosis clinical score: a new scoring system to evaluate acute pulmonary exacerbation. *Clin Ther*. 1999;21:1343-56.
84. Feigelson J, Anagnostopoulos C, Poquet M, et al. Liver cirrhosis in cystic fibrosis – therapeutic implications and long term follow up. *Arch Dis Child*. 1993;68:653-7.

85. Colombo C, Apostolo G, Ferrari M, et al. Analysis of risk for the development of liver disease associated with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 1994;124:393-9.
86. Fagundes E, Silva R, Roquete M, et al. Validation of the Williams ultrasound scoring system for the diagnosis of liver disease in cystic fibrosis. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:380-6.
87. Streit C, Burlamaque-Neto AC, Silva FA, et al. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Gen Metab*. 2003; 78: 259-64.
88. Saraiva-Pereira M, Fitarelli-Kiehl M, Sanseverino M. Genetics of cystic fibrosis. *Rev HCPA* 2011;31(2):160-167
89. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16: 1215.
90. Schluchter M, Konstan M, Drumm M, et al. Classifying Severity of Cystic Fibrosis Lung Disease Using Longitudinal Pulmonary Function Data. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 174. pp 780–786, 2006.
91. McWilliams T, Wilsher M, Kolbe J, et al. Cystic Fibrosis diagnosed in adult patients. *N Z Med J*, 200; 113:6-8
92. Groman J, Meyer M, Wilmott R, et al. Variant Cystic Fibrosis Phenotypes in the absence of CFTR mutations. *N Engl J Med* 2002;347:401-7.
93. Gilljam M, Ellis L, Corey M et al. Clinical Manifestations of Cystic Fibrosis Among Patients With Diagnosis in Adulthood. *Chest* 2004; 126:1215–1224.

## **ANEXOS**

Anexo A – Ficha de Coleta de Dados Gerais

Ficha de Coleta de Dados Gerais

1. Número do caso: \_\_\_\_\_
2. Número do registro: \_\_\_\_\_
3. Nome: \_\_\_\_\_
4. Data da avaliação: \_\_/\_\_/\_\_
5. Sexo: (1) masculino; (2) feminino
6. Data de nascimento: \_\_\_\_\_
7. Idade: \_\_\_\_\_ anos
8. Etnia: (1) caucasóide; (2) não-caucasóide
9. Estado civil: (1) solteiro; (2) casado; (3) separado ou divorciado
10. Estudante: (1) sim; (2) não
11. Trabalha: (1) sim, turno integral; (2) sim, meio turno; (3) não
12. Idade do diagnóstico de fibrose cística: \_\_\_\_\_ anos
13. História Familiar de FC ou doença compatível: (1) sim; (2) não  
Se sim, qual? \_\_\_\_\_
14. Baqueteamento digital: (1) sim; (2) não
15. Insuficiência pancreática exócrina: (1) sim; (2) não
16. Diabetes: (1) sim; (2) não
17. Pancreatite crônica: (1) sim; (2) não

18. Doença de via aérea superior / sinusite crônica: (1) sim; (2) não

19. Polipose nasal: (1) sim; (2) não

20. Otite de repetição: (1) sim; (2) não

21. Avaliação nutricional:

a) Peso: \_\_\_\_\_ Kg

b) Altura: \_\_\_\_\_ m

c) Índice de massa corporal (IMC): \_\_\_\_\_ kg/m<sup>2</sup>

(1) Eutróficos      (2) Risco Nutricional      (3) Desnutridos

22. Escore de Shwachman:

a) Atividade geral: \_\_\_\_\_

b) Exame físico: \_\_\_\_\_

c) Nutrição: \_\_\_\_\_

d) Exame radiológico do tórax: \_\_\_\_\_

e) Escore total: \_\_\_\_\_

23. Escore Hepático de Williams:

a) Parênquima Hepático: (1) Normal (2) Intermediário (3) Irregular

b) Borda Hepática: (1) Lisa (2) Intermediária (3) Nodular

c) Fibrose Periportal: (1) ausente (2) moderada (3) acentuada

d) Escore Total: \_\_\_\_\_

24. Bronquiectasias: (1) sim; (2) não

25. Microbiologia do escarro

- a) Pseudomonas cepas mucóides: (1) sim; (2) não
- b) Pseudomonas cepas não mucóides: (1) sim; (2) não
- c) MSSA: (1) sim; (2) não
- d) MRSA: (1) sim; (2) não
- e) B. cepacia: (1) sim; (2) não
- f) Haemophilus: (1) sim; (2) não
- g) Outro: \_\_\_\_\_

26. Espirometria (data): \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

- a) CVF: \_\_\_\_ litros
- b) CVF: \_\_\_\_ % do previsto
- c) VEF<sub>1</sub>: \_\_\_\_ litros
- d) VEF<sub>1</sub>: \_\_\_\_ % do previsto
- e) VEF<sub>1</sub>/CVF: \_\_\_\_

27. Eletrólitos no suor

- a) Amostra 1: Sódio1: \_\_\_\_ Cloreto1: \_\_\_\_ Peso1: \_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
- b) Amostra2: Sódio2: \_\_\_\_ Cloreto2: \_\_\_\_ Peso2: \_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

28. Mutação Gênica

- a) Alelo 1: \_\_\_\_\_
- b) Alelo 2: \_\_\_\_\_

29. Espermograma:

(1) normal (2) alterado

30. Teste Oral de Tolerância à Glicose:

a) TOTG < 100 mg% - normal

b) TOTG entre 100 – 200 mg% - pré-diabete melito

c) TOTG > 200mg% - diabete melito