

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**Diagnóstico Laboratorial da Fibrose
Cística**

Ana Sofia Falcão Espadinha

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2010

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**Diagnóstico Laboratorial da Fibrose
Cística**

Ana Sofia Falcão Espadinha

Tese orientada por Prof. Dr. Rui Pinto

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2010

Agradecimentos

A realização deste trabalho, bem como de todo o percurso académico foi conseguido com a ajuda, companheirismo, generosidade e boa vontade de muitos, por isso não queria deixar passar a oportunidade de agradecer a todos os que de algum modo contribuíram para a sua concretização.

À Dra. Vera Ribeiro pelo esforço.

Ao Dr. Rui Pinto, por se ter disponibilizado a ser meu orientador

À Dra. Isabel Ramalhinho por todo o empenho e dedicação que deu ao curso

A todos os professores de curso que contribuíram para a minha formação académica

À biblioteca do Hospital de São José, que estiveram sempre disponíveis para me ajudar na pesquisa bibliográfica.

À Vera Guita pela ajuda preciosa que me deu para a finalização do trabalho.

Às minhas amigas, em especial, Andreia, Catarina e Inês, um muito obrigado por todos estes anos de companheirismo, amizade e ajuda, que contribuíram para aquilo que hoje sou enquanto pessoa e profissional.

Ao João, pela paciência e compreensão que tem demonstrado e cuja presença foi muito importante ao longo destes anos.

Ao meu irmão, pela sua boa disposição, carinho e ajuda.

À minha mãe, pelo sacrifício destes cinco anos e por tudo aquilo me proporcionou, devo um agradecimento especial e um muito obrigado, pois devo a ela tudo aquilo que sou hoje.

Resumo

Diagnóstico laboratorial da Fibrose Cística

A Fibrose Cística é a doença genética autossómica recessiva letal mais frequente na população Caucasiana, e é devido a uma mutação no gene CFTR. A mutação mais comum é a deleção de uma fenilalanina na posição 508 (Phe508del).

A perspectiva de vida para pacientes com a doença tem aumentado bastante, principalmente devido ao diagnóstico precoce. A medição do IRT na primeira semana de vida possibilita a inclusão nos programas de rastreio e de diagnóstico existentes.

Existe uma grande heterogeneidade de manifestações clínicas na FC. Alguns pacientes podem ter todas as manifestações clássicas da FC desde a infância, enquanto outros têm um fenótipo mais suave ou mesmo uma manifestação atípica da doença.

Pacientes são diagnosticados com FC clássica quando têm uma ou mais características fenotípicas e um teste do suor com um valor em iões cloreto maior que 60 mmol/l ou quando duas mutações no gene CFTR são identificadas. A grande maioria dos pacientes está incluída neste grupo.

Pacientes com FC não-clássica têm uma característica fenotípica em pelo menos um órgão e um teste do suor no limite (40-60 mmol/l) ou normal (menor que 40 mmol/l). Nestes pacientes a confirmação do diagnóstico requer a detecção de pelo menos uma mutação e uma quantificação directa da disfunção CFTR pela diferença de potencial nasal.

Mesmo assim, o diagnóstico da FC pode não ser fácil. Para muitos casos de pacientes atípicos é necessário recorrer a testes auxiliares para a confirmação ou exclusão do diagnóstico.

Palavras-chave: Fibrose cística (FC), regulador de condutância transmembranar de fibrose cística (CFTR), diagnóstico, tripsina imunoreactivo (IRT), teste do suor, diferença de potencial nasal (DPN).

Abstract

Cystic Fibrosis laboratory diagnosis

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disorder affecting Caucasian populations and it is caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, the most common mutation being the deletion of phenylalanine at position 508 (F508del).

The longevity for patients with this disease has increased somewhat significantly, especially due to early diagnosis. The measurement of IRT in the first week of life enables the covering of tracking and diagnosis programmes. The clinical manifestations of CF are quite heterogeneous: some individuals may have all classic features of the disease since their birth, whereas others have a milder phenotype or even an atypical manifestation of CF.

Patients are diagnosed with classic CF when they have one or more phenotypic characteristics and a sweat test revealing >60 mmol/l, or when two mutations in the CFTR gene are clearly identified. The majority of patients match the latter.

Individuals with non-classic CF have a phenotypic characteristic in at least one organ system and a borderline (40–60 mmol/l) or normal (<40 mmol/l) sweat chloride level. In such patients, confirmation of the diagnosis demands detection of at least one mutation and the direct quantification of the CFTR dysfunction by nasal potential difference (NPD) measurement.

All in all and nevertheless, diagnosis of CF may not be easy. In various situations of atypical patients it is necessary to turn to auxiliary tests in order to confirm or run out the diagnosis.

Keywords: Cystic fibrosis (FC), cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), diagnosis, immunoreactive trypsin (IRT), sweat test, nasal potential difference (DPN).

ÍNDICE

I – INTRODUÇÃO.....	1
I.I – Perspectiva Histórica.....	2
I.II – Dados Epidemiológicos.....	4
I.III – Genética da Fibrose Cística.....	5
I.III.I – CFTR: Do gene à proteína.....	5
I.IV – A proteína CFTR: Funções.....	6
I.IV.I – A proteína CFTR funciona como um canal de cloretos.....	6
I.IV.II - O CFTR é mais que um canal de cloretos.....	8
I.IV.III – Classes de mutações e defeitos associados ao canal de cloretos.....	9
I.V – Fisiopatologia.....	12
I.VI – Manifestações clínicas.....	13
II –DIAGNÓSTICO.....	19
II.I – Aspectos gerais.....	20
II.II – Manifestações clínicas compatíveis com o diagnóstico.....	21
II.III – História familiar.....	23
II.IV – Rastreio neonatal.....	23
II.IV.I – Protocolos de rastreio.....	25
II.IV.I .I– IRT/IRT.....	27
II.IV.I.II – IRT/DNA.....	28
II.V – Teste do Suor.....	29
II.V.I – Informação e requisitos dos pacientes.....	31
II.V.II – Estimulação e colheita do suor.....	31
II.V.III – Metodologia.....	32
II.V.IV – Interpretação dos electrólitos no suor.....	33
II.VI – Análise de mutações CFTR.....	34
II.VII – Bioensaios.....	37
II.VII.I – Diferença de potencial nasal.....	37
II.VII.II – Medição da corrente intestinal.....	42
II.VIII – Algoritmos de diagnóstico.....	43
II.VIII.I – Algoritmo que começa com o teste do suor.....	47
II.VIII.II – Algoritmo que começa com o teste DNA.....	49
III – CONCLUSÃO.....	51
IV – BIBLIOGRAFIA.....	53

ÍNDICE de FIGURAS

Figura 1 – Estrutura simétrica do canal CFTR.....	5
Figura 2 – Modelo de activação do canal CFTR.....	7
Figura 3 – Representação esquemática das diferentes classes de mutações CFTR....	9
Figura 4 – Estratégias utilizadas para o rastreio neonatal.....	27
Figura 5 – Medição da DPN numa pessoa saudável e numa com FC.....	41
Figura 6 – Algoritmo de diagnóstico da FC que se inicia com o teste do suor.....	45
Figura 7 – Algoritmo de diagnóstico da FC que se inicia com o teste de DNA do CFTR.....	46

ÍNDICE de TABELAS

Tabela 1 – Patogénese e manifestações clínicas associadas à FC.....	14
Tabela 2 – Manifestações clínicas sugestivas de FC	22
Tabela 3 – Causas de resultados falsos-positivos e falsos-negativos com o teste do suor.....	30
Tabela 4 – Métodos para detecção de mutações no gene CFTR mais frequentes na Europa.....	36
Tabela 5 – Testes auxiliares para avaliação de pacientes atípicos.....	36

Abreviaturas e siglas

ABC – *ATP binding cassette*

ATP – Adenosina trifosfato

AMP – Adenosina monofosfato cíclico

CBAVD - Ausência bilateral congénita dos canais deferentes

CFTR – *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPN – Diferença de potencial nasal

ENaC – Canal de sódio

FC – Fibrose cística

IRT – Tripsina imunoreactiva

MCI – Medição da corrente intestinal

NBDs – Domínios de ligação intracelular

ORCC – Canal de cloro

PKA – Proteína cinase A

R – Domínio de regulação

ROMK2 – Canal de potássio

TMD – Domínio transmembranar

I - INTRODUÇÃO

I.I – Perspectiva Histórica

Foi Landsteiner quem, em 1905, efectuou a primeira descrição anátomo-patológica da fibrose cística (FC) num recém-nascido, que, ao quinto dia de vida, faleceu por íleo meconial, (obstrução no intestino delgado neonatal). Em 1936, Fanconi descreveu o caso de uma criança portadora de doença celíaca com alterações pancreáticas, o que, na sua opinião, era diferente da doença celíaca clássica pois apresentava sintomas pulmonares e intestinais ¹.

A primeira identificação clínica da doença foi elaborada por Andersen, tendo feito observações sobre o carácter familiar e patogénese da infecção recorrente da doença, assim como evidenciou a necessidade de diferenciar a FC do pâncreas da doença celíaca ^{1,2}. Recorrendo a famílias com FC, considerou a existência de uma etiologia genética para a doença ².

Em 1944, Farber desenvolveu uma hipótese, segundo a qual o muco espesso resultava da exacerbação de um estímulo parassimpático e a secreção anómala produzida era responsável pelas lesões pulmonares e pancreáticas, designando o termo “mucoviscosidade”, ainda hoje utilizado ¹.

Em 1948, uma onda de calor em Nova Iorque ajudou o jovem pediatra Paul di Sant’Agnese a descobrir que os pacientes com FC perdiam um excesso de sal no seu suor. Esta descoberta veio pôr de parte a ideia que o defeito básico subjacente a esta patologia estaria ligado ao muco, modificações do muco ou secreções macromoleculares ³. Di Sant’Agnese também desenvolveu a padronização do teste do suor estimulado pela iontoforese com pilocarpina, sendo ainda hoje o padrão para o diagnóstico da doença ¹.

Shwachman e Kulczycki elaboraram, em 1958, um sistema de avaliação da gravidade da doença. Nas décadas seguintes, foram extensas as publicações sobre o tema; porém, só nos anos 80 novos conhecimentos contribuíram para uma melhor percepção da doença ¹.

Em 1982 e 1983, Paul Quinton descobriu a falha no transporte do ião cloreto das células epiteliais nos ductos das glândulas sudoríferas dos pacientes. A investigação sugeria que a baixa permeabilidade do ião cloreto nos ductos sudoríferos dos doentes com FC causava uma baixa reabsorção do cloreto de sódio, produzindo um suor hipertónico. Quinton concluiu

que um defeito generalizado na permeabilidade do íão cloreto estava intimamente associado aos problemas resultantes da doença no pâncreas, intestino e pulmões ¹.

Só em 1985 o gene da FC foi localizado no cromossoma 7, confirmando as bases genéticas da doença. Esta descoberta permitiu avanços consideráveis na área de investigação e diagnóstico da doença ⁴. Recentemente, provas moleculares indicaram a forte probabilidade de a gravidade da doença pulmonar na FC ser determinada por diferentes mutações no mesmo *locus* ⁵.

I.II – Dados Epidemiológicos

A FC é uma doença autossómica recessiva letal, uma das mais comuns que afectam a população Caucasiana ². A FC afecta todas as raças, mas principalmente brancos e atinge igualmente homens e mulheres ⁶. É menos frequente em negros e rara em Asiáticos ¹.

A sua prevalência varia de país para país e de acordo com o grupo étnico. A FC é pouco comum em África e na Ásia. Na Europa, a mutação Phe508del predomina no noroeste e verifica-se a diminuição da sua incidência em direcção ao sudoeste ⁷.

A incidência de FC está bem documentada na Europa: em média, 1 em 2000-3000 recém-nascidos têm a doença^{1,7,8}. Mesmo em populações que aparentam ser relativamente homogéneas, existe uma marcada variação regional. Do mesmo modo, as mutações do gene CFTR têm sido bem caracterizadas na maioria das populações Europeias. Em vários países da Europa Ocidental, as mutações são detectadas em mais de 95% dos genes provenientes de pacientes com FC ⁸.

A região Europeia onde a doença é mais frequente é na Eslovénia (1:3000) e Irlanda (1:1353). A região onde há menos indivíduos afectados é na Finlândia (1:25000). Em Portugal 1 em cada 6000 indivíduos são afectados ^{8,9}.

I.III - Genética da Fibrose Cística

I.III.I - CFTR : do gene à proteína

A FC deve-se a uma mutação no braço longo do cromossoma 7 (7q31)¹⁰. Está em causa um gene que se estende por 250 Kb de DNA genómico e contém 27 exões, representando cerca de 5% do DNA genómico^{10,11}. O gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) codifica uma proteína com 1480 aminoácidos^{11,12}.

Com efeito, o gene CFTR codifica uma proteína que regula o transporte de iões cloreto^{12,13}. Tem uma disposição simétrica, formada por duas estruturas repetidas, em que cada uma contém um domínio transmembranar (TMD), sendo este composto por seis segmentos hidrofóbicos inseridos na membrana celular e por um domínio de ligação intracelular (NBDs). Cada domínio ligação intracelular interage com o ATP (adenosina trifosfato). O canal CFTR é também formado por um domínio de regulação intracelular (R) que é fosforilado pela proteína cinase A (PKA)^{2,3,10}.

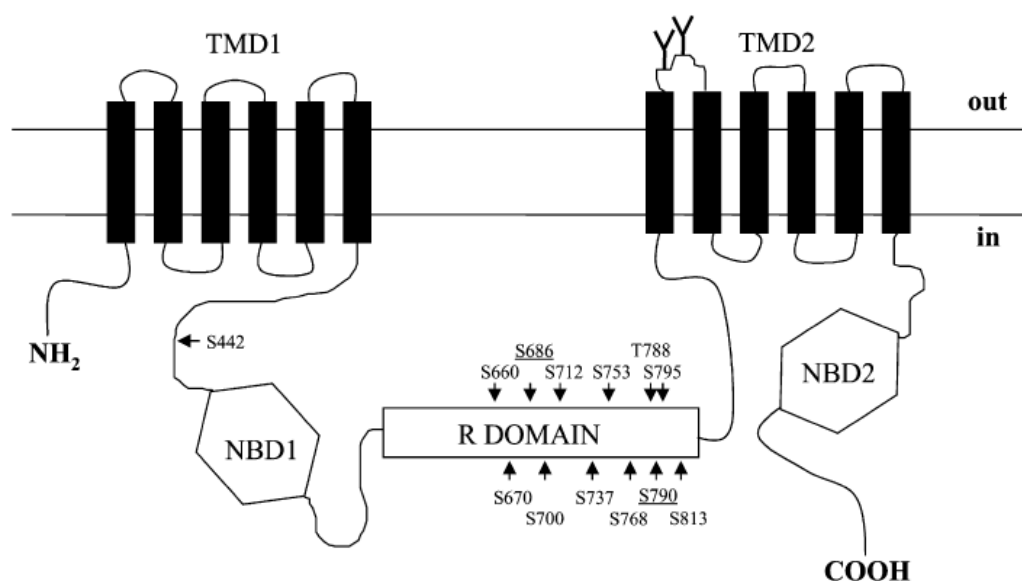


Figura 1 – Estrutura simétrica do canal CFTR. Dois domínios transmembranares (TMD1/2) com seis segmentos transmembranares cada um, dois domínios de ligação a nucleótidos (NBD1/2) e um domínio hidrofílico R intracelular (*Vankeerberghen et al*)¹⁰.

Os domínios NBD1 e NBD2 estão separados por uma região de 241 aminoácidos com vários resíduos carregados e diversos pontos potenciais para a fosforilação pelas cinases proteicas A e C. O designado domínio R, ou região reguladora, está envolvido no controlo da função da proteína e pode ter efeitos de activação ou de inibição^{2,3}. Estas particularidades são características da superfamília de transportadores *ATP-binding cassette*, transportadores ABC, que se encontram em procariotas e eucariotas, sendo responsáveis pela movimentação de pequenas moléculas (fármacos, proteínas, açúcares e iões) através das membranas celulares^{2,11}. No entanto, o domínio R é único para o CFTR^{3,11}. Membros deste grupo de proteínas são muito semelhantes na região hidrofílica, contendo zonas de ligação ao ATP. Portanto, por comparação com esta família de proteínas, foi proposto que o CFTR pode funcionar como um transportador dependente de ATP, possibilitando a exportação de moléculas através da célula².

A localização do CFTR (também chamado ABCC7) *in vivo* com anticorpos confirma que está presente na membrana apical das células de vários órgãos. A inserção de novos pontos de glicosilação-N indica que os 12 segmentos hidrofóbicos atravessam a membrana. Ambos os NBDs se ligam e hidrolisam ATP. Finalmente, a fosforilação de vários resíduos no domínio R pela PKA tem um papel importante na regulação da função do CFTR^{2,3}.

I.IV - A Proteína CFTR: funções

I.IV.I - A proteína CFTR funciona como um canal de cloretos

Embora a estrutura global do CFTR seja semelhante aos transportadores ABC, provas experimentais demonstram que este funciona como um canal de cloretos². A regulação do canal é muito complexa. Múltiplas cinases podem activar o canal CFTR, mas apenas a PKA é descrita com maior detalhe¹⁰.

A activação do canal CFTR inicia-se com a fosforilação do domínio R pela PKA dependente de cAMP. Isto permite a ligação do ATP ao NBD1. Quando o ATP é hidrolisado pelo NBD1, o canal abre e os aniões podem fluir de acordo com o gradiente electroquímico, através do canal formado pelos domínios transmembranares. Quando o domínio R está totalmente fosforilado, o NBD2 pode então ligar-se ao ATP. Este facto estabiliza a abertura

do canal e resulta em aberturas por mais tempo. Quando, numa etapa seguinte, o ATP é hidrolisado no NBD2 e adenosina difosfato (ADP) e fosfato (Pi) são libertados dos dois domínios NBDs, então o canal volta novamente a fechar ¹⁰ (Figura 2). Desde que o domínio R seja fosforilado, os ciclos de ligação e hidrólise de ATP em ambos os domínios de ligação podem continuar e, como consequência, regista-se a abertura e o fecho do canal. No entanto, quando o domínio R é desfosforilado por fosfatases (PP2A e PP2C), os NBDs já não têm a capacidade de se ligar ao ATP e o canal permanece fechado até que o domínio R seja novamente fosforilado pelo PKA ¹⁰.

As experiências realizadas para esclarecer a função dos diferentes domínios e o modo como eles comunicam entre si indicam que o canal de cloretos CFTR é caracterizado por uma regulação bastante complexa e sensível ¹⁰.

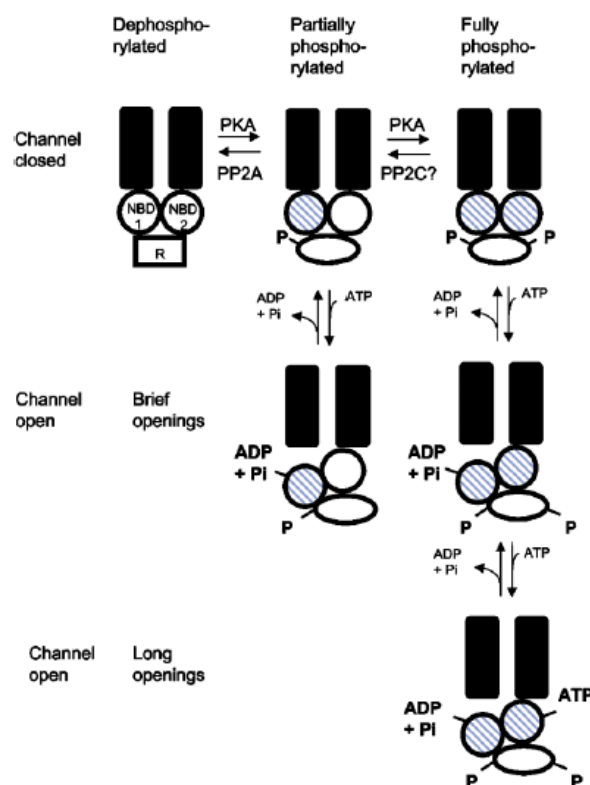


Figura 2 – Modelo de activação do canal CFTR (Vankeerberghen et al) ¹⁰

I.IV.II – O CFTR é mais do que um canal de cloretos

Como consequência do transporte de iões cloreto, a proteína CFTR regula vários canais iónicos, designadamente o canal de cloretos (ORCC), o canal de potássio (ROMK2) e principalmente o canal de sódio (ENaC) ².

O mecanismo pelo qual o CFTR regula o ORCC está constantemente em investigação². Este sofre um mau funcionamento nas células afectadas por CF devido a um defeito na sua regulação pelo PKA ¹⁰. Esta regulação é dependente da presença do NBD1 e do domínio R e parece ocorrer por via da fosforilação do domínio R. Para além disto, o ATP extracelular é necessário para activar o ORCC e certos estudos demonstram mesmo que o ATP extracelular aumenta o tempo em que os ORCCs se encontram abertos nas células epiteliais ^{2,10}. Estas observações foram unificadas num único mecanismo através do qual o CFTR regula o ORCC por meio de um mecanismo autócrino que envolve ATP ².

A relação reguladora entre o CFTR e o canal epitelial de sódio sensível à amilorida é explicada a nível molecular. Em doentes com FC, o cAMP aumenta a actividade de absorção do ENaC por aumentar também a sua probabilidade de abertura ². O aumento da absorção de sódio pelo epitélio respiratório dificulta a hidratação do muco em pacientes com FC ^{2,12}. O mecanismo subjacente à interacção entre CFTR e ENaC não é bem conhecido, embora seja evidente que o primeiro domínio de ligação nucleotídica de CFTR está envolvido ^{2,10}.

A juntar ao funcionamento como canal de cloro e como regulador de canais iónicos separados, várias outras funções são atribuídas ao CFTR. Pensa-se que o CFTR modula a secreção de bicarbonato, tratando-se de uma hipótese atractiva, já que a secreção de bicarbonato é enfraquecida nas células com FC; o CFTR também tem um papel importante na regulação do volume dos canais iónicos e das junções GAP; por último, intervém nos níveis de ATP e condução de solutos e água através da célula, facilitando a acidificação intracelular dos organelos ^{2,10}.

I.IV.III - Classes de mutações e defeitos associados ao canal de cloretos

A FC é o resultado de alterações nos nucleótidos no gene CFTR, que modificam a sua função por diferentes mecanismos, dependendo da sua natureza ou do domínio em que tais alterações ocorrem ¹¹. De acordo com as suas observações, Welsh e Smith dividiram as mutações em quatro classes, porém esta divisão é extremamente simples. No entanto, a análise de fenótipos particulares com determinadas mutações e das propriedades reguladoras do CFTR noutros canais iônicos, fez com que se aumentasse o número de classes para seis, e no futuro possivelmente para mais (Figura 3) ^{3,11}.

Assim, a gravidade da doença varia de acordo com a mutação que o CFTR apresenta e, com efeito, já foram identificadas mais de 1500 mutações e variações na sequência (polimorfismos) de DNA, mas apenas a importância funcional de um pequeno número é conhecida ^{9,6}. Mutações (*missense*, *nonsense*, *frameshift*, *splice*, deleções e inserções) contribuem para o fenótipo pelo seu tipo e posição no gene ¹⁰.

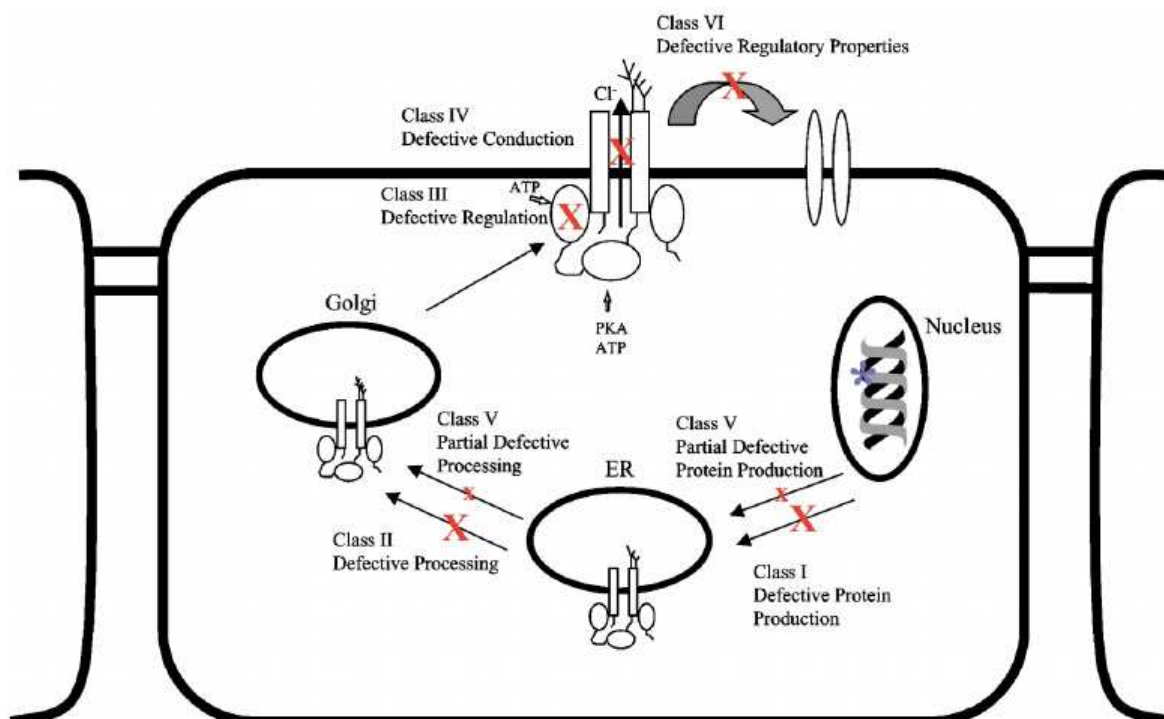


Figura 3 – Representação esquemática das diferentes classes de mutações do gene CFTR.
(Vankeerberghen et al) ¹⁰

Classe I: Síntese de uma proteína não funcional

Esta categoria apresenta principalmente mutações *nonsense*, *frameshift* e *splice*. Estas dão lugar à formação de sinais de terminação prematuros ou de incorrecções no *splicing* e, conseqüentemente, produzem variantes de proteínas truncadas, deletadas ou alongadas ^{10,11}. Estas proteínas tendem a ser instáveis e são rapidamente degradadas e expelidas das células, ou têm pouca ou nenhuma função ¹⁰. É formado um CFTR não funcional, deste modo, espera-se que a classe I cause fenótipos graves ¹¹.

Classe II: Processamento incorrecto

A segunda classe de mutações compreende a maioria das mutações presentes na FC, incluindo uma das mais frequentes, designada por F508del, que está associada à maturação inadequada das proteínas CFTR ¹⁰.

Esta classe apresenta essencialmente mutações *missense*, mas também deleções e inserções ¹¹. As proteínas correspondentes deixam de ser devidamente processadas sob uma forma glicosilada madura e tendem a não aparecer na membrana apical. É de destacar que algumas das mutações da classe II, se forem correctamente processadas, detêm uma actividade residual no canal de cloro, podendo conduzir a um fenótipo mais suave. Por este motivo, as mutações deste grupo são potenciais alvos de terapias, visando a correcção do processamento e a entrada de uma proteína CFTR alterada na membrana apical ¹¹.

Classe III: Regulação incorrecta

A actividade do CFTR é regulada pela fosforilação do domínio R e ligação do ATP aos dois domínios de ligação. As mutações que interferem com este processo são integradas na classe III ¹⁰.

As mutações desta classe afectam a regulação da função do CFTR, impedindo a ligação do ATP e a hidrólise do NBD1 e NBD2, necessários para a activação do canal. As alterações do NBD1, como a mutação *missense* G551D, podem ainda evitar a regulação dos outros canais associados CFTR ¹¹.

Classe IV: Diminuição da condutância

A quarta classe de mutações envolve os aminoácidos localizados no domínio da extensão da membrana, que está implicada na formação do poro do canal e que resulta num canal CFTR com propriedades de condutividade anormais. Demonstrou-se que as mutações *missense* R117H, R334W e R347P formam um canal de cloro com uma fosforilação normal e regulação dependente de ATP, porém com correntes reduzidas de canal único. Os alelos nesta classe são habitualmente associados a um fenótipo clínico mais leve ¹¹.

Classe V: Síntese reduzida

Apontam-se diversas mutações associadas à biossíntese reduzida do CFTR activo, devido ao *splicing* parcialmente incorrecto, a mutações do promotor ou ao *trafficking* ineficaz. Estas mutações têm como resultado quantidades reduzidas de produtos de genes funcionais e, desta forma, originam fenótipos de FC menos graves ¹¹.

Classe VI: Estabilidade diminuída

Nesta classe, as mutações *nonsense* e *frameshift* (como exemplo, as Q1412X, 4326delTC e 4279insA), que causam um truncamento do terminal-C do CFTR, conduzem a uma instabilidade acentuada de uma variante que, de outro modo, seria totalmente processada e funcional; consequência disto é a manifestação grave de FC ¹¹.

Em suma, esta classificação atribui categorias às mutações de CFTR segundo os seus mecanismos moleculares e respectivas consequências, permitindo ainda a associação de uma mutação com mais do que uma classe. Contudo, o potencial da mutação para contribuir para o fenótipo depende não só do seu tipo, localização no gene e mecanismos moleculares, incluindo o efeito molecular em rede, mas também da sua interacção com a segunda mutação e com moduladores intragénicos, e ainda das modificações originadas por factores epigenéticos e ambientais ^{2,11}.

As mutações de CFTR são classificadas como severas ou moderadas, dependendo do efeito na proteína funcional e do efeito clínico. Geralmente, mutações severas resultam na

ausência de síntese ou bloqueio do processamento (Classes I, II e III), enquanto que mutações suaves alteram a condução ou redução da síntese (Classes IV, V e VI) ².

A mutação mais comum na FC é a deleção de uma fenilalanina na posição 508 ($\Delta F508$), que se encontra no primeiro domínio de ligação nucleotídica. É uma mutação da classe II, presente em cerca de dois terços dos alelos mutantes encontrados no norte da Europa e na América do Norte ^{7,10}.

Já no que respeita às mutações das classes de I-III, a insuficiência pancreática está-lhes intimamente ligada. Todavia, a variabilidade genética e o ambiente tornam fracas as associações entre fenótipo e genótipo, especialmente para o caso da doença pulmonar ⁷.

I.V – Fisiopatologia

A fisiopatologia subjacente envolve um transporte anómalo de iões cloreto e sódio, devido à disfunção do gene CFTR. Ocorre uma variação no movimento de água e sal através do epitélio, que vai alterar a hidratação e composição iónica das secreções de muco. Este muco anormal produzido pelas glândulas exócrinas, compromete o funcionamento de vários sistemas, levando à inflamação e destruição dos pulmões, do pâncreas, intestino, vasos deferentes ^{2,3}.

Em geral, as mutações no CFTR resultam numa proteína não funcional, e quando assim é, a actividade de ENaC intensifica-se, aumentando também o transporte de sódio através da membrana. No intestino e nos pulmões, isto promove um aumento da recaptção de água para o lúmen, deixando camadas mucosas sem hidratação. Na glândula sudorífera, uma anomalia no transporte de cloreto impede a recaptção do mesmo no ducto sudorífero, propiciando um aumento dos níveis de NaCl no suor ¹³.

O perfil clínico da FC é resultado, por um lado, de uma alteração nas glândulas exócrinas e, por outro, de uma susceptibilidade para a infecção respiratória. Trata-se de uma doença epitelial, sabendo que os órgãos do epitélio se desenvolvem em resposta a uma interacção com as células mesenquimais, a ponto de a FC poder ocorrer devido a um defeito mesenquimal. Não obstante, as glândulas epiteliais têm, inicialmente, uma estrutura normal, ocorrendo no decurso da doença uma ruptura na glândula, como resultado de uma secreção

deficitária. As glândulas epiteliais são estruturas acinares-ductais. Com o progresso da doença, surgem alterações nas secreções, as quais aumentam a sua viscosidade, levando à obstrução dos ductos e aos danos estruturais⁵.

Embora a FC seja uma doença multissistémica, as complicações pulmonares são a maior causa de morbidade e mortalidade nesta patologia (mais de 90% dos pacientes morrem devido a esta causa)³. Esta susceptibilidade para a infecção não pode ser explicada por qualquer defeito na função imunitária; ambas as células B e T são normais. Há, no entanto, algumas conjecturas sobre o papel dos macrófagos alveolares. Um defeito na sua função poderia explicar quer a ocorrência, quer o local da infecção, uma vez que tem um papel importante na manutenção da esterilidade do trato respiratório inferior⁵.

I.VI - Manifestações Clínicas

A Fibrose Cística é definida como uma doença monogénica autossómica recessiva que se apresenta como uma doença multissistémica^{2,12}. É a mais comum das doenças autossómicas recessivas que diminui a esperança de vida na raça branca, sendo uma causa importante de morte na criança, adolescente e adulto jovem nessa população¹⁴. A doença é originalmente descrita como uma tríade: doença pulmonar obstrutiva crónica, insuficiência exócrina pancreática e aumento das concentrações em iões cloreto e sódio no suor^{3,6}.

Manifestações da FC são muito diferentes entre pacientes, mesmo para irmãos com um genótipo CFTR semelhante, o que pode ser explicado devido aos polimorfismos em outros genes não CFTR^{7,14}.

Os sintomas da FC vão-se manifestando ao longo de toda a vida, com uma grande sobreposição e variabilidade de sintomas. A tabela que se segue documenta a idade de início de algumas das maiores complicações clínicas da doença.

Tabela 1 – Patogénese e manifestações clínicas associadas à Fibrose Cística

Órgão	Patogénese	Manifestações clínicas	Idade habitual de início
Pulmão	Inflamação/Infecção/obstrução	Bronquiectasias Bronquite Pneumonia Pneumotórax Hemoptises	Em todas as idades Em todas as idades Em todas as idades 2ª infância 2ª infância
Vias aéreas superiores	Inflamação/Infecção/obstrução	Sinusite Pólipos Nasais	Em todas as idades Em todas as idades
Intestino	Obstrução/Fibrose	Íleo meconial Invaginação Edema hipoalbuminemia Prolapso rectal	Nascimento Em todas as idades Em todas as idades 1ª infância
Pâncreas	Obstrução/Fibrose	Malabsorção Diabetes	Geralmente lactente > adolescência
Fígado	Obstrução/Fibrose	Icterícia neonatal “Cirrose subclínica”	Lactente Em todas as idades
Vesícula e Vias biliares	Obstrução	Microvesícula Biliar Obstrução do ducto Cístico Colestase extrahepática	Em todas as idades Em todas as idades Em todas as idades
Órgãos Reprodutivos	Obliteração do canal deferente Secreções vaginais espessas Hidrocelo/Hérnea	Esterilidade/azoospermia Diminuição da fertilidade	Ao nascimento 2ª infância Em todas as idades
Glândulas Sudoríferas	Alterações dos electrólitos	Perda de sal Prostração pelo calor	Em todas as idades Em todas as idades
Glândulas Salivares	Alterações dos electrólitos		Em todas as idades
Retina	Hipóxia/Retinopatia exudativa	Distúrbios visuais	Em todas as idades
Ouvidos	Obstrução do ouvido médio – faringe	Perda auditiva condutiva	Em todas as idades
Coração	Hipóxia, Anastomose broncopulmonar	Cor Pulmonale Fibrose	Em todas as idades Em todas as idades
Ossos e extremidades		Osteartropatia hipertrófica “Clubbing”	Em todas as idades Em todas as idades

Adaptado de Fonseca e Cernadas¹⁴

Insuficiência Pancreática

A insuficiência pancreática é um dado verificado em 90% dos pacientes com FC. Em 15-20% dos casos não existe nenhuma alteração a nível pancreático na ocasião do diagnóstico; noutros casos, o grau de gravidade varia largamente ⁵.

O defeito inicial é a falha na produção de bicarbonato e água. As enzimas pancreáticas continuam a ser segregadas, mas as secreções daí resultantes tornam-se cada vez mais viscosas até bloquearem os ductos ⁵. Ora, a ausência de secreções pancreáticas no lúmen do intestino superior origina malabsorção e, por outro lado, com água e bicarbonato insuficientes, as enzimas digestivas ficam retidas nos ductos do pâncreas e prematuramente activadas, conduzindo, por último, à destruição do tecido e à fibrose ¹².

Quando um certo número de células deixa de funcionar, o paciente produz pouca insulina e torna-se intolerante aos hidratos de carbono, podendo existir também resistência à insulina. A diabetes que se desenvolve nos doentes com FC não é a típica diabetes tipo I e II. Vários factores únicos da FC, incluindo o aumento da energia dispendida, infecções agudas e crónicas, deficiência em glucagon, podem levar ao desenvolvimento de diabetes ².

Ductos Biliares e Fígado

A perturbação inicial no fígado é a acumulação excessiva de muco nos ductos biliares, que se dilatam e proliferam ^{5,7}. O CFTR está expresso nas células do tracto biliar e pelo menos um terço dos pacientes apresentam resultados anormais nos testes de função hepática. A infiltração de gorduras é um dado que atinge até 70% dos pacientes idosos, e em menos de 10% destes a situação progride para cirrose biliar ¹². Logo, os danos hepatocelulares não são uma característica significativa e, como tal, a avaliação das enzimas e outros testes de função hepática não ajudam para o seguimento do progresso da FC. A icterícia é pouco comum, ocorre numa fase mais avançada da doença ⁵.

Sistema Reprodutor

Neste âmbito, é de destacar que cerca de 97% dos homens com FC são inférteis. A base anatómica é uma ausência bilateral dos vasos deferentes ou uma atrofia do epidídimo, vasos deferentes e vesículas seminais; a aspermia é acompanhada pela redução do volume de sémen, pelo que os pacientes não são, efectivamente, impotentes ^{5,7}.

No que respeita às mulheres, é comum a verificação da menarca tardia e a fertilidade é notoriamente reduzida devido à viscosidade anómala do muco cervical ^{5,12}.

Doença Pulmonar

Num quadro de FC, os pulmões estão particularmente susceptíveis de desenvolver infecção, que tanto pode ser causada por bactérias patogénicas como por outros organismos que não se comportam como patogénicos em indivíduos saudáveis ⁵. Juntamente com o agravamento da infecção, é registada uma alteração na secreção de muco que é originado pela presença da infecção e, simultaneamente, aumenta a susceptibilidade de mais infecções, pela interferência que tem na drenagem dos pulmões. Este estado da patologia dos pulmões coloca em causa a qualidade de vida do paciente, sendo a infecção respiratória a causa de morte mais comum ^{2,3}.

No momento do nascimento, os pulmões são estruturalmente normais. Por razões desconhecidas, mas provavelmente devido a um defeito da função dos macrófagos alveolares, as vias aéreas periféricas ficam infectadas ⁵. Tipicamente, crianças com FC são rapidamente colonizadas por *Haemophilus influenzae* ou *S. aureus*, ou ambos. Dentro de um curto período de tempo, *P. aeruginosa* torna-se o organismo predominante encontrado nas vias aéreas ⁷.

As vias aéreas dos pacientes com FC conduzem ao crescimento do *P. aeruginosa* por várias razões: um microambiente permissivo dentro das zonas de hipoxia, aderentes às placas de muco; um aumento da ligação bacteriana ao epitélio; e a diminuição da eliminação bacteriana devido a mecanismos de defesa inactivos ^{2,7}.

Como reacção à presença de infecção, existe uma hipertrofia dos tecidos secretores de muco nas vias respiratórias. Na mucosa respiratória aumenta a proporção de células de Goblet

e estas são mais encontradas nas pequenas vias aéreas do que no pulmão normal ⁷. Assim, a presença de um excesso de muco predispõe para mais infecções: a doença começa com bronquiolites, evoluindo para bronquites crónicas e bronquiectasias ^{3,7}.

Em suma, a disfunção respiratória é o resultado da obstrução das vias aéreas: a capacidade vital é reduzida, enquanto que o volume residual e a capacidade funcional residual aumentam ^{2,7}.

Outros organismos patogénicos podem estar presentes na doença, como *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *B cepacia*, *Aspergillus fumigatus* ^{1,4}.

Sistema gastrointestinal

Cerca de 15% das crianças com FC nascem com íleo meconial, uma obstrução secundária ao material do intestino grosso e delgado. 85-90% das crianças com FC desenvolvem insuficiência pancreática, a qual pode já estar presente no momento do nascimento ou desenvolve-se no primeiro ano de vida. Os principais sintomas de insuficiência pancreática são: fezes gordurosas, flatulências, inchaço abdominal, pouco ganho de peso. A insuficiência pancreática leva a esteatorreia, que pode originar perda em vitaminas lipossolúveis e malnutrição ².

Inicialmente, quando a FC foi descoberta, os doentes viviam apenas alguns meses, pois morriam de malnutrição. Com a introdução da terapêutica de substituição enzimática pancreática, a malnutrição começou a ser controlável; no entanto, a ingestão calórica adequada e a correcção das deficiências em vitaminas lipossolúveis são essenciais para controlar a doença ⁷.

O espessamento das secreções intestinais, a malabsorção e a motilidade intestinal reduzida podem levar à obstrução intestinal ou constipação crónica nos pacientes idosos. A fraca absorção de vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) pode levar a anemia, acrodermatites, neuropatia, cegueira nocturna, osteoporose e desordens hemorrágicas ^{5,7}.

O prolapso rectal é uma das complicações que não têm tratamento na FC surgida nos primeiros 2 a 3 anos de vida. Isto é devido a um conjunto de factores, dos quais, diarreia, tosse e diminuição isquiorectal de gorduras resultantes da má nutrição ⁵.

Glândulas Sudoríferas

Como é o caso noutras glândulas serosas, a glândula sudorífera em doentes com FC é estruturalmente normal e a taxa de transpiração também é normal, embora variável. Para taxas de transpiração baixas, as concentrações de sódio e cloreto têm valores normais. Para taxas de transpiração elevadas originadas pelo calor, exercício físico ou estimulação por pilocarpina, as concentrações de cloreto e sódio tornam-se anormalmente altas. Isto ocorre devido a um defeito na absorção destes iões para o fluido segregado pela base da glândula enquanto passa através do ducto ^{2,5}.

II - DIAGNÓSTICO

II.I – Aspectos Gerais

Embora mais de 80% dos pacientes diagnosticados tenham menos de três anos, cerca de 10% têm 18 ou mais anos quando a doença é diagnosticada⁵. O diagnóstico da FC nunca foi simples. Convencionou-se que se trata de uma entidade clínica separada, há mais de 50 anos, mas as suas características não foram claramente diferenciadas de outras causas de malabsorção e falha no crescimento^{2,15}. No final de 1950, com o desenvolvimento do teste do suor, várias dúvidas relacionadas com o diagnóstico encontraram respostas^{2,3,15}. Nos dias de hoje, este teste mantém-se clinicamente viável, muito embora lhe sejam reconhecidos resultados falsos-negativos e falsos-positivos^{3,15}.

No fim de 1960, a descoberta de que muitos dos pacientes do sexo masculino tinham problemas congénitos ao nível do sistema reprodutor facilitou o diagnóstico dos pacientes que apresentavam um teste do suor cujos valores eram no limite da gama considerada normal².

Com a clonagem do gene CFTR, em 1989, entrou-se numa nova era, existindo a expectativa de que o teste genético seria mais sensível e específico, dando uma nova dimensão ao diagnóstico da FC^{3,11}. Essas descobertas propuseram a revisão dos critérios de diagnóstico, passando a ter em consideração a doença ao seu nível molecular^{2,15}. Com a descoberta do gene CFTR e de técnicas de laboratório para detectar as suas mutações, o diagnóstico da doença tornou-se mais fácil e expandiu enormemente o espectro clínico da doença de modo a incluir apresentações mais suaves ou atípicas³. No entanto, a determinação de íões cloreto no suor continua a ser o “padrão de ouro” para a avaliação da função do CFTR^{2,12}.

As três principais situações que levam a entrar num programa de diagnóstico da FC são as seguintes: rastreio neonatal positivo, uma ou mais manifestações clínicas e a presença de história familiar^{16,17,18}.

II.II - Manifestações clínicas compatíveis com o diagnóstico

Muitas manifestações clínicas são compatíveis com o diagnóstico de FC pois esta doença, que afecta vários órgãos, é bastante heterogénea e por vezes tem uma apresentação clínica atípica. Em pacientes com um padrão clínico típico, os testes de diagnóstico são necessários, principalmente para confirmar o diagnóstico. Para pacientes com sintomas menos graves, atípicos ou com manifestações clínicas num único órgão, os testes de diagnóstico são necessários para confirmar ou despistar o diagnóstico de FC, ou ainda apoiar uma alternativa de diagnóstico¹⁶.

Algumas características fenotípicas são, de facto, altamente sugestivas para a FC (Tabela 2, coluna da esquerda) e devem sempre levar a uma investigação mais aprofundada. Se as investigações iniciais, tais como o teste do suor e o teste genético, não confirmarem o diagnóstico, e caso não seja encontrada uma alternativa de diagnóstico, a progressão do trabalho é justificada. Sempre que os sintomas sejam causados pela FC, é importante que o diagnóstico precoce seja feito¹⁶.

Outras características são menos específicas da FC, pois estão também associadas a outras condições médicas, a saber a imunodeficiência humoral e a discinesia ciliar primária (Tabela 2, coluna da direita). Outros testes mais específicos podem ser desenvolvidos para uma definição mais precisa do padrão clínico do doente, designadamente: radiografia ao tórax, teste à função pulmonar, cultura de saliva, determinação da quimiotripsina ou elastase fecal e o espermograma, testes da função exócrina pancreática, bacteriologia respiratória e avaliação urogenital^{1 e 16}.

A FC é, na maioria das vezes, um diagnóstico clínico. No entanto, num programa de rastreio neonatal, o diagnóstico pode ser feito antes de ser apresentado qualquer sintoma. É pouco provável que uma situação similar possa ocorrer em adolescentes ou adultos¹⁶.

Tabela 2 – Manifestações clínicas sugestivas de FC

Muito sugestivas	Sugestivas mas menos específicas
Manifestações Gastrointestinais	Manifestações Gastrointestinais
<ul style="list-style-type: none"> · Íleo Meconial · Insuficiência exócrina pancreática em crianças 	<ul style="list-style-type: none"> · Falha no crescimento · Hipoproteinemia · Deficiência em vitaminas lipossolúveis · Obstrução intestinal distal · Prolapso rectal · Cirrose biliar · Hipertensão portal · Colelitíase em crianças sem desordem hemolítica · Insuficiência pancreática exócrina em adultos · Pancreatite recorrente · Colangite esclerosante primária
Manifestações Sino - Pulmonares	Manifestações Sino – Pulmonares
<ul style="list-style-type: none"> · Infecção respiratória persistente por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> · Bronquiectasias em ambos os lobos superiores · Infecção respiratória persistente por <i>Burkholderia cepacia</i> · Pólipos nasais em crianças 	<ul style="list-style-type: none"> · Infecções respiratórias persistentes ou recorrentes com <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Archomobacter xlosoxidans</i> ou <i>Haemophilus influenza</i> · Evidências radiológicas de bronquiectasias, atelectasia, hiperinfiltração ou infiltrados persistentes na radiografia ao peito · Hemoptise associada com doença pulmonar difusa, outras que não tuberculoses ou vasculite · Pólipos nasais em adultos · Evidências radiológicas de pansinusite crônica
Outras	Outras
<ul style="list-style-type: none"> · Alcalose hipocloremica na ausência de vômito · CBAVD 	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Clubbing</i> · Osteopenia/osteoporose < 40 anos · Diabetes atípica

Adaptado de De Boeck et al¹⁶

II.III - História Familiar

Ambos os pais têm que ser portadores para que a criança seja afectada e, ainda assim, a probabilidade de a criança ter problemas é de um para quatro. Numa família com historial de FC, a probabilidade de se ter um gene da doença é mais elevada, independente do grupo étnico ¹⁹.

Recomenda-se vivamente que os irmãos de crianças afectadas sejam investigados, realizando-se o teste do suor. Devido à notória heterogeneidade clínica da doença, mesmo dentro da mesma família, a ausência de sintomas não é suficiente para excluir o diagnóstico de FC ¹⁶.

II.IV - Rastreio neonatal

Todos os programas de rastreio têm o objectivo de maximizar o diagnóstico da FC e minimizar as manifestações clínicas ²⁰. O rastreio neonatal representa a procura de um distúrbio numa população geral de recém-nascidos. O objectivo pode ser o de melhorar a saúde da criança afectada, a fim de prestar aconselhamento ou para a investigação futura ²¹. Para além de se considerarem a fiabilidade técnica e a validade dos métodos de triagem neonatal, é fundamental que todos os outros aspectos do rastreio (incluindo aspectos médicos, éticos, psico-sociais e económicos), sejam rigorosamente examinados antes de pôr em prática a triagem ²¹.

O rastreio da FC foi uma questão que gerou alguma controvérsia. O ponto-chave neste tema era se o diagnóstico precoce ia ter resultados para os pacientes e se o grau de melhoria compensaria o custo inerente aos testes de rastreio. Estes factores foram importantes para a elaboração de um teste menos dispendioso e confiável, com níveis aceitáveis de especificidade e sensibilidade. A sensibilidade e a especificidade dos testes utilizados dependem da concentração que é usada para determinar um resultado anómalo ².

A primeira experiência Europeia de rastreio neonatal da FC data do início dos anos 70, com programas pioneiros que examinavam a albumina contida no mecónio em recém-nascidos ²⁰.

O aumento da tripsina imunoreactiva (IRT) no sangue dos recém-nascidos com FC e a sua determinação em manchas de sangue seco foram inicialmente descritos anos mais tarde, em 1979, com o desenvolvimento do radioimunoensaio para a tripsina imunoreactiva ^{10, 20, 22}.

Os protocolos de rastreio estão assentes no princípio de que crianças com FC, com uma função pancreática normal, têm níveis elevados de tripsina (enzima digestiva) no sangue na primeira semana de vida ^{18,21,23}. Tal facto reflecte-se na saída de secreções pancreáticas para o fluxo sanguíneo durante a vida fetal, devido à obstrução dos ductos pancreáticos ²⁴. A diminuição da função do CFTR poderia também resultar numa anomalia pancreática moderada, levando ao aumento do IRT ²⁴.

Foi possível uma melhoria no processo de rastreio após a clonagem do gene CFTR e a posterior identificação de mutações genéticas comuns, que permitem a inclusão dos testes de DNA nos programas de rastreio ^{11,20,25}. Desde então, o rastreio tem sido gradualmente estabelecido em toda a Europa, de início lentamente, mas mais recentemente a um ritmo maior ¹⁰. O efeito do rastreio da FC tem sido amplamente estudado e debatido. São claros os benefícios, particularmente no que diz respeito a uma melhor nutrição e função pulmonar, aumento da esperança média de vida e diminuição dos internamentos ^{20, 26}.

A presença de níveis elevados de IRT em recém-nascidos indica que é necessário um segundo teste, que confirme o resultado positivo ou negativo do teste de rastreio ^{23, 27}. Uma ampla variedade de condições fisiológicas ou médicas estão relacionadas com o aumento de IRT no período neonatal. Nas trissomias 13 e 18 ocorre, igualmente, um aumento de IRT. O stress perinatal também é um factor significativo para o aumento de IRT ^{2,20}. Esse aumento está ainda associado a infecções congénitas, falha renal, atresia intestinal ou a casos de diabetes ²⁰. Em contraste, crianças com a FC e íleo meconial têm valores iniciais de IRT baixos, podendo levar a um resultado falso-negativo ²⁷.

II.IV.I - Protocolos de rastreio

Os protocolos actuais utilizam o IRT como primeiro nível e o teste do suor para confirmar ou excluir o diagnóstico (Figura 4) ^{20,28}. O teste do suor foi desenvolvido em crianças com uma mutação CFTR ou com um segundo IRT acima do valor de *cutoff* ²⁹.

Um dos problemas relacionados com a utilização dos ensaios de IRT é a falta de consenso relativamente ao valor normal. O número de falsos negativos depende do valor limite escolhido. Se o valor limite de IRT for elevado, existe um elevado risco de ocorrerem resultados falsos negativos. Pelo contrário com um valor limite demasiado baixo, maior é o risco de existirem falsos positivos ²⁴.

A medição de IRT na primeira semana de vida é necessária para incorporar nos programas de rastreio existentes ²⁵. No entanto, a IRT não é um teste específico para a FC, sendo necessário realizar testes intermédios, evitando o encaminhamento desnecessário para níveis de diagnóstico superiores ²⁵. Níveis intermédios são necessários para alcançar uma combinação aceitável de sensibilidade e especificidade. Estes níveis podem consistir na análise da estrutura do gene CFTR na primeira amostra de sangue, um novo teste IRT noutra amostra de sangue colhida mais tarde, ou várias combinações destas duas técnicas ^{20,27}. Devido à natureza heterogénea da doença significa que nunca haverá um protocolo de rastreio perfeito ²⁵.

A idade com que a amostra de sangue é colhida mostra ter um efeito directo na efectividade do rastreio. Em alguns dos programas, a amostra é colhida no primeiro dia e demonstra resultados razoáveis, ao quinto dia já é considerado relativamente tardio ^{19,20}.

A IRT nas manchas de sangue seco é estável por um curto período de tempo. Quando armazenadas 10 semanas numa sala escura e com uma temperatura ótima de conservação, as amostras de sangue de bebés saudáveis perdem cerca de dois terços do IRT ²⁰.

Estão a ser desenvolvidos estudos com amostras conservadas a uma temperatura de +4º; após 4 meses, as amostras de bebés sem FC perdem aproximadamente 25% e após 8 meses 45% da sua actividade ²⁰.

Visto que os valores normais de referência IRT variam ligeiramente, os programas individuais de rastreio no laboratório em que o recém-nascido está a ser testado definem um *cutoff* específico que vai determinar quando é que o IRT está elevado ¹⁷. Os valores de *cutoff* são criados numa tentativa de maximizar a sensibilidade e o valor preditivo positivo e reduzir os valores falso-negativos ²⁸. Flutuantes, ao invés de fixos, os valores de *cutoff* para a análise de IRT em qualquer protocolo de rastreio da FC são geralmente ajustáveis em função das variações sazonais e do lote do reagente utilizado ²⁸.

Vários resultados em estudos Europeus demonstram a prática variada de testes de rastreio, com os protocolos que vão desde um teste do suor após um aumento na IRT até àqueles que envolvem três ou quatro séries de testes. Estas variabilidades e complexidades reflectem um conjunto de questões, tais como: a complexidade do programa de rastreio para a FC, aspectos geográficos e circunstâncias locais ²⁵.

As duas estratégias de rastreio mais utilizadas são as seguintes: IRT/DNA ou IRT/IRT (Figura 4). Dentro destas duas categorias, múltiplas modificações podem ser usadas, dado que não existe um algoritmo perfeito ²⁷. Relata-se que ambas proporcionam cerca de 90% a 95% de sensibilidade, e identificam os recém-nascidos de risco num amplo espectro de gravidade da doença ¹⁷.

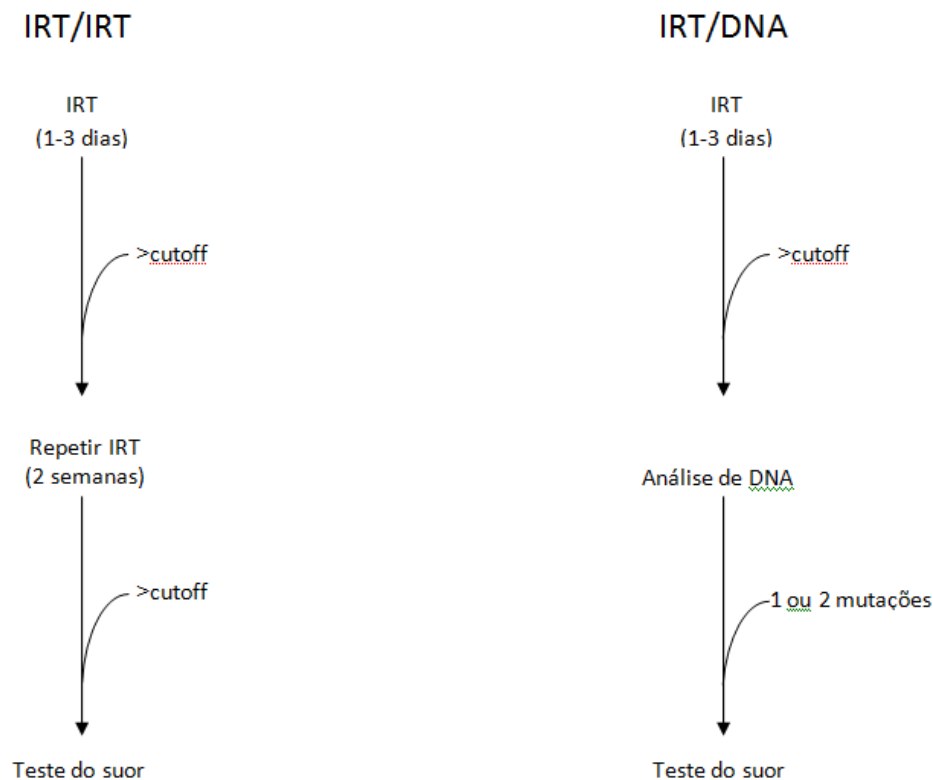


Figura 4 – Estratégias utilizadas para o rastreio neonatal – IRT/IRT e IRT/DNA. (Adaptado de Kloosterboer et al)²⁸

II.IV.I.I - IRT/IRT

Na estratégia de diagnóstico IRT/IRT é necessária a recolha de duas amostras. A primeira entre o primeiro e terceiro dia de vida do recém-nascido, e a segunda duas a três semanas mais tarde^{29,27,28}. No entanto, uma vez que o valor de IRT pode baixar, vários protocolos são baseados num segundo teste IRT, desejando reduzir os falsos-positivos²². A concentração no sangue/soro de IRT decresce com a idade mais rapidamente nos falsos positivos do que nas crianças com FC²⁰.

É necessário que o primeiro e o segundo IRT estejam acima dos *cutoff* definidos para que se possa recomendar o teste do suor, logo o IRT inicial é um passo crucial para o rastreio²⁸. Muitos programas seleccionam um valor de *cutoff* ligeiramente inferior para a segunda amostra. Uma elevação persistente do IRT na segunda amostra recomenda-se que seja feito o teste do suor²⁴.

Em síntese, a utilidade do teste é limitada ao período neonatal, pois os níveis de IRT tornam-se normais ao fim de poucas semanas ou meses após o nascimento da criança^{21,29}. Na maioria das crianças mais velhas com FC os valores de IRT são normais, mas têm de se considerar variações de criança para criança²⁹.

II.IV.I.II - IRT/DNA

A utilização da análise de DNA como segundo nível de rastreio requer a selecção de mutações no gene CFTR a serem analisadas, para definir o teste genético mais adequado ao estudo. A decisão pode ser tomada no sentido de testar apenas as mutações mais comuns, ou de fazer um estudo de mutações associadas a um estado mais grave da doença, ou ainda de um painel de mutações múltiplas, que inclui algumas variantes ligadas a fenótipos mais leves²⁷.

Com o desenvolvimento dos testes de diagnóstico do DNA para as mutações mais comuns do gene CFTR, foi desenvolvida uma estratégia alternativa de rastreio. Neste processo, crianças com um valor de IRT acima do limiar são submetidas a uma análise das mutações de CFTR no DNA genómico isolado da amostra inicial^{20,24}. Isto elimina a necessidade de uma segunda amostra de sangue, diminui o tempo de diagnóstico e melhora o valor preditivo positivo dos programas de rastreio por baixar as taxas de falsos-positivos²⁴. O teste de DNA deve estar sempre ligado a um aconselhamento genético, a fim de prestar aconselhamento suficiente à família e ao paciente e, eventualmente, oferecer testes complementares, se estiverem dentro da idade reprodutora²⁰.

Após a análise das duas técnicas de rastreio, é importante salientar vários aspectos. Os resultados relativos ao rastreio IRT/DNA sugerem uma melhor sensibilidade que IRT/IRT, mas anteriormente foram estudadas populações relativamente pequenas. A técnica é difícil de aplicar em prematuros, uma vez que o sucesso depende do momento da colheita de sangue, podendo também, entretanto, atrasar o diagnóstico pelo teste do suor. As vantagens do teste por análise do DNA são a possibilidade de realização com a amostra original de sangue e a obtenção de um resultado específico com o reconhecimento das mutações do CFTR²⁵. O uso de um algoritmo IRT/IRT evita a identificação de um grande número de portadores de FC a partir da análise do DNA, bem como as necessidades associadas a um aconselhamento genético²⁷.

II.V - Teste do Suor

As anomalias nos electrólitos do suor foram estabelecidas durante uma onda de calor em Nova Iorque em 1948³. Em 1956, Gahm e Shwachman serviram-se da técnica da análise dos electrólitos do suor para diagnóstico de FC na sua clínica, mas isto foi até Gibson e Cooke, em 1959, descreverem o método da quantificação do cloreto pela iontoforese quantitativa com pilocarpina, que foi aceite como teste padrão³. Desde então, têm havido avanços significativos na compreensão da análise de electrólitos do suor, como medida da função do CFTR e um aperfeiçoamento no uso do teste de suor para o diagnóstico da FC.

O teste do suor raramente é normal em pacientes com um genótipo de FC. Este teste é uma medição quantitativa dos electrólitos no suor e mantém-se como a chave de investigação que sustenta o diagnóstico de fibrose cística. As indicações para o teste do suor incluem: fenótipo sugestivo de FC, história familiar, seguimento de alguns testes de rastreio^{30,31}.

Um nível do ião cloreto no suor acima dos 60 mmol/l e a ausência de FC é uma condição rara. No entanto, um teste do suor com valores normais não exclui o diagnóstico de FC^{16,32}. A tabela 3 mostra algumas causas de resultados falsos-positivos e falsos-negativos.

Tabela 3 - Causas de resultados falsos-positivos e falsos-negativos com o teste do suor

Resultado falso – positivo	Resultado falso – negativo
<ul style="list-style-type: none"> · Dermate atópica (eczema) · Malnutrição · Hiperplasia adrenal congénita · Síndrome Mauriac · Fucosidosis · Displasia ectodermal · Insuficiência adrenal · Disfunção autonómica · Privação ambiental · Síndrome Munchausen · Hipotiroidismo · Diabetes insípida nefrogénico · Síndrome Klinefelter's 	<ul style="list-style-type: none"> · Diluição da amostra · Malnutrição · Edema periférico · Baixa taxa de suor · Desidratação · Hipoproteinemia · Mutações no canal CFTR com preservação da função do ducto do suor

Adaptada de Sullivan et al⁷

O teste do suor envolve a administração transdérmica de pilocarpina por iontoforese para estimular a secreção de suor. A análise da concentração do ião cloreto deve ser realizada por laboratórios creditados pela Fundação da Fibrose Cística^{17,26}.

A medição da concentração do ião cloreto é a análise de escolha pois mostra uma maior discriminação entre indivíduos normais e com FC. Além disso, tornou-se claro que este está mais directamente relacionado com a disfunção do CFTR. Nos indivíduos com FC, o cloreto no suor é normalmente mais elevado que o nível de sódio, mas o inverso é o que se verifica em pessoas normais¹⁶.

Teste do suor é o termo geral que se refere à análise quantitativa e qualitativa do suor para determinar a concentração de electrólitos, condutividade e osmolaridade para diagnóstico

da FC. Geralmente consiste em 3 etapas técnicas: estimulação do suor, colheita e análise. A análise do suor é seguida pela interpretação dos resultados ³.

Algumas recomendações que devem ser tidas em conta a fim de realizar um teste do suor são os seguintes:

II.V.I - Informação e requisitos dos pacientes:

- Deve ser obtido um consentimento informado de acordo com política do local; ³⁰
- Devem ser prestadas informações prévias, incluindo a fundamentação da realização do teste, como será realizado, riscos que lhe estejam associados, quem os deve realizar, os dados de contacto sobre o teste e resultado final; ^{30,31}
- Para aumentar a probabilidade de colheita de uma amostra de suor, recomenda -se que seja feita nas duas primeiras semanas de vida do indivíduo, com peso superior a 3 Kg, normalmente hidratado e sem doença grave; ^{30,31,33}
- O teste deve ser adiado em crianças que estão gravemente doentes ou desidratadas, que têm eczemas que possam afectar a zona de estimulação; ^{7,30}
- Deve ser adiada em sujeitos que têm edemas ou que fazem corticosteróides sistémicos, pois podem baixar os níveis de electrólitos no suor; ^{30,31}
- O teste do suor não deve ser feito em pessoas que estão a usar oxigénio; ^{16,20}
- Níveis mais elevados de electrólitos no suor são encontrados em crianças que têm baixo peso ou que estão desidratadas; ³³
- Os níveis não são afectados pela entrada de flucloxacilina, diuréticos ou administração intravenosa de fluidos. ^{30,33}

II.V.II - Estimulação do suor e colheita

- A estimulação do suor utiliza a iontoforese com pilocarpina, usando o método de Gibson e Cooke ou o sistema Macroduct; ^{31,33}
- A superfície de flexão do antebraço é a zona de preferência para fazer a colheita; ^{30,31}
- O equipamento de iontoforese deve ser alimentado por bateria e inspeccionado regularmente; ^{31,33}
- Os eléctrodos são geralmente de cobre, aço inox ou carbono, e devem ser correctamente ajustados ao braço do paciente; ^{30,31}

- A solução de electrólitos para iontoforese não deve conter sódio ou cloro, devido ao risco de contaminação;^{31,31}
- A solução de electrólitos deve conter nitrato de pilocarpina (0,2-0,5 %). Esta pode ser utilizada em ambos os eléctrodos ou, alternativamente, uma solução de sulfato de magnésio (0,05-2,0 mol/l) ou sulfato de potássio a 1% pode ser utilizada no cátodo. A pilocarpina pode ser usada sob a forma de um gel, com o sistema de Wescor;^{31,31}
- Uma corrente de 0,5 mA deve ser aplicada e gradualmente aumentada para um máximo de 4 mA. Quando se alcança 4 mA, a corrente deve ser mantida por um mínimo de 3 e um máximo de 5 minutos;^{30,31}
- O paciente deve ser mantido sob supervisão próxima durante o período de iontoforese;³⁰
- O suor deve ser recolhido para um papel de filtro, compressas de gaze ou para dispositivo de colheita Wescor;^{17,21,30,33}
- A taxa de secreção de suor medida como uma taxa média durante o período de colheita não deve ser inferior a $1\text{g/m}^2/\text{min}$. Uma colheita abaixo desta taxa não deve ser analisada. Colheitas insuficientes de suor não devem ser agrupadas. O teste do suor completo deve ser repetido;^{30,33}
- O suor deve ser recolhido durante não mais de 30 minutos e não menos de 20 minutos;^{31,33}
- Antes da análise, as amostras de suor devem ser armazenadas a 4°C num máximo de três dias em recipientes hermeticamente fechados, que não permitam vazamentos ou evaporação.³⁰

II.V.III – Metodologia

- A concentração do ião cloreto no suor deve ser medida;^{30,31}
- O sódio no suor não deve ser a única substância ou a principal a ser medida;³⁰
- A medição de potássio e da osmolaridade no suor não é recomendada;^{30,31}
- Colorimetria, coulometria e ISEs (eléctrodos ião-selectivos) são métodos para analisar iões cloreto no suor;^{30,31}
- Fotometria de chama ou ISEs são métodos para analisar o sódio no suor;^{30,31}
- A medição da condutividade utilizando o equipamento Wescor é o método satisfatório para análise¹⁷.

II.V.IV - Interpretação dos electrólitos do suor

Os valores de referência de Cl^- no suor normalmente utilizados para o diagnóstico da FC em crianças são:

- Uma concentração de iões $\text{Cl}^- > 60 \text{ mmol/l}$ confirma o diagnóstico de CF; ^{30,31,33}
- A concentração intermédia entre 40-60 mmol/l é sugestiva, mas não confirma o diagnóstico; ^{22,31,33}
- A concentração de iões $\text{Cl}^- < 40 \text{ mmol/l}$ é normal, sendo baixa a probabilidade da doença. ^{12, 31,33}

Estes valores podem ser diferentes no caso de adultos ou recém-nascidos. Para crianças com menos de 6 meses um valor limite apresenta-se entre 30-60 mmol/l. É normal o aumento do valor de electrólitos no suor da infância para a idade adulta: indivíduos adultos normais podem ter concentrações superiores a 60mmol/l. Sendo assim, é conveniente algum cuidado na interpretação dos resultados do teste do suor em indivíduos mais velhos^{3,7,17}. Um valor limite para adultos pode estar entre 60-80 mmol/l ⁴.

A concentração do ião cloreto no suor superior a 160 mmol/L é fisiologicamente impossível, sugerindo erros técnicos como a evaporação e contaminação que tendem a produzir valores falsos positivos ^{3,4}.

II.VI - Análise de mutações CFTR

Os testes moleculares para a avaliação das mutações no gene CFTR fazem parte do diagnóstico de rotina da FC⁴. Em 1996, foram identificadas aproximadamente 500 mutações para a FC, e os painéis típicos de rastreio apenas identificavam cerca de 30 destas mutações. Nos dias de hoje, mais de 1500 mutações estão identificadas, sendo necessário recorrer a análises extensas e detalhadas do gene, incluindo a determinação de sequências de exões e zonas de *splice* nos intrões, bem como a detecção de deleções e duplicações¹⁷.

A análise molecular do CFTR assenta principalmente sobre os procedimentos de análise directa do gene, tratando-se, de facto, da detecção das mutações que causam a doença e que são baseadas no nosso conhecimento sobre patologia molecular da CFTR e sobre a disponibilidade de ferramentas moleculares para a detecção das referidas mutações³⁴.

O DNA necessário para análise pode ser obtido por amostras de bochechos, esfregaço bucal, ou glóbulos brancos²². Após a extracção do DNA, as amostras são geralmente testadas através de um dos kits disponíveis comercialmente^{16,22}.

O teste genético deve ser feito no contexto de um aconselhamento genético apropriado, e é da responsabilidade do laboratório explicar os testes, devendo ser obtido um consentimento informado¹¹. O aconselhamento genético ajuda os pacientes a interpretar os resultados, para que eles possam fazer a melhor adaptação possível, de acordo com as suas decisões¹⁹.

Um vasto conjunto de técnicas são usadas para identificar as variações nas sequências de genes CFTR, e não existe um “padrão-ouro” para o teste de rotina. Todos os métodos de avaliação requerem aptidão e experiência para serem executados e interpretados^{11,34}.

Como já se referiu ser normal na FC, não existe um método *standard* ou perfeito. Contudo, os laboratórios devem estar conscientes das limitações dos métodos escolhidos e devem saber quais as mutações que não são identificadas, se as técnicas estão disponíveis comercialmente ou desenvolvidas no laboratório. Isto significa que os laboratórios, individualmente, devem escolher os métodos adequados à sua experiência e os testes que estão ao seu alcance³⁴. A maioria dos testes detectam apenas 30 mutações, grande parte delas associadas à FC clássica¹⁶.

Os métodos utilizados para a análise das mutações podem ser divididos em dois grupos: aqueles que são alvo de mutações conhecidas (testadas as amostras de DNA para a presença ou ausência de mutações específicas) ou de mutações desconhecidas, avaliadas por métodos com taxas de detecção sensíveis (análise de amostras de qualquer desvio da sequência normal, isto é, a análise de novas mutações) ^{11,34}. Para o estudo de mutações conhecidas, nomeadamente deleções, inserções e duplicações são utilizadas técnicas semi-quantitativas de PCR, como sejam *multiplex ligation-dependant probe amplification* (MLPA) ou *PCR multiplex quantitative fluorescent* ^{34,36}. Foi demonstrado que certas mutações que escapam à detecção pela utilização dos ensaios convencionais ocorrem em até 2% dos alelos em pacientes com FC ³⁴.

Nos casos de testes do suor com valores intermédios, extensas pesquisas de mutações têm que ser realizadas, com ensaios como DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), dHPLC (*denaturing high pressure liquid chromatography*), SSCP (*single strand conformation polymorphism assay*) e sequenciação ^{16,36}. Efectivamente, apenas a sequenciação se aproxima dos 100 % de sensibilidade. As outras técnicas são ensaios indirectos de mutações com sensibilidades a variar entre 90 e 100%. Mesmo que uma mutação seja encontrada, o seu envolvimento com a doença pode não ser claro.

Os ensaios disponíveis apenas identificam mutações que estão na região codificante ou nas junções exão/intrão do gene CFTR. Mutações localizadas dentro do promotor, ou inserções e deleções de um ou mais exões podem, assim, não ser detectadas pelos métodos de análise de rotina ^{16,17}.

Algumas deleções podem ser analisadas por métodos mais específicos, como MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) e são mais susceptíveis de serem encontradas em pacientes com FC clássica. Mutações intrónicas e mutações no promotor são mais susceptíveis de serem moderadas e têm maior relevância em pacientes com FC não-clássica ¹⁶.

Vários ensaios comerciais estão disponíveis para fazer a análise das mutações, como por exemplo o ensaio *OLA FC* (laboratórios Abbott), o *INNO-LiPA CFTR* (Innogenetics), e o *Elucigene FC* (Tepnel Diagnostics) ^{11,34,36}. As características dos métodos correntemente aplicados são sumarizadas na tabela que se segue.

Tabela 4- Métodos para detecção de mutações no gene CFTR mais frequentes na Europa

Métodos para detecção de mutações conhecidas	Mutações detectadas	Vantagens	Limitações
<i>Heteroduplex analysis</i>	Principalmente F508del e I507del	Simple e rápido	Padrão de migração não é específico para uma determinada mutação
Análise de enzimas de restrição (zonas de restrição que podem ser naturais ou criados pela utilização de primers)	Principalmente mutações individuais específicas. Possivelmente, um pequeno número de mutações pode ser combinados em um ensaio	Simple e rápido. Útil para testar cascata transportadora em caso de mutações raras	Não é específico para algumas mutações
<i>Reverse dot blot hybridization</i>	Até 20 mutações	Apropriado para grandes séries	
<i>Innogenetics (Inno LIPA)^a</i>	36 mutações	Boa especificidade	
ARMS (<i>amplification refractory mutation system</i>)	Até 20 mutações	Apropriado para grandes séries	Desenho de primers é difícil. Resultados são baseados na ausência de produtos de PCR
<i>Tepnel (Elucigen)^a</i>	28-30 mutações	Boa especificidade	
OLA (<i>oligonucleotide ligation assay</i>)		Apropriado para grandes séries	
<i>Molécular Abbott</i> (Ensaio de genotipagem para CF) ^a	32 mutações	Boa especificidade	
Métodos para detecção de mutações não conhecidas			
DGGE (<i>denaturing gradient gel electrophoresis</i>)		Sensibilidade elevada (> 95 %)	Difícil de estabelecer, difícil automatização.
DHPLC (<i>denaturing high pressure liquid chromatography</i>)	Capacidade para detectar mutações na região codificante e limites intronicos	Sensibilidade elevada (> 95 %)	Geralmente perde mutações homozigotas. Necessita de sequenciação nas regiões ricas em polimorfismos
SSCP (<i>single strand conformation polymorphism assay</i>)		Simple e rápido	Sensibilidade 80-85%
Sequenciação		Próximo de 100 % de sensibilidade	
<i>PCR multiplex quantitative fluorescent</i>	Capacidade para detectar deleções. Inserções e duplicações. Todas as regiões codificantes		Duplicações são difíceis de evidenciar
<i>MLPA (multiple ligation-dependent probe amplification)</i>		Simple e rápido	Sensível aos métodos de extracção

^a Métodos de avaliação comercial . *Adaptado de Dequeker et al.*³⁴

Apesar da potencial utilidade da informação, a obtenção de um genótipo para a doença pode ser difícil. Embora actualmente os painéis de rastreio disponíveis identifiquem 90% das mutações do CFTR, 9,7% dos indivíduos genotipados têm pelo menos uma mutação não identificada¹⁷. Com efeito, a combinação de todos estes métodos nem sempre garante a detecção das duas mutações, 1-5% dos alelos permanecem indeterminados em pacientes com forma clássica da doença e ainda mais em pacientes com apresentações atípicas. Além disso, a percentagem de mutações não identificadas aumenta de norte para sul nas populações europeias³⁴.

II.VII - Bioensaios

Os bioensaios do CFTR medem o fluxo epitelial dos iões ou a sua voltagem na superfície da mucosa. Estes ensaios permitem uma visão directa sobre a fisiologia ao nível celular e do canal iónico, contribuindo para a resolução de problemas de diagnóstico, ao admitir ou despistar uma dada disfunção relacionada com o CFTR. Os testes podem ser feitos no epitélio intestinal ou respiratório e podem realizar-se *in vivo* (medição do potencial nasal ou bronquial) ou *ex vivo*, em amostras de mucosa intestinal ou culturas de células das vias aéreas. Em muitos centros de diagnóstico, as medições de diferença de potencial nasal (DPN) ou da corrente intestinal (MCI) não estão disponíveis (na verdade, são realizadas apenas em laboratórios especializados no mundo inteiro); em tais circunstâncias, o algoritmo de diagnóstico pode suprimir este passo^{16,20}.

II.VII.I - Diferença de potencial nasal transepitelial

O teste DPN, utilizado há décadas, foi introduzido recentemente como um meio auxiliar de diagnóstico e existe na prática clínica em alguns laboratórios, tendo esses compilado os seus próprios valores de referência¹⁷. Múltiplos artigos referem a utilidade deste teste para o diagnóstico da FC³⁷⁻⁴⁰.

As anomalias do transporte iónico no epitélio respiratório na FC estão associadas a um padrão alterado na DPN, comparado com um epitélio normal. Na realidade, essas diferenças reflectem a nível celular a disfunção da proteína CFTR nos pacientes com FC. Isso fornece um fundamento para o uso da DPN como meio auxiliar de diagnóstico^{1,23,42}.

Embora a medição da DPN possa contribuir para o diagnóstico positivo ou negativo da FC, existem variáveis importantes que necessitam de ser rigorosamente atendidas, para garantir a segurança e a precisão do teste. Tal técnica só está disponível em centros altamente especializados e requer uma padronização rigorosa. Considerações técnicas sobre a anatomia da mucosa nasal devem ser claramente entendidas, pois os sítios de medição da diferença de potencial são decisivos para a precisão das medições efectuadas^{18,43}.

O teste DPN pode ser realizado desde as primeiras horas de vida de um indivíduo; em crianças mais velhas (2 a 5 anos) raramente se manifesta a necessidade de recorrer a um sedativo leve^{18,41}.

Uma DPN aumentada, em associação com quadro clínico ou historial familiar positivo, fundamenta o diagnóstico de FC. Por outro lado, a ausência de aumento na DPN não exclui o diagnóstico de FC, dado que pode ocorrer um falso resultado negativo na presença do epitélio inflamado ou com pólipos, que alteram as propriedades bioeléctricas da mucosa^{18,41}. Assim, importa admitir que se está diante de uma doença com manifestações heterogéneas e, não raras vezes, apresenta-se de forma clinicamente atípica e reflecte-se em algoritmos bastante diversos.

O transporte activo de iões carregados electricamente através do epitélio respiratório resulta numa voltagem ou diferença de potencial⁴⁴. A medição dessa diferença de potencial transepitelial é realizada no nariz (e vias aéreas superiores) de pacientes com FC detentores de um padrão característico de propriedades bioeléctricas que reflecte um aumento no transporte de Na⁺ (absorção) e uma ausência ou redução da secreção de Cl⁻⁴¹.

A DPN é medida entre uma ponte de exploração nasal e uma ponte de referência subcutânea no antebraço. Essa abordagem também permite a aplicação de medicamentos directamente no local de medição da diferença de potencial ^{16,38,41}. A supracitada ponte de referência pode ser aplicada por uma fina agulha, inserida por via subcutânea ou colocada directamente na pele após uma pequena abrasão ¹³. No teste de DPN, o epitélio nasal é exposto a vários tipos de soluções e, de acordo com a reacção a cada uma delas, é possível obtermos o resultado do exame ⁴⁵.

Especificamente, três características distinguem um paciente com FC: uma diferença de potencial basal mais elevada (mais negativa), uma maior diminuição da diferença de potencial após a perfusão nasal com amilorida e pouca ou nenhuma alteração na diferença de potencial, após a perfusão do epitélio nasal com uma solução livre de Cl^- em conjugação com isoproterenol ^{18,43}. Assim sendo, na realização do bioensaio da DPN são utilizadas substâncias com acções relativamente específicas, que fornecem pistas acerca da natureza da actividade no transporte de iões no epitélio ⁴¹.

A diferença de potencial basal reflecte a actividade do transporte de sódio na superfície respiratória das células epiteliais ^{16,37}. Após se ter uma diferença de potencial de base é avaliado o efeito da amilorida. A esta mesma solução adiciona-se uma a solução livre de Cl^- durante 3 minutos; à mesma solução é adicionado isoproterenol, por perfusão, mais 3 minutos ^{16,45}.

Por um lado, a amilorida é utilizada para estudar a condutância do canal de sódio. A amilorida é um fármaco utilizado como anti-hipertensor e diurético, que vai bloquear o canal de sódio, inibindo a entrada de Na^+ nas células do epitélio nasal ⁴⁶. A inibição da entrada de Na^+ conduzirá à despolarização da membrana, ocorrendo uma redução da diferença de potencial nasal ^{23,42,44}.

Uma solução livre de iões Cl^- é utilizada para medir a condutância (secreção) de cloro, a qual pode ser avaliada estabelecendo um gradiente de iões Cl^- para o exterior da membrana das células das vias aéreas, por perfusão da superfície do epitélio, com uma solução livre de iões Cl^- ^{37,38}. A activação farmacológica do canal Cl^- pode ser testada estabelecendo um gradiente electrogénico de Cl^- para o exterior da célula, levando à hiperpolarização da célula e a um ligeiro aumento da diferença de potencial ⁴¹.

No que respeita ao isoproterenol, por outro lado, trata-se de um medicamento simpaticomimético que actua ao nível dos receptores beta adrenérgicos ⁴⁶. É um agonista beta que vai estimular o cAMP que medeia a secreção de cloro através do CFTR ³⁷.

A DPN de um paciente com FC é claramente diferente da do grupo de controlo (Figura 5). O valor de diferença de potencial basal é mais alto (mais negativo), a resposta com amilorida é elevada, e não existe resposta, ou é reduzida, para a solução livre de Cl⁻ e solução de isoproterenol ^{16,44,45}. Para a FC não-clássica, a DPN pode ter um valor intermédio e ainda não há um consenso total sobre a exactidão do que constitui um resultado anormal, mas é sugerida uma fórmula que leva em conta tanto o transporte de Na⁺ como de Cl⁻ ^{16,45}.

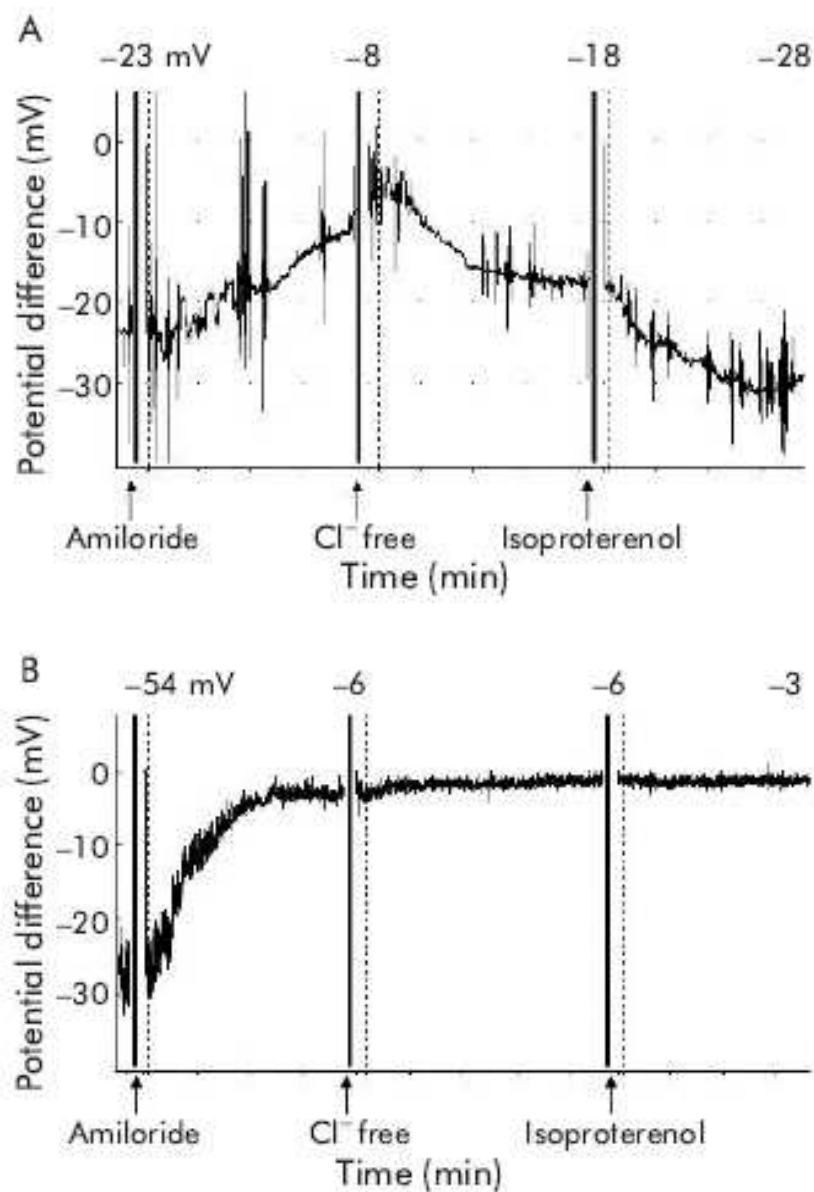


Figura 5 – Medição da diferença de potencial nasal em (A), uma pessoa saudável, e (B) uma pessoa com FC. Na pessoa saudável, a diferença de potencial basal é negativa (-20 a -30 mV), aumenta moderadamente após aplicação de amilorida e diminui depois da aplicação da solução livre de Cl⁻ e isoproterenol. No paciente com FC, o valor de diferença de potencial basal é mais negativo e o aumento após aplicação de amilorida é maior. Não existe alteração na diferença de potencial após a administração da solução livre de Cl⁻ e isoproterenol (*De Boeck et al*)³.

II.VII.II - Medição de corrente intestinal

O transporte anómalo de iões no epitélio, que é característico da FC, expressa igualmente anomalia através do tracto intestinal.¹⁶ Visto que muitos processos de transporte intestinal de iões são electrogénicos, a medição da corrente eléctrica por eles gerada (MCI), pode ser utilizada para monitorizar a sua actividade^{16,23,47}.

A técnica de MCI pode ser uma ferramenta útil para complementar o diagnóstico em pacientes com manifestação atípica da doença. MCI é um método *ex vivo*, pelo qual, numa biopsia recente, é testada a sua resposta eléctrica a uma série de secretagogos. O que distingue doentes com FC dos indivíduos saudáveis é a quantidade de secreção de Cl^- em resposta aos agonistas, aumentando o cAMP intracelular, que está ausente, ou apresenta um valor abaixo do normal, em biopsias de pacientes com FC⁴⁸. As medições podem ser efectuadas na mucosa rectal ou jejunal^{16,23}.

Vários protocolos são utilizados para testar a MCI, mas todos reconhecem que a FC é devida a uma diminuição da secreção de Cl^- , após a estimulação com os agonistas que actuam via cAMP ou Ca^{2+} ^{47,48}.

Só muito recentemente têm vindo a surgir dados sobre o uso do MCI como ferramenta de diagnóstico clínico. A técnica aplica-se essencialmente no contexto de investigação, por isso não está ainda incluída nos algoritmos de diagnóstico¹⁶.

II.VIII - Algoritmos de diagnóstico

O diagnóstico da FC é distinto, de acordo com a sua dupla classificação de típica ou atípica^{6,16}. Algoritmos de diagnóstico para FC clássica e não clássica foram publicados pela European Union CF diagnostic working group e US cystic fibrosis foundation^{7,16,17}.

A FC clássica ou típica é diagnosticada nos indivíduos que têm uma ou mais características fenotípicas e um teste do suor cujo resultado é > 60 mmol/l^{16,18,49}. Cerca de 98% dos pacientes apresentam FC clássica⁴⁹. As manifestações clínicas mais comuns da CF são doença crónica sino-pulmonar, sintomas gastrointestinais ou nutricionais específicos e anomalias a nível do sistema reprodutor masculino, resultando em azoospermia obstrutiva, podendo, contudo, manifestar-se de várias outras formas, já que se trata de uma doença que acomete vários órgãos^{1,2}. Pacientes com FC clássica apresentam insuficiência pancreática exócrina ou suficiência pancreática^{16,49}. Na tabela 2 estão relacionadas as manifestações clínicas mais frequentes à época do diagnóstico.

Geralmente, é identificada pelo menos uma mutação no gene CFTR.¹⁶ Com a introdução do teste do suor enquanto padrão para diagnóstico da FC, tornou-se visível que os adultos podem apresentar fenótipos mais moderados ou incompletos².

Habitualmente, são os indivíduos do grupo da CF não-clássica que fornecem um maior desafio para o diagnóstico da doença⁴⁹. A FC atípica ou não-clássica descreve indivíduos com características fenotípicas em pelo menos um sistema de órgãos e um teste do suor normal (<40 mmol/l) ou intermédio (40-60 mmol/l)^{7,18,49}

Dados revelam que quase 2% dos pacientes com FC apresentam manifestações clínicas de acordo com fenótipos deste tipo não-clássico^{1,18,49}. Isto pode subestimar a verdadeira prevalência de um número significativo de indivíduos com FC atípica, que, provavelmente, permanecem sem diagnóstico⁴⁹. No geral, indivíduos deste grupo apresentam suficiência pancreática exócrina e, por vezes, têm uma doença pulmonar leve^{1,16,49}. Os homens, ocasionalmente, demonstram fertilidade⁴⁹.

A descoberta do gene da FC veio facilitar o diagnóstico nestes doentes, confirmado pela análise da mutação no gene CFTR e pela quantificação directa da disfunção CFTR através da medição *in vivo* da diferença de potencial nasal^{16,18}.

A abordagem inicial com o teste do suor é o rumo preferível (Figura 6). Em pacientes com uma forma atípica da doença, a viabilidade do teste do suor é mais baixa e são necessários testes adicionais para fundamentar o diagnóstico, sendo o algoritmo iniciado com a análise do DNA mais apropriada (Figura 7) ^{16,22}.

No caso do algoritmo de diagnóstico ter início devido à presença de história familiar de FC, se o paciente tiver um irmão afectado com um teste do suor claramente positivo, o algoritmo da figura 6 apresenta a melhor abordagem diagnóstica. Se ao contrário o paciente tiver um irmão afectado com um teste do suor no limite ou negativo o algoritmo da figura 7 deve ser utilizado¹⁶. Quando o diagnóstico é iniciado devido a um rastreio neonatal positivo recomenda-se a utilização do algoritmo da figura 7 ^{16,20}

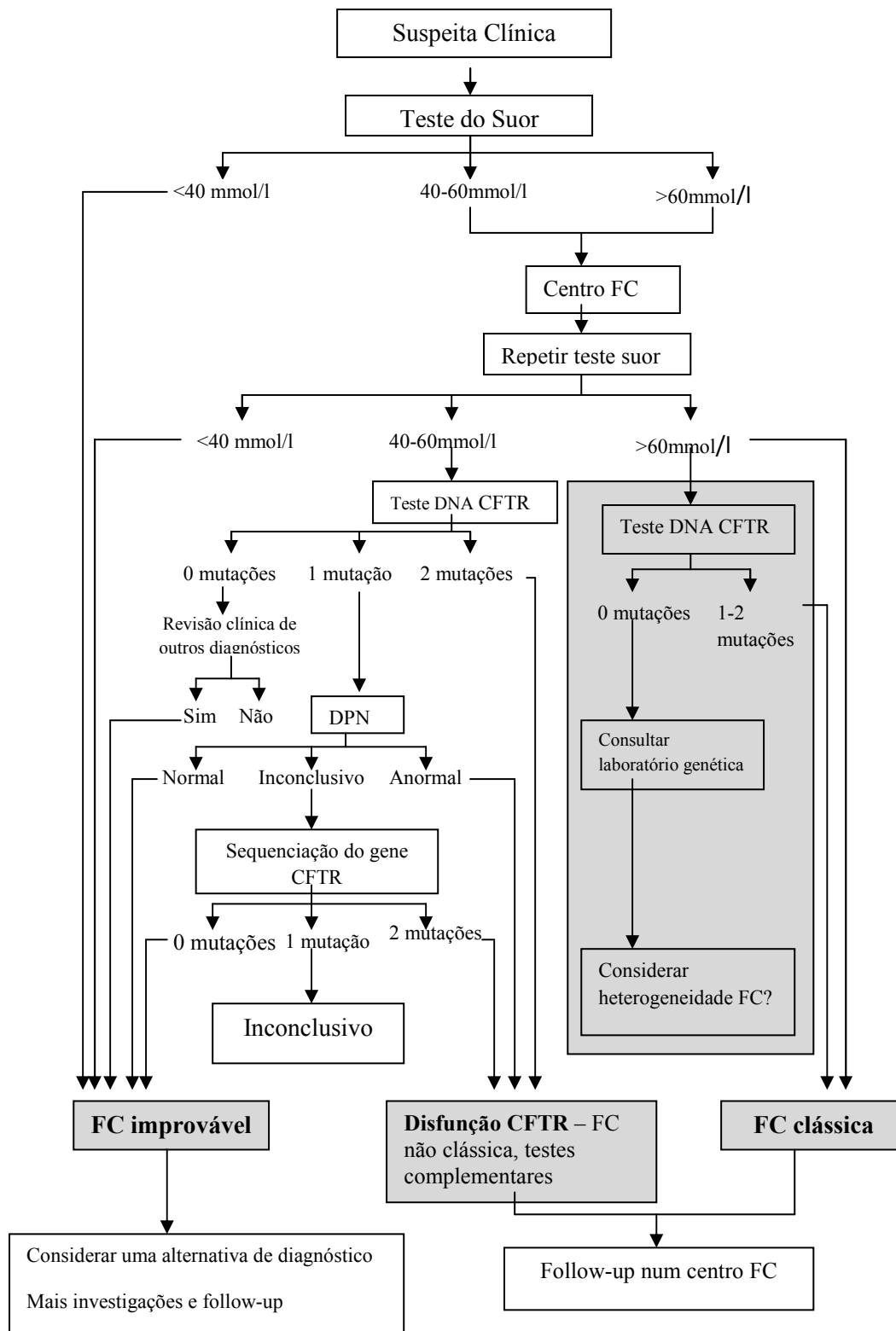


Figura 6 – Algoritmo de diagnóstico da FC que se inicia com o teste do suor. Adaptado de(De Boeck et al)¹⁶

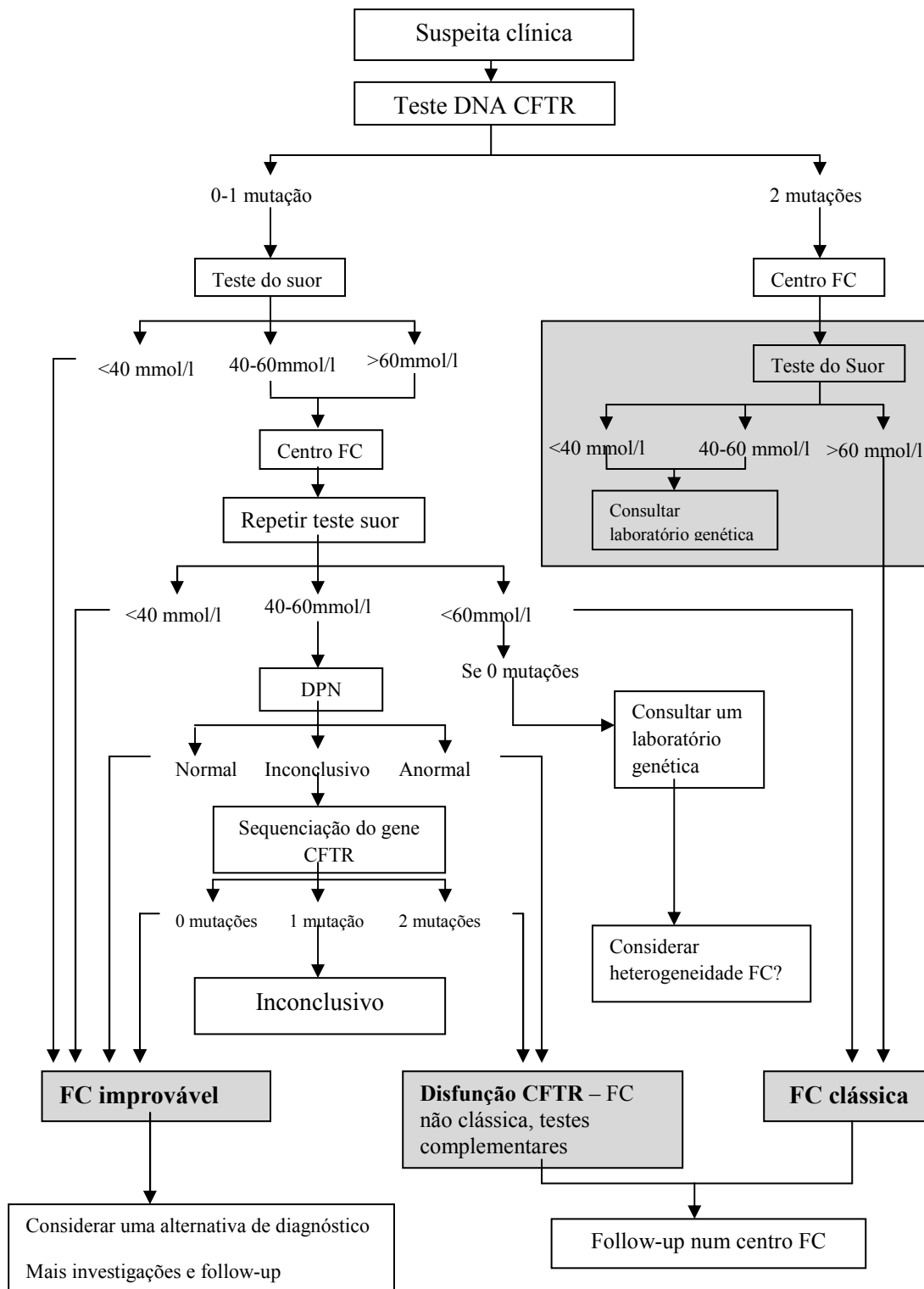


Figura 7– Algoritmo de diagnóstico da FC que se inicia com o teste de DNA do CFTR. Adaptado de(De Boeck et al)¹⁶

II.VIII.I - Algoritmo que começa com o teste do suor

Na maioria dos doentes com FC clássica, com características típicas e mutações identificadas, o teste do suor é utilizado para diagnóstico^{16,30}.

O teste do suor é menos dispendioso e em quase toda a população irá resultar num maior rendimento de diagnóstico do que o teste de DNA¹⁶. Todos os pacientes com um teste do suor acima de 60 mmol/l e com duas ou mais características clínicas compatíveis com FC têm o diagnóstico de FC clássica^{16,18,22}. Na figura 6, a zona a cinzento indica os testes que podem ser sugeridos, não sendo, todavia, obrigatórios. Como precaução, e porque o diagnóstico da FC é para toda a vida e podem ocorrer erros, sugere-se que, para além do teste do suor, a análise das mutações seja feita a fim de confirmar o diagnóstico¹⁶. Apenas se não forem encontradas mutações é possível considerar a heterogeneidade da doença. Um teste do suor acima 60 mmol/l também foi relatado em algumas condições muito raras, que geralmente são facilmente diferenciadas dos FC (Tabela 3)^{4,7}. Por sua vez, em pacientes com um teste abaixo dos 40 mmol/l, o diagnóstico é pouco provável^{2,16}.

Os pacientes cujo teste do suor revele valores intermédios (40-60mmol/l) requerem mais investigações^{3,23}. O teste do suor deve ser repetido e a análise do DNA pode ajudar a estabelecer o diagnóstico^{12,17,22}. Quando não são encontradas mutações neste grupo, é necessário fazer um diagnóstico alternativo para tratar o paciente adequadamente. No caso de sintomas respiratórios, a procura de diagnósticos alternativos inclui, entre outros, testes alérgicos, avaliação da imunodeficiência humoral, refluxo gastro-esofágico e função ciliar^{16,18}. A tabela 5 mostra alguns testes auxiliares que se podem realizar para ajudar a estabelecer o diagnóstico em pacientes atípicos. Quando estes indivíduos mostram evidências clínicas de FC, eles devem ter acompanhamento numa clínica especializada na doença²³.

Tabela 5 – Testes auxiliares para avaliação clínica de pacientes atípicos

1 – Microbiologia do tracto respiratório
2 – Avaliação de bronquiectasias
a) Radiografia
b) Tomografia computadorizada
3 – Avaliação dos seios paranasais
a) Radiografia
b) Tomografia computadorizada
4 – Avaliação quantitativa da função pancreática
5 – Avaliação do trato genital masculino
a) Análise ao sémen
b) Exame urológico
c) Ultrasonografia
d) Análise do escroto
6 – Exclusão de outros diagnósticos
a) Estrutura ciliar e função
c) Estado imunológico
d) Alergia
e) Infecção

*Adaptado de Rosenstein et al*¹⁸

Por outro lado, no caso de pacientes com dois testes do suor no limite, em que é detectada apenas uma mutação, deve-se prosseguir para análises mais extensas dos genes e pode-se proceder à sequenciação do CFTR.^{16,23} Os custos da sequenciação do gene são tão altos que os centros com acesso à medição DPN (diferença de potencial nasal) podem reduzir ainda mais este grupo de pacientes, e limitar a sequenciação aos pacientes com um DPN inconclusivo¹⁷. Em pacientes com um teste DPN compatível com FC é aconselhável fazer testes mais específicos, com a finalidade de proceder a um correcto diagnóstico.

Os pacientes com um teste do suor indeterminado e um DPN inconclusivo colocam um grande desafio ao diagnóstico; de momento, eles não podem ser classificados por disfunção do CFTR que não tenha sido claramente demonstrada^{6,16}. Na presença de persistência de sintomas, eles precisam de acompanhamento estruturado numa instalação adequada (muitas vezes em centros de FC) e do tratamento dos sintomas. O aconselhamento genético é importante para estes pacientes e respectivas famílias, uma vez que devem ser recolhidas informações a longo prazo sobre este tipo de doentes, para uma melhor compreensão dos casos¹⁶.

II.VIII.II - Algoritmo que começa com o teste genético

Em casos de FC atípica, em que são identificadas mutações menos comuns no gene CFTR, o teste do suor é utilizado como intermediário, ajudando, habitualmente, a comprovar o diagnóstico^{16,22,30}.

O algoritmo da figura 7 é utilizado principalmente nos programas de rastreio neonatal. As identificações de duas mutações nos genes CFTR são necessárias para concluir o diagnóstico^{22, 30, 34}. Quando duas mutações são encontradas ainda é importante a realização de teste de suor, para confirmar o diagnóstico. Já quando não são encontradas duas mutações, então o teste do suor torna-se a chave para o diagnóstico^{16,44}. A FC é um diagnóstico para uma vida, é deve-se ter um cuidado, para que um diagnóstico baseado em apenas um teste de diagnóstico seja totalmente confiável. Podem ocorrer erros lamentáveis na determinação da mutação¹⁶.

No grupo de indivíduos com valores entre 40-60 mmol/l é necessária a realização de mais testes (DPN é um dos meios utilizados e a sequenciação do DNA se DPN não é válido ou inconclusivo)^{4,16}.

Provas da disfunção do CFTR pelo DPN ou mesmo pelo teste do suor não significam, *per si*, que o diagnóstico apropriado é FC. O diagnóstico é feito no quadro clínico e os testes apenas apoiam o diagnóstico clínico. Se uma disfunção CFTR é documentada mas o quadro clínico é limitado – por exemplo, infertilidade masculina, é melhor utilizar um diagnóstico alternativo¹⁶.

Com exceção de alguns casos de variabilidade inerente à expressão e gravidade da doença, a maioria dos casos de diagnóstico de FC são claros, o quadro clínico é óbvio e o diagnóstico clínico é comprovado pelo teste do suor e pela análise das mutações⁴⁴.

No que respeita às crianças e aos jovens adultos, a FC não-clássica constitui um desafio maior. Felizmente, em muitos casos mais análises de mutações e bioensaios vão apoiar ou excluir o diagnóstico. Como tal, a necessidade de um processo de diagnóstico estruturado é óbvia em doenças tão complexas^{3,20}.

De facto, são necessários mais dados sobre a heterogeneidade da doença e é muito relevante a criação de uma rede de diagnóstico com colaboração internacional, que ajuda a recolher dados clínicos e de laboratório de pacientes sem um diagnóstico claro de FC, esperando-se a identificação de novos padrões clínicos e etiológicos da doença¹⁶.

Mesmo quando não se consegue um diagnóstico definitivo em alguns pacientes, o tratamento de suporte intensivo e acompanhamento devem ser iniciados perante a persistência de sintomas. A situação torna-se mais complicada quando, em recém-nascidos, não existem sintomas e quando a DPN é difícil de medir. Um aumento da IRT, uma mutação do CFTR e um valor limiar do teste do suor no recém-nascido pode ser bem sugestivo da FC não-clássica. Essas crianças devem ser acompanhadas de perto e, eventualmente, colocadas em tratamento preventivo. Tais pacientes, provavelmente têm um prognóstico muito melhor: é necessário um acompanhamento a longo prazo para este grupo, para proceder a um tratamento individualizado¹⁶.

III - CONCLUSÃO

III – Conclusão

Desde a clonagem do gene responsável pela fibrose cística, muitos dos dilemas relacionados com o diagnóstico foram resolvidos, pois permitiu uma melhor compreensão das funções do CFTR. Por outro lado, a complexidade do diagnóstico levou a um maior reconhecimento de fenótipos mais leves e atípicos. No entanto, a existência de fenótipos de FC com ausência de mutações também podem ocorrer, o que torna necessário o desenvolvimento de novas técnicas de análise com o fim de proceder a um diagnóstico mais diferenciado nestes casos.

A análise de mutações dá-nos informações sobre o gene, mas não sobre o produto do gene ou a sua função. Daí, ser importante o aperfeiçoamento de técnicas que permitam uma visão directa sobre a fisiologia ao nível celular e do canal iónico. O teste de DPN pode ser útil nestes casos, no entanto, em lactentes a sua utilização como ferramenta de diagnóstico pode ser mais difícil de implementar.

Tornou-se claro que a FC é um diagnóstico clínico, apoiado por um teste genético e da demonstração de alterações da função do CFTR. O teste do suor, é ainda considerado como um bom meio de diagnóstico, porém a interpretação dos valores dos electrólitos tem que ser feita com especial atenção. A concentração do ião cloreto no suor deve ser interpretada tendo em conta a apresentação clínica do paciente, história familiar, idade e conhecimento de que algumas mutações no gene CFTR estão associadas a valores limite do teste do suor ou pouco sugestivos para a doença.

Para o futuro, espera-se que uma melhor compreensão e relacionamento de todos os meios de diagnóstico, bem como das manifestações clínicas associadas à doença, auxiliem numa maior expansão no diagnóstico para muitas situações com apresentações atípicas, que ainda hoje ficam por resolver.

IV - BIBLIOGRAFIA

- 1- Reis FM, Damacena N. Fibrose Cística. *Jornal de Pediatria*. 1998; 74(1): 76-91.
- 2- Emery and Rimoin's. *Principles and Practice of Medical Genetics*. Churchill Livingstone 2002, Fourth Edition.
- 3- Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev*. 2005; 26: 135-153.
- 4- Davis PB. Cystic Fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173: 475-482.
- 5- Rimoin DL. *Principles and Practice of Medical Genetics*. Churchill Livingstone 1990, Second Edition.
- 6- <http://www.nursing2007.com>. Acedido a 28 de Agosto.
- 7- Sullivan BP, Freedman SD. Cystic Fibrosis. *Lancet*. 2009; 373: 1891-904.
- 8- World Health Organization. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis, 2004. Available at <http://www.who.int/genomics/publications/en>. Acedido a 20 de Agosto.
- 9- Farrel PM. Prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cystic Fibrosis*. 2008; 7: 450-453.
- 10- Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cystic Fibrosis*. 2002; 1: 13-29.
- 11- Gallati S. Genetics of Cystic Fibrosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2003; 24(6): 629-636
- 12- Ratjen F, Doring G. Cystic Fibrosis. *Lancet*. 2003; 361: 681-89.
- 13- Kleven DT, McCudden CR, Willis MS. Cystic Fibrosis: newborn screening in America. www.mlo-online.com. 2008. Acedido a 16 de Julho.
- 14- Fonseca JA, Cernadas JR. Fibrose quística - variabilidade fenotípica, avanços na patogénia. *R. Port Imunoalerg*. 1999; 7(1): 19-29.
- 15- Wilmott RW. Making the diagnosis of cystic fibrosis. *Journal of pediatrics*, 1998; 132: 563-565.
- 16- De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnosis algorithms. *Thorax*. 2006; 61: 627-635
- 17- Farrel 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; 153: S4-S14.

-
- 18- Rosenstain BJ, Cutting GR, for the cystic fibrosis foundation consensus panel. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr.* 1998; 132: 589-595
 - 19- Demsey SA. Carrier Screening for Cystic Fibrosis: A Perinatal Perspective. *J Perinat Neonat Nurs.* 1999; 13(2): 14-26.
 - 20- Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Roelse JD, Duff A, Farrel M, et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cystic Fibrosis.* 2009; 8: 153-173.
 - 21- Taussing LM, Boat TF, Dayton D, Fost N, Hammond K, Holtzman N, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis: position paper. *J Pediatr.* 1983; 72: 741-745.
 - 22- Smyth RL. Diagnosis and management of cystic fibrosis. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2005; 90: 1-6.
 - 23- Mayell SJ, Munck A, Craig JV, Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, et al. A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J Cystic Fibrosis.* 2009; 8: 71-70.
 - 24- Parad RB, Comeau AM. Newborn screening for cystic fibrosis. *Pediatric Annals.* 2003; 32(8): 528-534
 - 25- Southern KW, Munck A, Pollitt R, Travet G, Zanolla L, Roelse JD, Castellani C. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cystic Fibrosis.* 2007; 6: 57-65.
 - 26- <http://www.cff.org>. Acedido a 17 de Maio
 - 27- Comeau AM, Accurso FJ, White TB, Campbell PW, Hoffman G, Parad RB, et al. Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: cystic fibrosis foundation workshop report. *J Pediatr.* 2007; 119(2): 495-519.
 - 28- Kloosterboer M, Hoffman G, Rock M, Gershan W, Laxova A, Li Z, et al. Clarification of laboratory and clinical variables that influence cystic fibrosis newborn screening with initial analysis of immunoreactive trypsinogen. *J Pediatr.* 2009; 123(2): 338-346
 - 29- Corbetta C, Seia M, Bassotti A, Ambrosioni A, Giunta A, Padoan R. Screening for cystic fibrosis in newborn infants: results of a pilot programme based on a two tier protocol (IRT/DNA/IRT) in the Italian population. *J Med Screen.* 2002; 9: 60-63.
 - 30- Green A, Kirk. Guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem.* 2007; 44: 25-34.
-

-
- 31- Coakley J, Scott S, Doery J, Greaves R, Talsma P, Whitham E, et al. Australian guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Biochem Rev.* 2006; 27(2): 1–7.
- 32- Stewart B, Zabner J, Shuber AP, Welsh MJ McCray PB. Normal sweat chloride values do not exclude the diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151: 899 - 903
- 33- Legrys V, Yankaskas JR, Quitell LM, Marshall BC, Mogayzel P. Diagnostic sweat testing: the cystic fibrosis foundation guidelines. *J Pediatr.* 2007; 151: 85-89.
- 34- Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – update European recommendations. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17; 51-65.
- 35- Steinraths M, Vallance HD, Davidson AG. Delays in diagnosis cystic fibrosis, *Can Fam Physician* 2008;54: 877-73.
- 36- Spina RM, Castaldo G. Molecular diagnosis of cystic fibrosis: comparison of four analytical procedures. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41(1): 26-32.
- 37- Gelrud A, Sheth S, Banerjee S, Banerjee S, Weed D, Shea J, et al. Analysis of cystic fibrosis gene product (CFTR) function in patients with pancreas divisum and recurrent acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 3: 151-6.
- 38- Hofmann T, Bohmer O, Huls G, Terbrack HG, Bittner P, Klingmuller V, et al. Conventional and modified nasal potential difference measurement in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1908-1913
- 39- Delmarco A, Pradal U, Cabrini G, Bonizzato A, Mastella G. Nasal potential difference in cystic fibrosis patients presenting borderline sweat test. *Eur Respir Journal.* 1997; 10: 1145-1149.
- 40- Hubert D, Jajac I, Bienvenu T, Dufeu ND, Ellaffi M, Ava-Santucci JD, et al. Diagnosis of cystic fibrosis in adults with diffuse bronchiectasis. *J cystic fibrosis* 2004; 3: 15-22
- 41- Schuler D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Ballmann M, Dechaux M, et al. Basic protocol for transepithelial potential difference measurements. *J Cystic Fibrosis* 2004; 3: 151-6
- 42- Mall M, Hirtz S, Gonska T, Kunzelmann K. Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis. *J cystic fibrosis* 2004; 3: 165-9
-

- 43- Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC. In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing of gene transfer in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther.* 1995; 6: 445-455
- 44- Southern KW, Peckham D. Establishing a diagnosis of cystic fibrosis. *Chronic Respiratory Disease.* 2004; 1: 205-210.
- 45- Wilschanski M, Famini H, Strauss-liviatan N, Rivlin J, Blau H, Bentur L, et al. Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir Journal* 2001; 17: 1208-1215.
- 46- Katzung, BG. (2007). *Farmacologia básica e clínica.* 10ª Edição. Mc Graw Hill
- 47- De Jonge HR, Ballmann M, Veeze H, Bronsveld I, Stanke F, Tummler B. Ex vivo Cf diagnosis by intestinal current measurements (ICM) in small aperture, circulation Ussing chambers. *J Cystic Fibrosis* 2004; 3: 159-63
- 48- Hug MJ, Tummler B. Intestinal current measurements to diagnose cystic fibrosis. *J cystic fibrosis.* 2004; 3: 157-158.
- 49- Boyle MP. Non-classic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9: 498-503