



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

HELGA KAISER SANCHES DE MARIA

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA CFTR POR ELETROFISIOLOGIA EM  
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DUVIDOSO DE FIBROSE CÍSTICA

CAMPINAS

2018

HELGA KAISER SANCHES DE MARIA

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA CFTR POR ELETROFISIOLOGIA EM  
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DUVIDOSO DE FIBROSE CÍSTICA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, área de  
concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO FERNANDO RIBEIRO  
COORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA CORRÊA PIMENTA  
SERVIDONI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA  
HELGA KAISER SANCHES DE MARIA E ORIENTADA  
PELO PROF. DR. ANTONIO FERNANDO RIBEIRO.

CAMPINAS

2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** Não se aplica.

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Maria, Helga Kaiser Sanches De, 1966-

M337a Avaliação da função da proteína CFTR por eletrofisiologia em pacientes com diagnóstico duvidoso de fibrose cística / Helga Kaiser Sanches De Maria. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Antônio Fernando Ribeiro.

Coorientador: Maria de Fátima Corrêa Pimenta Servidoni.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Proteína CFTR. 2. Fibrose cística. 3. Diagnóstico. 4. Evaporimetria. I. Ribeiro, Antônio Fernando, 1948-. II. Servidoni, Maria de Fátima Corrêa Pimenta, 1961-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of CFTR function by electrophysiology in patients with uncertain diagnosis of cystic fibrosis

**Palavras-chave em inglês:**

CFTR protein  
Cystic fibrosis  
Diagnosis  
Evaporimetry

**Área de concentração:** Saúde da Criança e do Adolescente **Titulação:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Antônio Fernando Ribeiro [Orientador]  
Giesela Fleisher Ferrari  
Marcos Tadeu Nolasco da Silva

**Data de defesa:** 27-06-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Saúde da Criança e do Adolescente

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**HELGA KAISER SANCHES DE MARIA**

---

**ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO FERNANDO RIBEIRO**

**COORIENTADOR: PROF. DRA. MARIA DE FÁTIMA CORRÊA PIMENTA SERVIDONI**

---

## **MEMBROS:**

**1. PROF. DR. ANTONIO FERNANDO RIBEIRO**

**2. PROFA. DRA. GIESELA FLEISCHER FERRARI**

**3. PROF. DR. MARCOS TADEU NOLASCO DA SILVA**

---

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

**Data: 27 de junho de 2018**

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho ao meu esposo Rinaldo, meu grande amor, e aos meus filhos  
Marina e Mateus, alegria da minha vida.*

*Aos meus pais, meu eterno amparo e exemplo, e aos meus sogros que me fazem  
sentir como filha.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, meu sumo orientador, por suas promessas e por sua fidelidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro, pela sua confiança em mim, pelo seu apoio e orientação.

À Dra. Maria de Fátima Pimenta Servidoni, que me acompanhou e ensinou, que sonhou com este trabalho e nele empenhou seu conhecimento e energia.

À Dra. Marisa Isabel Lopes de Sousa, que me apoiou e muito me ensinou. Suas intervenções foram fundamentais, seu exemplo motivador e seu carinho, um forte estímulo.

Às queridas “Evaporetas”, Dra. Maria de Fátima Pimenta Corrêa Servidoni, Prof. Dra. Maria Ângela Gonçalves Oliveira Ribeiro, Carla Cristina Souza Gomes e Silvana Dauge Severino, minha eterna gratidão pelo companheirismo e trabalho, por nossos momentos juntas, tornando possível todo o projeto.

À querida amiga Dra. Maria Angélica que tanto nos ajudou, acolheu e presenteou com sua amizade e alegria.

Às Profa. Dra. Giesela Fleischer Ferrari que tão bem acolheu nosso grupo e à Prof. Dra. Sônia Mayumi Chiba e à Prof. Dra. Edna Lúcia Souza pela ajuda.

Ao Gabriel Kraszczuk e ao Prof. Dr. Ricardo Barz Sovat pela dedicação no desenvolvimento do software que automatizou o evaporímetro.

Às Dras. Glênia Medeiros e Maria Cristina Simões, pela fiel companhia.

À Dra. Amanda Roberta de Almeida pela paciência, orientação e estímulo.

Aos amigos Prof. Dr. Paulo Eduardo Ferreira Velho e Dra. Lorena Aguirre Z. Velho, companheiros de longa caminhada.

À Dra. Adriana Mendes Vinagre, Dra. Juliana Moreira Aragão e Dr. Arthur Henrique Pezzo Kmit pela contribuição e aprendizado.

À Dra. Aline Cristina Gonçalves, pelo auxílio e carinho.

Aos professores do Mestrado, pelo ensino e dedicação.

À equipe da Fibrose Cística, ao Departamento de Genética e aos pacientes e seus familiares pela contribuição durante todo este processo.

Às minhas irmãs, meus cunhados e sobrinhos pelo estímulo e inspiração.

À minha família e a D. Fátima, por serem minha alegria e meu apoio.

Aos meus pais, meu exemplo de persistência e coragem.

## RESUMO

*Introdução:* Os atuais desafios no diagnóstico do espectro da Fibrose Cística (FC) estão na avaliação dos pacientes monossintomáticos com genética não definida e Testes do Suor Clássico (TSC) limítrofes, que podem ser classificados como pertencentes ao grupo das doenças relacionadas à CFTR, conhecidas como CFTR-RD (do inglês, CFTR-Related Disorders), pois não preenchem os critérios diagnósticos para FC. A avaliação da função da proteína CFTR em fragmentos de biópsias retais (teste de biópsia retal) tem sido utilizada como teste adicional para o diagnóstico da doença. Recentemente, o teste da secreção  $\beta$ -adrenérgica de suor (evaporimetria) foi desenvolvido e validado como um novo teste para acessar a função da CFTR in vivo. Este estudo teve como objetivos avaliar a função da proteína CFTR em indivíduos com dúvida diagnóstica para FC por meio da evaporimetria, do teste de biópsia retal e do TSC, analisando o desempenho destas técnicas e seu valor para o auxílio no diagnóstico.

*Método:* A evaporimetria, o teste de biópsia retal e TSC foram aplicados a um grupo de 19 indivíduos que apresentavam dúvida diagnóstica de FC. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de um grupo estudado previamente de 32 indivíduos com diagnóstico conhecido. Para a análise estatística aplicou-se o teste ANOVA One-Way para a avaliação dos resultados de TSC e evaporimetria e o teste t de Student (comparações em pares) para o teste de biópsia retal, considerando-se um nível de significância de 0,05. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas.

*Resultados:* Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na avaliação da função de CFTR no teste da biópsia retal entre indivíduos FC com insuficiência pancreática (CFPI) e FC com suficiência pancreática (CFPS), com  $p < 0,001$ . Os resultados de TSC apresentaram valores maiores para pacientes CFPS e CFPI em comparação com indivíduos Controle Negativos para FC (C) e Heterozigotos (Hz), com  $p < 0,001$ . Já os resultados da evaporimetria apresentaram diferenças entre os níveis de função CFTR dentro de seu espectro mais brando, ou seja, entre Hz e C ( $p < 0,001$ ) e entre CFTR-RD e Hz ( $p < 0,001$ ), e valores indistinguíveis entre CFPS and CFPI, mostrando ausência de função CFTR para ambos.

*Conclusão:* A evaporimetria apresentou-se como uma nova e útil ferramenta para elucidar diagnóstico de FC duvidoso e, juntamente com o teste de biópsia retal e TSC, poderá ainda contribuir para o estabelecimento do diagnóstico de CFTR-RD.

*Palavras-chave:* Proteína CFTR; Fibrose Cística; Diagnóstico; Evaporimetria.



## **ABSTRACT**

*Introduction:* Current challenges in the diagnosis of Cystic Fibrosis (CF) disease spectrum are focused in the assessment of mono-symptomatic patients with undefined genetics and borderline classic sweat tests (CST), which can be sometimes classified as having a CFTR-Related disorder (CFTR-RD), as they do not meet diagnostic criteria for CF. Measurements of CFTR protein function in rectal biopsy samples (rectal biopsy test) have been used as an adjunctive test in the diagnostic evaluation of the disease. Recently, a  $\beta$ -adrenergic sweat secretion test (evaporimetry) was developed and validated as a new test to access CFTR function in vivo. This study aimed to evaluate CFTR function in individuals with an uncertain CF diagnosis, by applying the novel test, evaporimetry, together with CST and rectal biopsy test, analyzing its performance and value as adjunctive diagnostic test.

*Methods:* Evaporimetry, rectal biopsy and CST tests were applied to a group of 19 individuals with an uncertain CF diagnosis. Results were analyzed together with those obtained from a previous group of 32 individuals with a known diagnosis. For the statistical analysis, One-Way ANOVA was applied for the evaluation of the CST and the evaporimetry results; while Student's t-test (paired comparisons) was used for the rectal biopsy test, considering a significance level of 0.05. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas.

*Results:* Statistically significant differences were found in the evaluation of CFTR function in the rectal biopsy test between CFPI (CF with pancreatic insufficiency) and CFPS (CF with pancreatic sufficiency) ( $p < 0.001$ ); while the results of TSC were superior in CFPS and CFPI patients in comparison to Control Negative for Cystic Fibrosis (C) and Heterozygous (Hz) subjects, with  $p < 0.001$ . On the other hand, the evaporimetry discriminated better CFTR function levels in the milder spectrum of the disease, being able to distinguish between Hz and C ( $p < 0.001$ ) and between CFTR-RD and Hz ( $p < 0.001$ ), while undistinguishable between CFPS and CFPI, showing absence of CFTR-function for both.

*Conclusion:* The evaporimetry shows to be a new and useful tool to further elucidate uncertain CF diagnoses and in conjunction with rectal biopsy test and CST, may also contribute to the diagnosis of CFTR-RD patients.

*Keywords:* CFTR Protein; Cystic Fibrosis; Diagnosis, Evaporimetry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Representação do gene <i>CFTR</i> contendo os íntrons e os éxons .....	18
<b>Figura 2:</b> Representações tridimensionais e bidimensionais da estrutura do regulador de condutância transmembrana da fibrose cística .....	19
<b>Figura 3:</b> Classificação das mutações do gene <i>CFTR</i> e respectivas estratégias terapêuticas .....	21
<b>Figura 4:</b> Prevalência de nascidos vivos com fibrose cística e suas mutações mais comuns.....	23
<b>Figura 5:</b> Distribuição dos pacientes com diagnóstico de fibrose cística no Brasil quanto a região de nascimento .....	24
<b>Figura 6:</b> Esquema da perspectiva histórica da fibrose cística no mundo .....	25
<b>Figura 7:</b> Fisiopatologia da doença pulmonar da fibrose cística e principais alvos das terapias atuais e emergentes .....	27
<b>Figura 8:</b> Características cardinais da fibrose cística .....	28
<b>Figura 9:</b> Recomendações do Consenso da <i>Cystic Fibrosis Foundation</i> de 2017 para o diagnóstico de fibrose cística .....	36
<b>Figura 10:</b> Estimulação para a coleta de suor no teste do suor clássico .....	39
<b>Figura 11:</b> Fragmentos de biópsias retais e câmara de Ussing .....	41
<b>Figura 12:</b> Curvas de resposta da diferença de potencial nasal .....	42
<b>Figura 13:</b> Diagrama representando os dois componentes da secreção da glândula do suor .....	44
<b>Figura 14:</b> Paciente de nove anos sendo submetido à evaporimetria.....	44
<b>Figura 15:</b> Desenho do estudo .....	48
<b>Figura 16:</b> Fluxograma dos procedimentos para o Grupo 2 .....	51
<b>Figura 17:</b> Traçados típicos da evaporimetria .....	53
<b>Figura 18:</b> Traçados típicos obtidos na câmara de Ussing apartir de estudos eletrofisiológicos em fragmentos de mucosa retal (teste de biópsia retal) .....	54

<b>Figura 19:</b> Caracterização do Grupo 1 .....	56
<b>Figura 20:</b> Distribuição de idade dos indivíduos do Grupo 1 .....	58
<b>Figura 21:</b> Distribuição de <i>Z-score</i> - indivíduos com idade até 19 anos (Grupo 1) ...	58
<b>Figura 22:</b> Distribuição do índice de massa corpórea - indivíduos com idade acima de 19 anos (Grupo 1) .....	59
<b>Figura 23:</b> Distribuição do volume expiratório forçado no 1º segundo (Grupo 1) .....	59
<b>Figura 24:</b> Caracterização presuntiva do Grupo 2 .....	60
<b>Figura 25:</b> Distribuição de idade dos indivíduos do Grupo 2 .....	62
<b>Figura 26:</b> Distribuição de <i>Z-score</i> - indivíduos com idade até 19 anos (Grupo 2) ...	62
<b>Figura 27:</b> Distribuição de índice de massa corpórea - indivíduos com idade acima de 19 anos (Grupo 2) .....	63
<b>Figura 28:</b> Distribuição de volume expiratório forçado no 1º segundo (Grupo 2) .....	63
<b>Figura 29:</b> Descrição da classificação diagnóstica dos indivíduos após junção dos dois Grupos .....	64
<b>Figura 30A:</b> Resumo da função da proteína CFTR medida como Ieq-cAMP (teste de biópsia retal) .....	68
<b>Figura 30B:</b> Resumo da função da proteína CFTR medida como Ieq-CCH (teste de biópsia retal) .....	68
<b>Figura 30C:</b> Leitura da função da proteína CFTR por evaporimetria .....	69
<b>Figura 30D:</b> Função da proteína CFTR medida com o teste de suor clássico .....	69
<b>Figura 31A:</b> Comparação da função da proteína CFTR medida com TSC e com evaporimetria, expresso como razão beta / chol .....	71
<b>Figura 31B:</b> Comparação da função da proteína CFTR medida por diferença de potencial em fragmentos de mucosa retal (Ieq-cAMP) e por evaporimetria .....	72
<b>Figura 31C:</b> Comparação da função da proteína CFTR medida por diferença de potencial em fragmentos de mucosa retal (Ieq-CCH) e por evaporimetria .....	72
<b>Figura 32:</b> Descrição comparativa entre o teste de suor clássico, o teste de biópsia retal e a evaporimetria .....	73

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Diagnóstico clínico da doença FC definido por características fenóticas associadas a anormalidades da função CFTR .....	35
<b>Quadro 2:</b> Recomendações da Conferência 2015 da <i>Cystic Fibrosis Foundation</i> relacionadas ao diagnóstico de fibrose cística em pacientes não submetidos ao teste de triagem neonatal .....	37
<b>Quadro 3:</b> Sinais e sintomas clínicos apresentados fora do contexto da triagem neonatal .....	37
<b>Quadro 4:</b> Critérios de inclusão .....	49
<b>Quadro 5:</b> Vantagens e limitações dos testes de diagnóstico funcional avaliados ...	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores de <i>cut-off</i> diagnóstico para evaporimetria .....	53
<b>Tabela 2:</b> Características clínicas de indivíduos do Grupo 1 .....	57
<b>Tabela 3:</b> Resultados observados em tomografia de tórax de indivíduos do Grupo 1 .....	57
<b>Tabela 4:</b> Características clínicas de indivíduos do Grupo 2 .....	61
<b>Tabela 5:</b> Resultados observados em tomografia de tórax de indivíduos do Grupo 2 .....	61
<b>Tabela 6:</b> Apresentação clínica, caracterização demográfica, genótipos, classificação diagnóstica e resultados das técnicas de eletrofisiologia - Grupo 1 .....	65
<b>Tabela 7:</b> Apresentação clínica, caracterização demográfica, genótipos, classificação diagnóstica e resultados das técnicas de eletrofisiologia - Grupo 2 .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA	Aspergilose Broncopulmonar Alérgica
Assintom	Assintomático
<i>Borderline</i>	Valores limítrofes
<i>Bronch</i>	Bronquiectasia
C	Controles Negativos para FC
Ca <sup>2+</sup>	Íon Cálcio
cAMP	Adenosina 5-monofosfato cíclico
CBAVD	Ausência Congênita Bilateral dos Ductos Deferentes
CCH	Carbacol
CFF	<i>Cystic Fibrosis Foundation</i> (Fundação Fibrose Cística)
CFPI	Fibrose Cística com Insuficiência Pancreática
CFPS	Fibrose Cística com Suficiência Pancreática
CFSPID	<i>Cystic Fibrosis Screen Positive Inconclusive Diagnosis</i> (Diagnóstico Inconclusivo Pós Triagem Neonatal)
CFTR	Regulador da Condutância Transmembrana em Fibrose Cística
CFTR-Cl <sup>-</sup>	CFTR como Canal de Cloreto
CFTR-RD	Doenças Relacionadas à CFTR
Ciped	Centro de Investigação em Pediatria
Cl <sup>-</sup>	Íon cloreto
CRMS	Síndrome Metabólica Relacionada à CFTR
DPN	Diferença de Potencial Nasal
ENaC	Canal Epitelial de Sódio
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fibrose Cística
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GI	Gastrointestinal
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
Hep	Hepático
H <sub>z</sub>	Heterozigoto
ID	Intradérmica
IFSP	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
IMC	Índice de Massa Corpórea
ICM	Medida da Corrente Intestinal
IP	Insuficiência Pancreática
Lafic	Laboratório de Fibrose Cística

Lafip	Laboratório de Fisiologia Pulmonar
mEq/L	Miliequivalente por litro
MSD	Domínio Transmembranar
MVCC	Mutações de Consequências Clínicas Variadas
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
NaCl <sup>-</sup>	Cloreto de sódio
NDB	Domínio de Ligação a Nucleotídeo
Pancr	Pancreático
RD	Domínio Regulador
Sinopulm	Sinopulmonar
Soid	Síndrome da Obstrução do Intestino Distal
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TS	Teste do suor
TSC	Teste de Suor Clássico
TTN	Teste de Triagem Neonatal
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
VEF <sub>1</sub>	Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo
V <sub>te</sub>	Tensão/Voltagem Transepitelial
WHO	<i>World Health Organization</i> - Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

	PÁGINAS
INTRODUÇÃO .....	18
1.1. O gene e a proteína CFTR.....	18
1.1.1. <i>Definição</i> .....	18
1.1.2. <i>Estrutura</i> .....	19
1.1.3. <i>Genética</i> .....	20
1.2. Fibrose Cística (FC) .....	22
1.2.1. <i>Definição e prevalência</i> .....	22
1.2.2. <i>Histórico</i> .....	25
1.2.3. <i>Fisiopatologia</i> .....	26
1.2.4. <i>Fenótipo</i> .....	30
1.3. <i>Doenças Relacionadas a CFTR (CFTR-RD)</i> .....	32
1.3.1. <i>Definição</i> .....	32
1.3.2. <i>Ausência congênita bilateral dos ductos deferentes (CBAVD)</i> .....	32
1.3.3. <i>Pancreatite crônica ou aguda recorrente</i> .....	33
1.3.4. <i>Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA)</i> .....	33
1.3.5. <i>Bronquiectasia difusa</i> .....	33
1.4. Diagnóstico da FC .....	34
1.4.1. <i>Teste de suor clássico (TSC)</i> .....	38
1.4.2. <i>Teste de biópsia retal: avaliação da função da CFTR por medida da corrente intestinal em fragmentos de biópsia retal em câmara de Ussing</i> .....	40
1.4.3. <i>Diferença de Potencial Nasal (DPN)</i> .....	41
1.4.4. <i>Evaporimetria: estimulação <math>\beta</math>-adrenérgica da CFTR (glândula sudorípara)</i> .....	43
JUSTIFICATIVA .....	45
OBJETIVOS .....	46
3.1. Gerais .....	46
3.2. Específicos:.....	46
MÉTODOS .....	46
4.1. Aspectos éticos .....	46



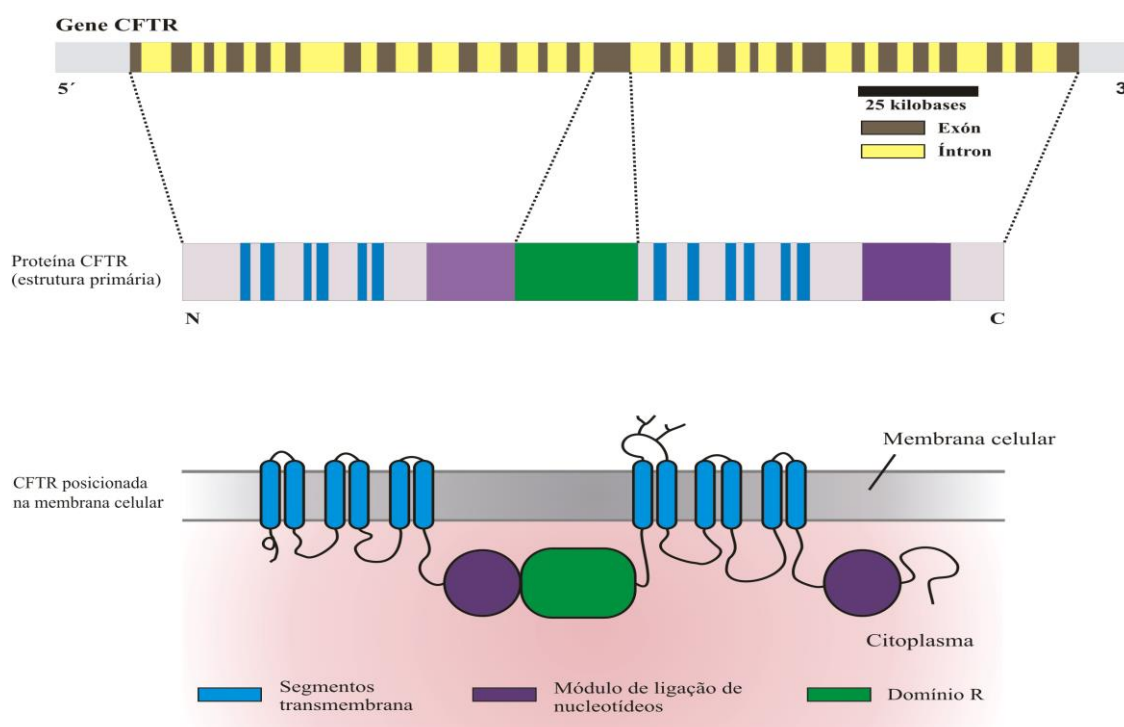
4.2. Modelo do estudo .....	47
4.3. Participantes .....	47
4.3.1. Grupo 1 .....	47
4.3.2. Grupo 2 .....	48
4.4. Teste do suor clássico (TSC) .....	51
4.5. Teste de secreção beta-adrenérgica/ Evaporimetria.....	52
4.6. Avaliação da função da proteína CFTR em fragmentos de biópsia retal (Teste de Biópsia Retal) .....	54
4.7. Sequenciamento gene <i>CFTR</i> .....	55
4.8. Estatística.....	55
RESULTADOS .....	56
5.1. Caracterização do Grupo 1 .....	56
5.2. Interpretação diagnóstica e caracterização de indivíduos suspeitos de FC / CFTR-RD - Grupo 2 .....	60
5.3. Secreção de Cl <sup>-</sup> -mediada por CFTR em biópsias retais (teste de biópsia retal) e ensaio secretor de suor beta-adrenérgico (evaporimetria) .....	67
DISCUSSÃO .....	72
CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77
ANEXO 1: TCLE – Paciente menor (Biópsia Retal) .....	82
ANEXO 2: TCLE – Paciente maior (Biópsia Retal) .....	84
ANEXO 3: TCLE – Paciente menor.....	86
ANEXO 4: TCLE – Paciente maior.....	88
ANEXO 5: Parecer Consubstanciado - CEP (Unicamp).....	90

## INTRODUÇÃO

### 1.1. O gene e a proteína CFTR

#### 1.1.1. Definição

Em 1989 foi identificado o gene *CFTR* (do inglês *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) como causador da doença Fibrose Cística (FC) (13) (Figura 1). Ele se localiza no braço longo do cromossomo 7 (7q3.1.2), codificando uma proteína de mesmo nome, a proteína reguladora da condutância transmembrana na fibrose cística (CFTR). Tal proteína funciona como um canal regulador do transporte de água e eletrólitos, sendo a sua principal função o transporte de íon cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), dependente de Adenosina 5-Monofosfato Cíclico (cAMP) (14), atuando também na secreção do íon bicarbonato (15). Além disso, relaciona-se também com a regulação de outros canais, como o de sódio ( $\text{Na}^+$ ), o tráfego da membrana, a regulação de pH e a apoptose celular, estando presente na membrana apical de células epiteliais do trato respiratório, pâncreas exócrino, sistema hepatobiliar, trato genital masculino, intestino, rins e glândulas sudoríparas (16, 17).

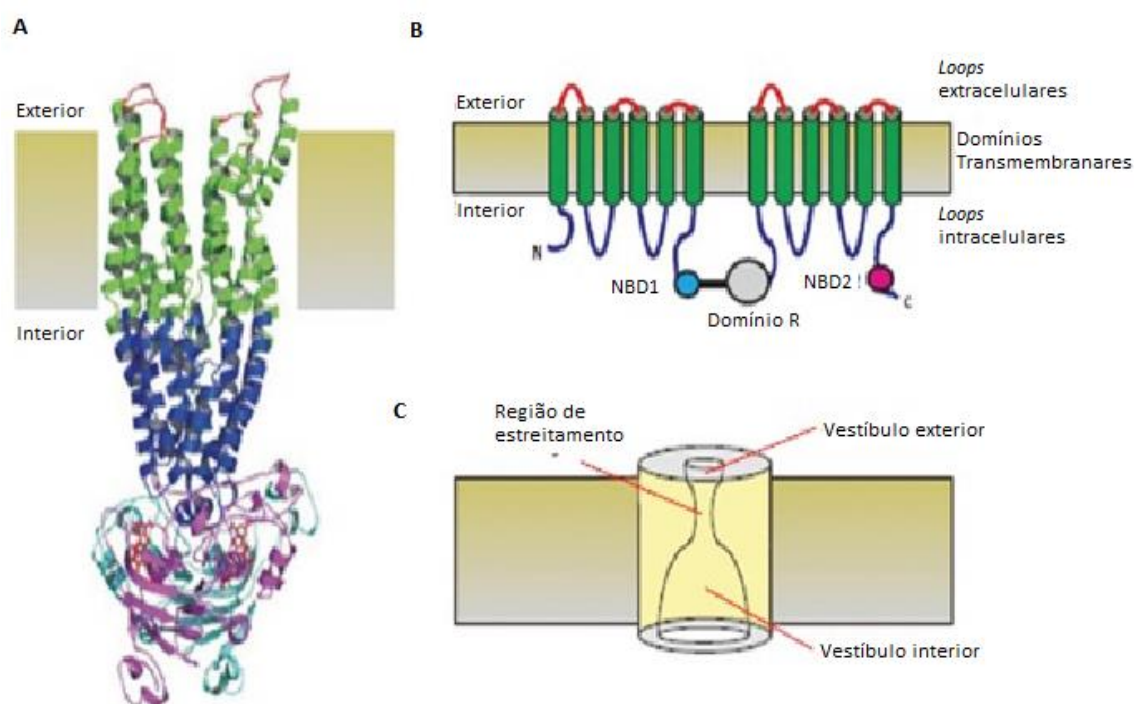


**Figura 1:** Representação do gene *CFTR* contendo os íntrons e os éxons. Modelo proposto para a estrutura da proteína CFTR. Localização da Proteína CFTR na membrana plasmática, segmentos transmembrana (TMD1 e TMD2), domínio R (RD) e módulo de ligação de nucleotídeos (NBD1 e NBD2). Adaptado (18).

### 1.1.2. Estrutura

A CFTR é uma proteína composta por 1.480 aminoácidos, classificada como sendo um transportador ABC (do inglês, *ATP-binding cassette*). Esta família de proteínas incorpora transportadores ativos utilizando ATP, localizados na membrana celular, que são fundamentais para a sobrevivência celular através da geração e manutenção do gradiente de concentração elétrico e químico (19).

Ela é composta por dois domínios transmembranares (MSD, do inglês *membrane spanning domains*), cada um contendo seis segmentos hidrofóbicos. Cada MSD é seguido por um domínio de ligação nucleotídeo, denominados de NBD1 e NBD2 (do inglês, *nucleotide binding domain*), que igualmente participam do transporte de íons. Os dois MSD-NBD são unidos por um domínio regulador (*R domain*), que regula a abertura do poro (20), (Figura 2).



**Figura 2:** Representações tridimensionais e bidimensionais da estrutura do regulador de condutância transmembrana na fibrose cística. A: Modelo de homologia atômica na chamada conformação "canal", ilustrando a extensão aproximada dos *loops* extracelulares, domínios transmembranares, *loops* intracelulares e dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBD1 e NBD2). B: Representação esquemática desses diferentes domínios e do domínio R; C: Modelo funcional da arquitetura de poros. Adaptado (20).

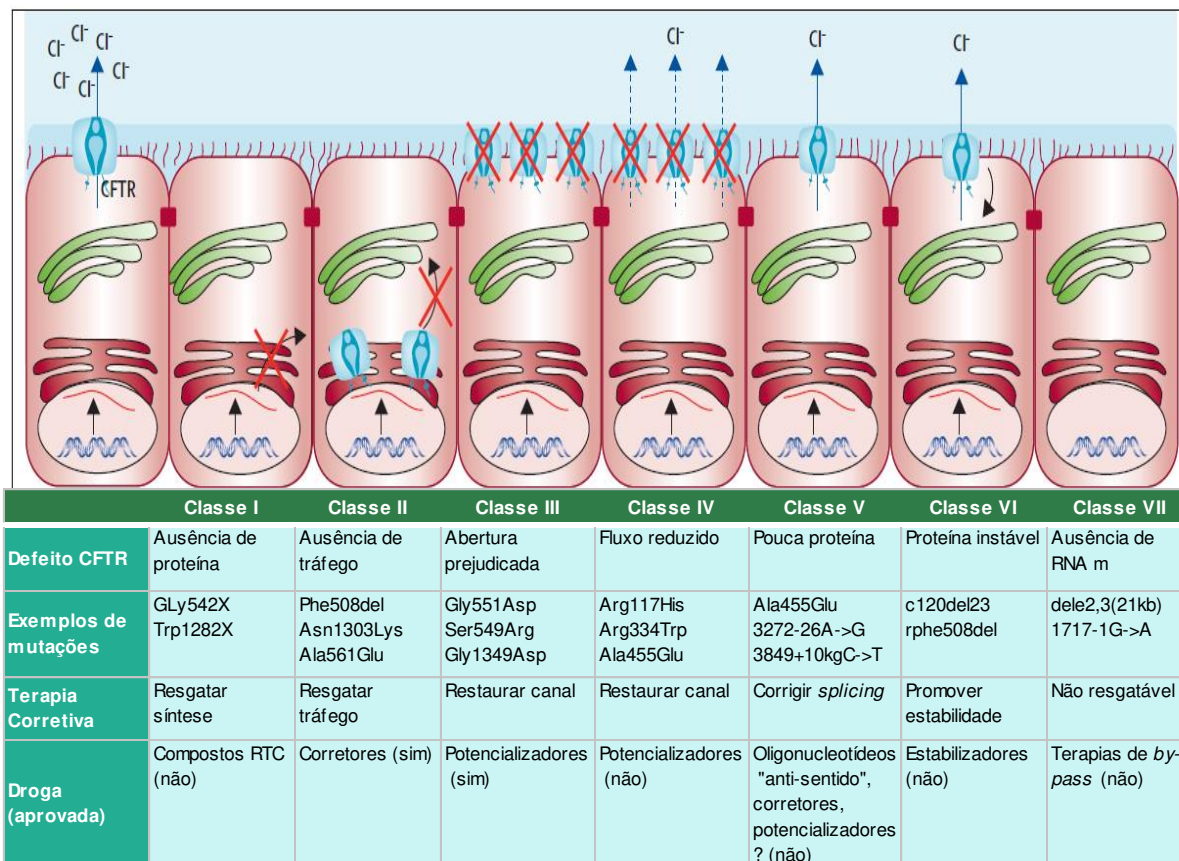
### 1.1.3. Genética

Mutações no gene *CFTR*, associadas a ação de genes chamados modificadores, e a influência do meio ambiente alteram a estrutura e o funcionamento da proteína CFTR, determinando manifestações clínicas multi-sistêmicas (21). Atualmente são descritas aproximadamente 2.000 mutações do gene *CFTR* (22, 23).

Predominando na Europa e na América do Norte, uma única mutação (F508del – a deleção de uma fenilalanina na posição 508) está presente em aproximadamente 85% dos indivíduos com FC (24), enquanto que outras 2.000 diferentes mutações compreendem os demais cromossomos, cada uma contribuindo com uma baixa frequência, sendo que algumas delas apresentam-se de forma mais elevada em populações específicas, porém poucas com frequência maior que 0,1% (25)

Podem-se dividir as mutações em classes, de acordo com a produção, tráfego, função e estabilidade da proteína CFTR. A divisão em classes é didática e auxilia a elaborar estratégias terapêuticas para o tratamento do paciente com FC (26).

Atualmente, já é aceita a divisão em 7 classes, tendo em vista a aplicação da medicina personalizada. As classes anteriormente conhecidas como IA e IB, agora são nomeadas classe I e classe VII respectivamente. Na primeira existe produção de um RNA defeituoso, que acabará por ser degradado, enquanto que na segunda, não existe sequer produção de RNA (24), conforme detalhado na Figura 3. As classes I a III estão geralmente associadas a fenótipos mais graves, enquanto que as classes IV e V estão associadas com fenótipos mais leves e formas com manifestações não clássicas da FC. As classes VI e VII também estão associadas a fenótipos graves (Figura 3).



**Figura 3:** Classificação das mutações do gene CFTR e respectivas estratégias terapêuticas. Adaptado (24).

As mutações de classe I afetam a síntese proteica gerando proteínas incompletas (truncadas), que serão degradadas (27). Isso pode ocorrer por alterações nos sinais de *splicing*, por mudanças nas grelhas de leitura, ou pela formação de códons de parada prematura, que levam à degradação do RNAm (27). Como referido acima, na classe I existe produção de um RNAm que acabará por ser degradado, enquanto que na classe VII, não existe sequer produção de RNA.

Mutações de Classe II, que incluem F508del (28), alteram os eventos de processamento e maturação da proteína, com retenção no retículo endoplasmático pelo mecanismo de controle de qualidade e posterior degradação prematura, afetando o tráfego da proteína e impedindo a sua migração até a membrana celular. Nesta classe há um comprometimento severo da função da proteína CFTR.

As mutações de classe III afetam o domínio regulatório do canal, incapacitando o processo de abertura. A proteína é produzida e transportada até a membrana celular, porém não responde à estimulação do cAMP, por defeitos na fosforilação por cinases no domínio regulador (24, 29, 30).

Mutações de classe IV estão associadas com secreção residual de  $\text{Cl}^-$  e bicarbonato. O gene codifica uma proteína que é transportada para a membrana celular e responde corretamente a estímulos pelo ATP, porém o fluxo de  $\text{Cl}^-$  é reduzido. (27). As mutações de classe V produzem quantidade reduzida da proteína normal de forma que pequenos níveis funcionais são alocados na membrana, produzindo também uma secreção residual de  $\text{Cl}^-$  (30). Mutações de *splicing* alternativo que produzem uma porcentagem de RNAm normal e outra aberrante estão dentro desta categoria (24). No entanto, níveis de expressão de pelo menos 5% de RNAm normal estão associados ao melhor prognóstico da doença (31)

As mutações de classe VI levam a produção de proteínas que possuem tempo de permanência reduzido na membrana apical das células em virtude da baixa estabilidade (32). Isso pode ocorrer pelo aumento da endocitose da proteína ou diminuição do seu processo de reciclagem de volta à superfície celular (24).

Mekus e colaboradores (33), estudando polimorfismos em famílias com irmãos gêmeos com FC, determinaram que além das mutações no gene *CFTR*, os polimorfismos em outros genes somados ao meio ambiente atuam modificando a expressão clínica da FC. São vários os genes que atuam modulando a gravidade clínica da FC acarretando um amplo espectro fenotípico(34, 35).

Podemos dizer que a classificação das doenças que expressam o defeito no gene *CFTR* é complexa, não só por causa das várias mutações até hoje descritas, mas também porque a sua expressão fenotípica pode ser modulada por polimorfismos e variações não classificadas (36). Desta forma, a relação entre a mutação genética e o fenótipo não se demonstra tão exata quando se pensava anteriormente (37).

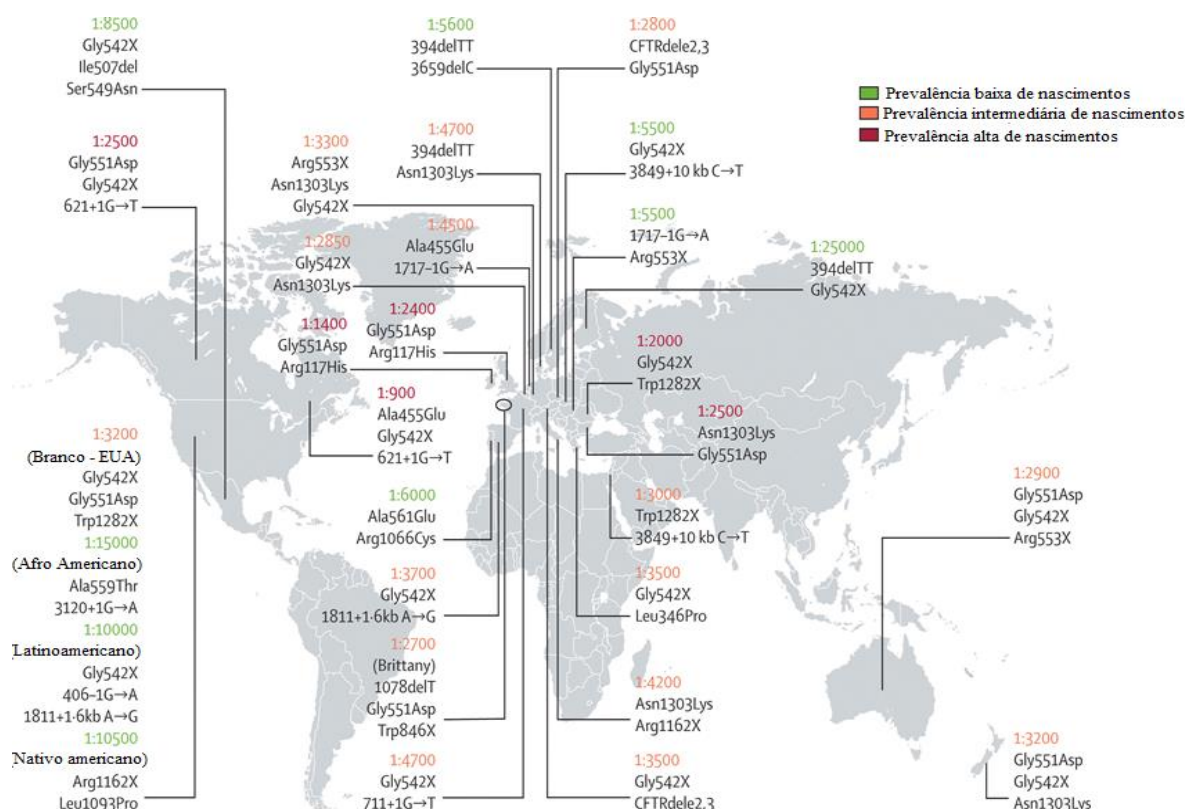
## 1.2. Fibrose Cística (FC)

### 1.2.1. Definição e prevalência

Descrita como a doença rara mais comum que limita a vida em todo o mundo (24) ou mesmo como a doença grave autossômica resseciva mais comum em caucasianos no mundo (23). A incidência mundial estimada de FC é de 2.500–4.000 nascidos-vivos (38), com predominância na Europa, América do Norte e Australásia, sendo rara na população árabe, no leste da Ásia e maior parte da África, em população não descendente de europeus (39).

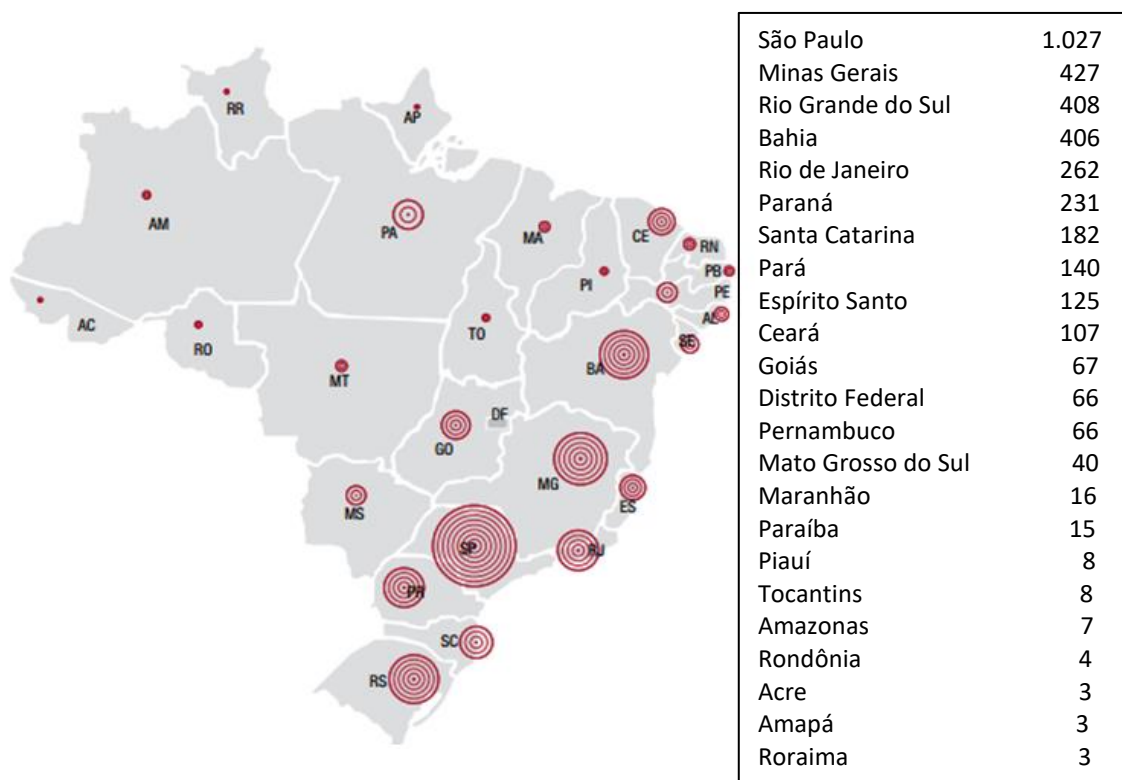
Portanto, a FC afeta mais de 85.000 indivíduos em todo do mundo, incluindo mais de 35.000 só na Europa, com uma reconhecida heterogenicidade na distribuição geográfica. Observa-se na Figura 4 a prevalência das mutações mais comuns em alguns países selecionados (24, 40).

Na Europa, aproximadamente um a cada 2.000 a 3.000 neonatos é diagnosticado com a doença e nos Estados Unidos a incidência é de um pouco menos de um para cada 3.500 nascimentos (40, 41), conforme Figura 4.



**Figura 4:** Prevalência de nascidos vivos com fibrose cística e suas mutações comuns. Adaptado de O'Sullivan BP, Freedman SD (40)

No Brasil, um país de grande miscigenação racial, a doença pode se manifestar em qualquer região, sendo a incidência estimada para a região sul próxima a da população centro europeia, enquanto que para as outras regiões é de 1:10.000 nascidos vivos (42, 43), conforme Figura 5.

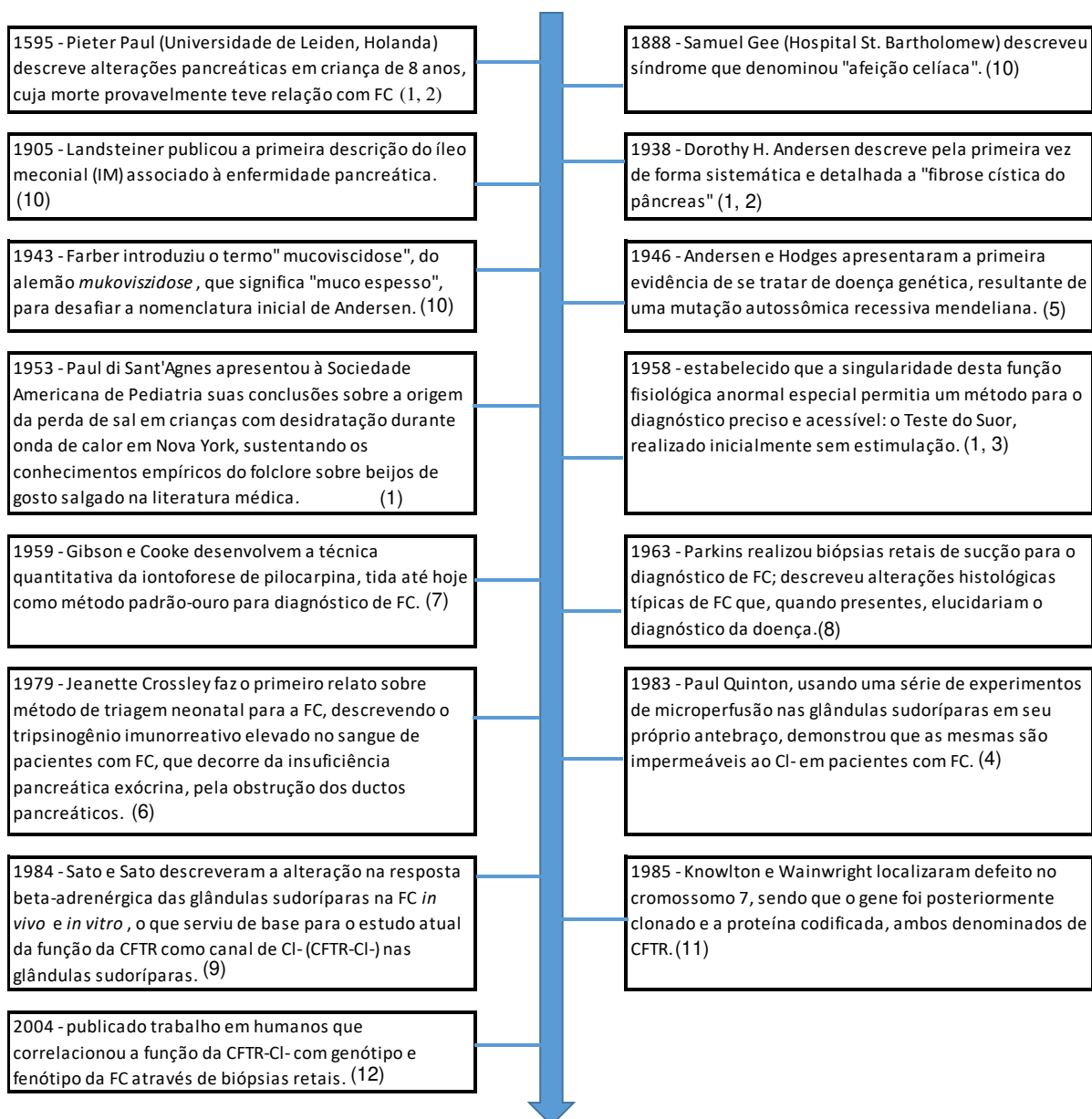


**Figura 5:** Distribuição dos pacientes com diagnóstico de fibrose cística no Brasil quanto a região de nascimento (44)



### 1.2.2. Histórico

A percepção de que crianças com suor mais salgado poderia indicar alguma doença é bem antiga, pois esse fato já encontrava lugar no folclore medieval. Uma série de acontecimentos marcam a história da FC no mundo e sua evolução (Figura 6).



**Figura 6:** Esquema da perspectiva histórica da Fibrose Cística no mundo.

Nessas últimas décadas houve uma importante evolução no tratamento da FC, com novas frentes sendo exploradas, porém os avanços terapêuticos ainda não nos permitem abandonar o tratamento sintomático. Pesquisas visando otimizá-lo têm se concentrado em melhorar o clearance mucociliar, encontrar um equilíbrio para a resposta inflamatória, manter o controle das infecções respiratórias visando alterar o biofilme com novos compostos, assim como avaliar também os bacteriófagos (vírus que infectam bactérias) que auxiliam no controle da infecção na FC, como mostrado de forma esquemática na Figura 7 (45-47).

Algumas drogas que potencializam a função da proteína CFTR já mostram resultados terapêuticos, sendo que outras novas também estão sendo analisadas (24). Atualmente já há a possibilidade de se avaliar o resultado terapêutico de tais drogas com testes funcionais *in vivo* e *ex vivo* com organoides intestinais e células cultivadas a partir de escovado brônquico e do epitélio nasal, introduzindo assim uma medicina personalizada, o que permite prever qual paciente responderá a determinada droga (24, 48).

O aumento da sobrevivência dos pacientes alerta para a necessidade de programas e investimentos na atenção às doenças hepáticas, diabetes, osteoporose, gravidez, infertilidade, problemas renais crônicos, entre outros.

A avaliação pré-natal e pré-implantação embriônica, assim como a abordagem dos parentes como potenciais portadores, são tópicos emergentes na realidade atual e futura da doença FC.

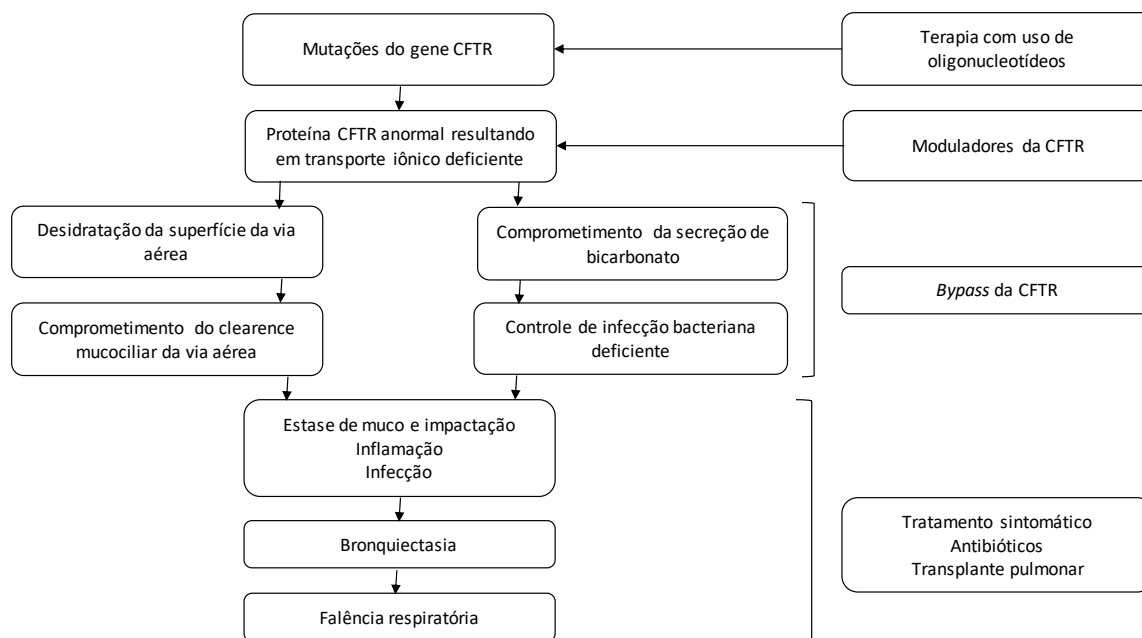
Consensos, esforços em pesquisa, trocas de informações entre as várias associações e registros em todo o mundo ajudarão a manter uma crescente evolução na abordagem do indivíduo com FC e doenças relacionadas a CFTR(49).

Os avanços no campo da genética assim como farmacológicos, com o uso de novas drogas, permitirá que muito menos tratamento convencional seja necessário para o cotidiano do indivíduo com FC (24).

### 1.2.3. Fisiopatologia

A ausência na produção da proteína CFTR ou o prejuízo na sua função determinam alteração na secreção de Cl<sup>-</sup>, água e outros íons. Como consequência, ocorre modificação do pH, desidratação e aumento da viscosidade das secreções nas glândulas exócrinas, com consequente precipitação e obstrução do lumen

ductal. Inflamação, infecção, fibrose e destruição funcional e anatômica dos tecidos acometidos aparecem como consequência (50). A Figura 7 exemplifica os eventos que ocorrem na doença pulmonar na FC e suas propostas terapêuticas.

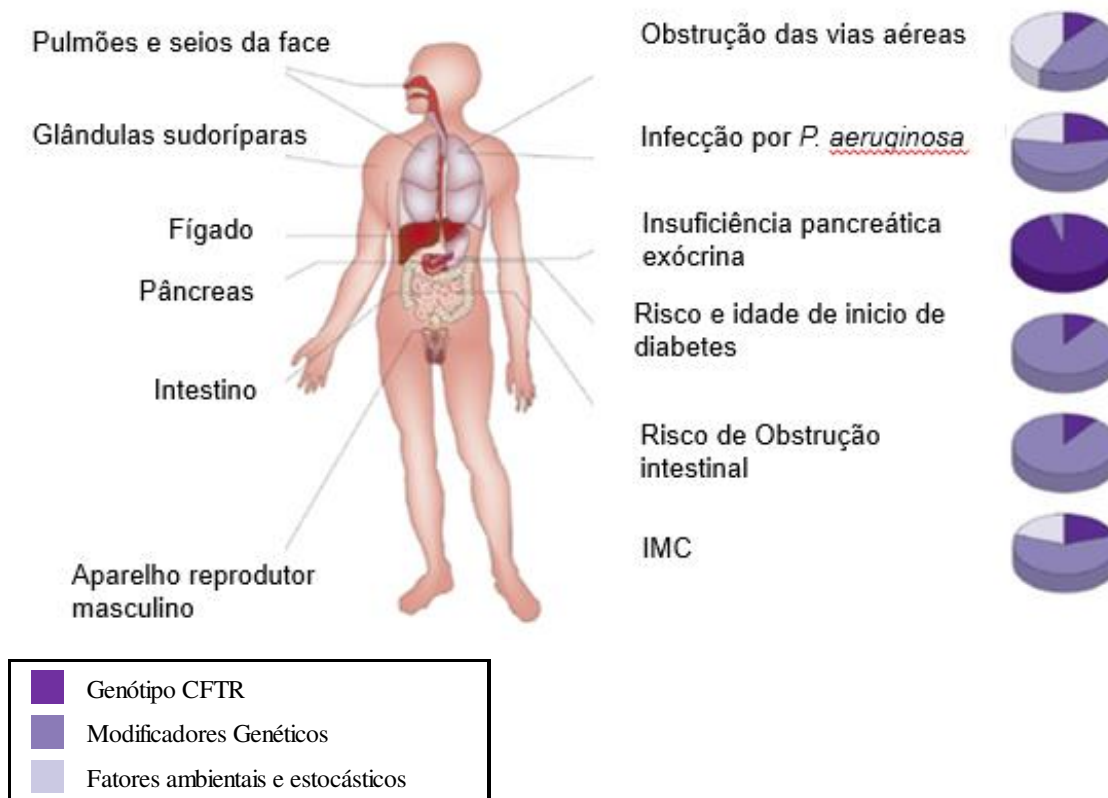


**Figura 7:** Fisiopatologia da doença pulmonar da fibrose cística e principais alvos das terapias atuais e emergentes. (Adaptado (46))

A fisiopatologia da doença no órgão afetado depende também da contribuição da proteína CFTR na secreção de sal e água em relação à atividade de outras vias. O impacto em diferentes órgãos e sistemas se relaciona ao local de expressão da CFTR no tecido e o desenvolvimento das consequências da sua quebra ou ausência de função. Isto é, estima-se que a diminuição de 20% da secreção de  $\text{Cl}^-$  já é suficiente para produzir degeneração obstrutiva dos ductos deferentes, enquanto que apenas 20% de função do CFTR são necessários para a manutenção da suficiência pancreática na FC (51).

Mutações no gene *CFTR* associadas à ação de genes chamados modificadores e à influência do meio ambiente alteram a quantidade e o funcionamento da proteína CFTR, determinando manifestações clínicas multi-sistêmicas que caracterizam a doença FC e doenças relacionadas a essas mutações. Cada um desses fatores contribui de forma distinta para o fenótipo da doença, podendo ser citado como exemplo deste fato o comprometimento pancreático exócrino que está altamente relacionado com a mutação genética,

havendo pouca participação de genes modificadores. Por outro lado, o risco para o diabetes e obstrução intestinal depende predominantemente da ação desses genes modificadores, conforme demonstrado na Figura 8 (52).



**Figura 8:** Características cardinais da fibrose cística. Adaptado: (52)

As alterações gastrointestinais na FC se devem ao comprometimento do fígado, vesícula biliar e intestino. Manifestações associadas incluem insuficiência do pâncreas exócrino, prejuízo na secreção de bicarbonato e bile e formação anormal de muco, comumente levando a má digestão e má absorção de gordura, proteínas e vitaminas lipossolúveis. Podem contribuir para a má digestão e má absorção o supercrescimento bacteriano, a disfunção da musculatura circular entérica, a produção anormal de muco e a inflamação intestinal.

A obstrução intestinal é parte das manifestações gastrointestinais da FC sendo que o íleo meconial se caracteriza como a manifestação precoce da doença, ocorrendo em 15% dos recém-nascidos com FC (53). A Síndrome da Obstrução do Intestino Distal (Soid) manifesta-se em crianças mais velhas e adultos (54). Tendo em vista que 90% dos diagnósticos de tais entidades estão relacionados à FC, torna-

se fundamental iniciar o tratamento da doença nestes pacientes antes mesmo do estabelecimento do diagnóstico definitivo (42).

A doença hepática relacionada à FC não tem marcadores específicos. Seu diagnóstico se baseia nas manifestações clínicas, alterações bioquímicas e de ultrassonografia. Ocorrendo em 2 a 37% das crianças e adultos jovens, pode ser a terceira maior causa de morte entre os portadores da doença, seguindo as complicações respiratórias e o transplante pulmonar (55, 56). Acredita-se que o comprometimento hepatobiliar aconteça nos pacientes com as mutações classificadas como mais graves, ou seja, as que pertencem às classes I-III (56).

A doença pulmonar é a maior causa de morbidade e mortalidade na FC, evoluindo de forma progressiva, atingindo praticamente 100% dos indivíduos com a doença. Esses pacientes apresentam inflamação do trato respiratório inferior, infecção, bronquiectasias, lesões císticas com prejuízo irreversível da função pulmonar e com evolução para fibrose. O muco espesso e o *clearance* mucociliar diminuído predis põem à sinusite, bronquite, pneumonia, bronquiectasia, fibrose e falência respiratória. A retenção de muco facilita a colonização bacteriana, inflamação, impactação mucóide, metaplasia do epitélio brônquico e desorganização do aparelho mucociliar, o que caracteriza um ciclo relacionado a lesão bronquiectásica na FC. Apesar do tratamento, muitos pacientes com FC evoluem para bronquiectasias e doença das pequenas vias aéreas, sendo o exame tomográfico o padrão-ouro para a monitorização da doença pulmonar fibrocística (57).

A infecção do trato respiratório é um componente importante da doença pulmonar na FC. São exemplos de patógenos envolvidos a *Pseudomonas aeruginosa*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp., *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), fungos, micobactérias não tuberculosa além de bactérias anaeróbicas (58-60).

O progresso no tratamento da doença traz consigo um aumento na sobrevivência dos pacientes com FC e o conseqüente aparecimento de sintomas pouco observados anteriormente, constituindo um novo desafio no manejo da doença (23, 61-66).

#### 1.2.4. Fenótipo

Nos últimos anos, observa-se um aumento significativo nas informações referentes ao fenótipo e genótipo envolvendo a FC. Os consensos atuais buscam harmonizar a terminologia envolvida na doença e em outras entidades associadas às mutações no gene *CFTR* juntamente com os critérios diagnósticos: FC, Síndrome Metabólica Relacionada a CFTR (do inglês *CFTR-Related Metabolic Syndrome, CRMS*), Diagnóstico Inconclusivo Pós Triagem Neonatal (do inglês, *Cystic Fibrosis Screen Positive Inconclusive Diagnosis, CFSPID*) e Doenças Relacionadas à CFTR (CFTR-RD-do inglês, *CFTR-Related Disorders*). Os termos FC clássica / não clássica, FC típica / atípica e FC tardia devem ser evitados pois não há uma definição de consenso e, portanto, pode trazer confusão entre familiares e cuidadores, embora sejam utilizados pelas sociedades européias (23).

##### 1.2.4.1. Fibrose Cística

A FC caracteriza-se por manifestações multisistêmicas, apresentando insuficiência pancreática exócrina, manifestando-se com esteatorréia e desnutrição por má absorção de vitaminas, proteínas e gorduras, íleo meconial, além da ocorrência de Soid e doença hepática, podendo chegar a cirrose biliar, azoospermia congênita e bilateral e comprometimento pulmonar progressivo, evoluindo para *cor pulmonale*. A FC pode se apresentar dessa forma mais característica, acarretando maior severidade, o que anteriormente era designada como doença clássica ou típica.

No entanto, 10 a 15% dos doentes de FC podem apresentar manifestações mais tardias, associadas a suficiência pancreática, refletindo alguma taxa de função da CFTR. Tais manifestações podem incluir pancreatite aguda recorrente ou pancreatite crônica, sintomas respiratórios ou otorrinolaringológicos crônicos e azoospermia, caracterizando uma doença mais suave e com melhor prognóstico, o que era anteriormente designada como doença não clássica ou atípica. Nesses casos, os resultados do TSC podem ser normais, limítrofes (*borderline*) ou com valores anormais, porém com valores mais baixos dos que os apresentados por indivíduos com fenótipo mais severo, trazendo por vezes, dificuldades no diagnóstico definitivo (23, 52, 62, 67, 68).

#### 1.2.4.2. CFTR-Related Metabolic Syndrome (CRMS) / Cystic Fibrosis Screen Positive Inconclusive Diagnosis (CFSPID)

O termo *CFTR-Related Metabolic Syndrome* é utilizada nos EUA (Estados Unidos da América) enquanto que o termo *Cystic Fibrosis Screen Positive Inconclusive Diagnosis* é utilizado em outros países, sendo que ambos definem a mesma condição: resultado positivo para o Teste de Triagem Neonatal (TTN) e testes genéticos ou funcionais inconclusivos, sem características que preencham critérios diagnósticos para FC, apresentando uma das condições abaixo:

- TSC < 30 mmol/L e duas mutações das quais ao menos uma delas se relaciona a características fenotípicas não definidas, **ou**
- Resultado do TSC com valor intermediário (30 a 59 mmol/L) e uma ou nenhuma mutação causadora de FC.

Os consensos atuais orientam que tais crianças deverão ser acompanhadas ao longo do tempo para melhor definição diagnóstica e para tanto devem :

- repetir o TSC em centro especializado em FC
- manter seguimento por especialista a fim de detectar características clínicas que poderão aparecer ao longo do tempo
- ter a indicação considerada para sequenciamento genético (gene *CFTR*), assim como a realização de testes funcionais (Diferença de Potencial Nasal e teste de biópsia retal)
- ser reclassificada em relação à FC, considerando os resultados de testes funcionais, teste genético e posicionamento do médico responsável pelo seguimento do paciente em questão
- ter seus familiares com acesso a aconselhamento genético (23)

#### 1.2.4.3. Doenças relacionadas a CFTR (CFTR-RD, do inglês CFTR-Related Disorders)

Recentemente têm-se observado doenças relacionadas com mutações no gene *CFTR*, em que os indivíduos portadores apresentam uma forma leve da doença FC, comprometendo um órgão apenas, podendo verificar-se envolvimento

respiratório discreto, suficiência pancreática e resultados do TSC intermediários (*borderline*, i.e., 30 a 59 mmol/l) (69).

Desta forma, o diagnóstico de desordem relacionada à CFTR foi definido como uma entidade clínica monossintomática, podendo apresentar-se com ausência bilateral congênita do ducto deferente ou pancreatite aguda recorrente ou crônica ou bronquiectasias difusas, associada a algum grau de disfunção CFTR, mas não cumprindo os critérios diagnósticos para FC (23, 70).

### 1.3. Doenças Relacionadas a CFTR (CFTR-RD)

#### 1.3.1. Definição

Como referido acima, a CFTR-RD é uma entidade clínica monossintomática, associada à disfunção da proteína CFTR, que não preenche os critérios diagnósticos para a FC (70). Ausência Congênita Bilateral dos Ductos Deferentes (CBAVD), bronquiectasias difusas, pancreatite crônica ou aguda recorrente são os exemplos mais conhecidos desta entidade, embora outras patologias como a rinosinusite crônica e Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA) devam ser observados com cuidado no diagnóstico desta categoria (23, 70-72).

Atualmente tais doenças têm sido consideradas no contexto da disfunção da proteína CFTR e de outros transportadores transmembrana, merecendo um olhar atento por parte dos clínicos e pesquisadores para se acurar seu diagnóstico, prognóstico e tratamento (73).

#### 1.3.2. Ausência congênita bilateral dos ductos deferentes (CBAVD)

Trata-se de uma importante causa de azoospermia obstrutiva, contribuindo para 1 a 5% dos casos de infertilidade masculina (70, 74). Desde a primeira identificação das mutações do gene *CFTR* em indivíduos com CBAVD nos anos 90 (74), estudos têm mostrado que entre 45 a 80% dos pacientes com CBAVD carregam duas mutações no gene *CFTR*, com efeitos leve a severo no comprometimento funcional (72, 75). O fato de se encontrar uma maior frequência das mutações *CFTR* em indivíduos com esta apresentação clínica e que não preenchem os critérios de FC em relação a população normal, permite classificá-los como CFTR-RD (76).



### 1.3.3. *Pancreatite crônica ou aguda recorrente*

Estudos mostraram que 30% dos pacientes com pancreatite crônica carregam uma mutação do gene *CFTR* e 10% apresentam duas mutações (72, 77).

Níveis alterados de  $Cl^-$  no suor e na medição da Diferença de Potencial Nasal (DPN) são encontrados em pacientes com pancreatite crônica com pelo menos uma mutação *CFTR*. Para o desenvolvimento de tal entidade, observou-se que é necessária uma função *CFTR* residual e que a presença de células acinares é essencial para a sua ocorrência, o que não acontece em pacientes com moderada a severa insuficiência pancreática, sugerindo a associação de variantes leves da *CFTR* com a presença de pancreatite crônica (48, 68, 70)

### 1.3.4. *Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA)*

A presença de mutações *CFTR* em pacientes com diagnóstico de ABPA é 67% maior do que na população geral, chegando a 95% quando há a evidência de duas mutações(72).

ABPA em pacientes com suficiência pancreática pode ser classificada como uma *CFTR*-RD, com mutações classe IV e V. Assim, na ABPA relacionada à bronquiectasia, afastar uma *CFTR*-RD é fundamental para estes pacientes (72).

### 1.3.5. *Bronquiectasia difusa*

Pode-se definir bronquiectasia como uma dilatação permanente do brônquio como resultado da destruição dos músculos e do tecido elástico conectivo (78). Na patogênese da bronquiectasia observa-se um ciclo vicioso caracterizado por infecção e inflamação causando dano nos brônquios e bronquíolos, o que determina maior susceptibilidade à infecção e, por consequência, colonização de microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* e micobactérias não tuberculosa. O comprometimento do *clearance* mucociliar leva a liberação de enzimas fagocitárias e quimiocinas que rompem a barreira mucosa com consequente formação de abscessos que permitem a instalação de organismos patológicos, dano da parede e ectasia brônquica. O processo de formação da bronquiectasia tem início com um estreitamento da árvore brônquica provocado por infecção (78, 79).

A prevalência dos casos de bronquiectasia diminuiu no século 20 em virtude da melhoria nas condições de vida da população, vacinação e acesso aos antibióticos. Nos EUA são 52 para cada 10.000 indivíduos adultos. Ocorre mais em mulheres do que em homens, especialmente se a etiologia não for definida (80). Mutações do gene *CFTR* foram encontradas em pacientes com o diagnóstico de bronquiectasia idiopática (81). Diferentes estudos têm demonstrado pelo menos uma mutação *CFTR* em 10% a 50% dos pacientes com diagnóstico de bronquiectasia, sendo que a frequência e a natureza das mutações diferem consideravelmente entre as publicações, com a mutação IVS8-5T tendo sido encontrada numa frequência mais alta do que a esperada. Observa-se também que a frequência de tal mutação é maior em pacientes com CBAVD (77).

#### 1.4. Diagnóstico da FC

Desde a identificação do gene *CFTR* como causador de FC (13, 14, 82), novos desafios têm surgido no diagnóstico e no manejo clínico dessa doença (47, 64, 73).

A triagem neonatal e os inúmeros protocolos que vem surgindo, os avanços nos estudos genéticos identificando novas mutações, a grande variabilidade na disfunção da proteína CFTR determinando fenótipos a serem melhor compreendidos, a influência étnica, a cooperação na coleta de dados internacionais além de avanços laboratoriais, contribuem para a extensão no entendimento dessa doença com novas terminologias e divergências no diagnóstico e prognóstico (23, 61-66).

Um diagnóstico de FC claro e preciso com base no fenótipo e com reconhecimento clínico de sinais e sintomas característicos pode não ser estabelecido facilmente, uma vez que o TSC, padrão diagnóstico considerado em todo o mundo, pode mostrar-se limitado no diagnóstico definitivo de indivíduos oligossintomáticos, identificados como de risco para a doença ou com sintomas leves e ou tardios (64, 66, 73, 83).

A determinação da mutação causadora da disfunção ou ausência da *CFTR* pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico da FC, na identificação de portadores, na correlação do grau de disfunção da proteína CFTR com as manifestações clínicas encontradas, na demonstração de novos fenótipos da doença e mais recentemente, na medicina personalizada e aconselhamento genético (52,

83, 84). Porém, a avaliação genética pode trazer uma contribuição limitada no diagnóstico de pacientes com manifestações atípicas e leves, em populações não caucasianas ou se forem encontradas mutações com consequências desconhecidas ou sem relevância clínica (83, 85).

Tradicionalmente o diagnóstico clínico da doença é definido pela presença de uma ou mais características fenotípicas da FC associada a evidência de uma anormalidade na função da CFTR, conforme Quadro 1 (23)

**Quadro 1:** Diagnóstico clínico da doença FC definido por características fenotípicas associadas a anormalidades da função CFTR (23, 71)

<b>Características Fenotípicas da FC</b>	<b>Anormalidade da Função CFTR</b>
doença sinopulmonar crônica	valor anormal de Cl <sup>-</sup> no suor: > 60 mmol/l;
anormalidades gastrointestinais / nutricionais: íleo meconial, Soid, insuficiência pancreática exócrina com esteatorréia;	presença de duas mutações causadoras de doença no gene <i>CFTR</i> ;
Síndrome de perda de sal	alterações na DPN com medidas características de FC
CBAVD	alteração do transporte de Cl <sup>-</sup> em fragmentos de biópsia retal avaliada em câmara de Ussing

A *Cystic Fibrosis Foundation (CFF)* convocou trinta e dois especialistas em diagnóstico de FC provenientes de nove países diferentes com o objetivo de desenvolver diretrizes diagnósticas e padronizar definições e terminologias utilizadas para FC e transtornos relacionados a CFTR. Como resultado do trabalho desses especialistas surgem recomendações com a aprovação de ao menos 80% de votos favoráveis entre os participantes, para cada recomendação. Após as normatizações serem acordadas, foram então apresentadas à *European CF Society* no encontro anual do Grupo de Trabalho em Diagnóstico, em fevereiro de 2016, citando-se abaixo algumas destas recomendações(23, 62):

a) Todos os indivíduos com o diagnóstico de FC devem ter um TSC e um teste genético realizado.

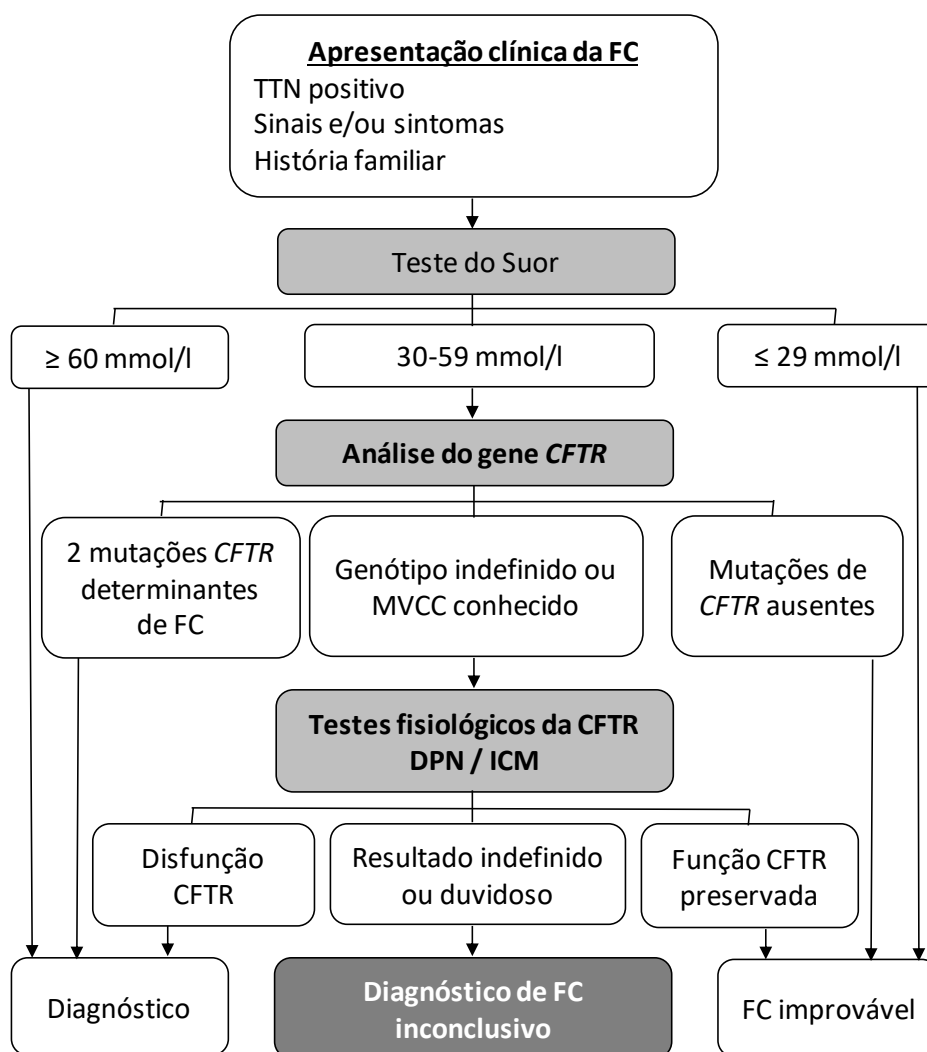
b) Indivíduos com TSC < 30mmol/l podem ter FC como diagnóstico caso diagnósticos diferentes tenham sido excluídos e outros testes confirmatórios (genético e fisiológico) tenham indicado FC.

c) FC é improvável se apenas mutações não causadoras de doença sejam encontradas.

d) Se o diagnóstico de FC não é estabelecido, deve-se considerar CRMS/CFSPID ou mesmo CFTR-RD.

e) Eventualmente pode-se não chegar a uma classificação. Nestes casos pode-se utilizar o termo “portador FC”

A Figura 9 traz um resumo do consenso para a formação de diagnóstico para FC (23)



**Figura 9:** Recomendações do Consenso da CFF de 2017 para o diagnóstico de fibrose cística – adaptado (23). MVCC: mutações com consequências clínicas variadas; ICM: medida da corrente intestinal (biópsia retal).

Considerando que o teste de triagem neonatal é relativamente recente e que sua implantação ainda não é universal, não atingindo vários locais do mundo e,

considerando a possibilidade de falso negativo naqueles indivíduos que foram triados, os consensos atuais observaram a necessidade de padronizar os critérios diagnósticos para a população fora da triagem neonatal, conforme resumido nos Quadros 2 e 3, segundo as recomendações da Conferência de 2015 da CFF (62).

**Quadro 2:** Recomendações da Conferência 2015 da *Cystic Fibrosis Foundation* relacionadas ao diagnóstico de FC em pacientes não submetidos ao teste de triagem neonatal. Adaptado (62)

Declaração número	Consenso	Comentários
25	Para indivíduos apresentando sintomas de FC, deve ser utilizado o mesmo critério diagnóstico recomendado para a população triada para Teste do Suor, análise do gene CFTR e teste funcional de CFTR para a confirmação do diagnóstico de FC.	Representa mudança para os cortes para Teste do Suor. Na declaração anterior, o resultado para Teste do Suor "FC improvável" era < 40 mmol/l; na presente declaração passa a ser < 30 mmol/l.
26	O diagnóstico de Doença Relacionada a FC é definida como uma entidade clínica monossintomática (CBAVD / pancreatites / bronquiectasias) associada com a disfunção de CFTR que não preenche os critérios diagnósticos para FC.	Mostra o esforço internacional para caracterizar este cenário clínico
27	Clínicos deveriam evitar o uso de termos como FC clássico / não clássico, FC típica / atípica e FC tardia, pois estes termos não possuem definição harmonizada e podem confundir familiares ou cuidadores.	European CF Society Diagnostic Network Working Group mantém a classificação FC não clássica ou atípica.

**Quadro 3:** Sinais e sintomas clínicos apresentados fora do contexto da triagem neonatal. Adaptado (62)

Apresentações Clínicas	Primeira apresentação comum de FC	Primeira apresentação incomum de FC *
História familiar	Pais ou irmãos com FC	Pais de criança com diagnóstico de FC
Seios da face	Sinusite crônica, polipose nasal	-
Via aérea inferior	Bronquiectasia, infecção crônica ou recorrente das vias aéreas inferiores (especialmente infecção por <i>Pseudomonas</i> )	ABPA, infecção por micobactéria não tuberculosa, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica
Gastrointestinal / Lumen	Íleo Meconial, Síndrome de Obstrução Intestinal Distal	Motilidade anormal, prolapso retal
Gastrointestinal / Hepatobiliar	Insuficiência pancreática, pancreatite recorrente	Enzimas hepáticas elevadas, icterícia neonatal prolongada, deficiência de vitaminas lipossolúveis (pode-se apresentar como icterícia, anemia, edema, cegueira noturna, rash cutâneo)
Aparelho Reprodutivo	Infertilidade masculina por azospermia obstrutiva (CBAVD)	Infertilidade feminina
Outros	Desidratação hiponatrêmica, dificuldade de crescimento	Síndrome de pseudo-Bartter, rugas de pele, baqueteamento digital

ABPA: Aspergilose broncopulmonar alérgica

\* Muitas das características clínicas incomuns não são incomuns em pacientes com FC (ABPA, infecção por micobactéria não tuberculosa, motilidade anormal, baqueteamento, deficiências vitamínicas). No entanto são incomuns como queixas isoladas em última análise devido a FC. Infecção por micobactéria atípica é fator que mais comumente tem levado ao diagnóstico de FC em adultos.

O diagnóstico da FC pode ainda ser feito na ausência de características fenotípicas da FC:

a) pelo TTN associado a presença de mutações no gene *CFTR* e/ ou dosagens de  $\text{Cl}^-$  no suor alteradas;

ou

b) pelo diagnóstico pré-natal (detecção de duas mutações *CFTR* causadoras de doenças), no caso de familiares com FC.

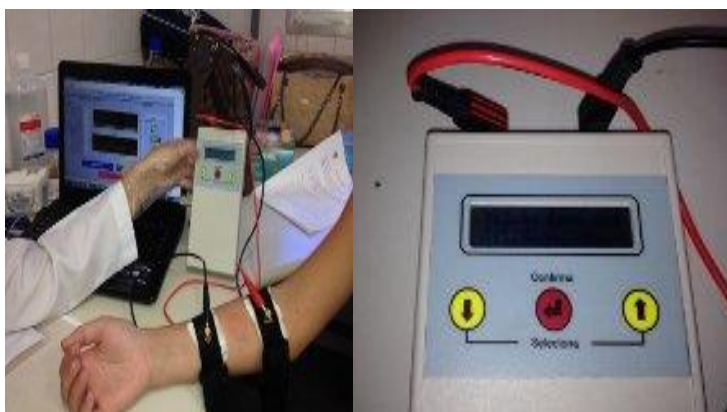
Atualmente é também possível realizar a medição da atividade das glândulas sudoríparas em resposta a estimulação  $\beta$ -adrenergica do suor (evaporimetria), que é o foco principal deste trabalho como medida auxiliar para evidenciar uma anormalidade na função da CFTR e contribuir para distinção de casos difíceis com dúvidas no diagnóstico (48, 66)

Resumindo, classicamente o diagnóstico de FC é confirmado pelo TSC e/ou pela detecção de duas mutações para FC, associado ao quadro clínico compatível com a doença (23, 48).

Como já referido acima, os casos que se apresentam com CBAVD, bronquiectasias difusas, pancreatite aguda recorrente ou crônica, acompanhando a disfunção da proteína CFTR sem preencher os critérios diagnósticos para FC, podem ser definidos como CFTR-RD (48, 70, 73). O diagnóstico diferencial de FC e CFTR-RD só poderá ser realizado através de uma avaliação coordenada, que incorpore os dados clínicos, bioquímicos, funcionais e genéticos. No entanto, devido à variabilidade fenotípica associada a alguns genótipos raros, a interpretação dos dados funcionais apresenta-se como um ponto crítico no desfecho do diagnóstico, o que traz extrema relevância à incorporação nos centros de referência da FC de novas técnicas de diagnóstico, como a medição da DPN, a medição da função CFTR em biópsias retais (teste de biópsia retal), e, mais recentemente, a medição da atividade  $\beta$ -adrenergica na glândula sudorípara, a evaporimetria (48, 86, 87).

#### *1.4.1. Teste de suor clássico (TSC)*

A dosagem quantitativa de eletrólitos no suor,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  é conhecida como TSC, que constitui ainda nos dias de hoje o teste mais confiável e mais amplamente utilizado para o diagnóstico de FC, denominado de padrão-ouro. Ainda é praticamente realizado da mesma forma de quando foi descrito por Gibson & Cooke em 1959 (7), e é baseado na técnica de iontoforese por pilocarpina (Figura 10).



**Figura 10:** Estimulação para a coleta de suor no teste do suor clássico. Arquivo Laboratório AFIP-Centro de Investigação em Pediatria Unicamp (Ciped)

Na glândula sudorípara normal a estimulação adrenérgica induz um fluxo de suor com a ativação da CFTR e do ENaC (canal de  $\text{Na}^+$ ) responsáveis pela reabsorção de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  respectivamente, além de água, resultando no fluxo de um pequeno volume de suor contendo, em média, 16 mmol / L de  $\text{Cl}^-$  e 23 mmol / L de  $\text{Na}^+$  (88). Em pacientes com FC não há a reabsorção de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$ , o que faz com que o suor apresente concentrações aumentadas destes íons.

O TSC pode apresentar resultado falso positivo em algumas entidades endocrinológicas ou metabólicas, que dificilmente se confundem com a FC (89).

Com os conhecimentos atuais sobre fisiopatologia e genética sabe-se que a FC é um “espectro de doença” cujo fenótipo reflete o grau de atividade da CFTR. O TSC pode não espelhar esta atividade em alguns casos e mesmo o estudo molecular isolado por vezes não é suficiente para o diagnóstico da FC, sendo necessários outros métodos auxiliares para a sua confirmação (16, 66).

Os resultados obtidos no TSC podem ser divididos conforme abaixo (23):

- $\leq 29$  mmol/l: FC improvável
- 30-59 mmol/l: duvidoso
- $\geq 60$  mmol/l: FC positiva

#### 1.4.2. Teste de biópsia retal: avaliação da função da CFTR por medida da corrente intestinal em fragmentos de biópsia retal em câmara de Ussing

A secreção de  $\text{Cl}^-$  mediada pela CFTR em fragmentos de epitélio retal (teste de biópsia retal), avalia a função CFTR e constitui um teste sensível para o diagnóstico e avaliação do prognóstico da doença FC (90). Correlações significativas com sintomas clínicos de FC evidenciam o valor deste método como uma ferramenta diagnóstica importante na prática clínica. (12, 87).

A grande concentração de proteína CFTR no epitélio retal e a acessibilidade ao trato gastrointestinal traz vantagem para essa técnica. Há aproximadamente 30 anos os estudos de eletrofisiologia utilizando biópsias retais em micro-câmaras de *Ussing* vêm ocupando espaço no cenário da FC. Estudos indicam este método como auxiliar no manejo diagnóstico da FC, principalmente nos casos onde os resultados do TSC são duvidosos e/ou se existe suspeita de CFTR-RD, que não são facilmente identificadas nos testes genéticos (23, 70, 90, 91).

Os fragmentos de tecidos da superfície da mucosa retal com tamanho entre 2 a 4 mm são atualmente obtidos através de retossigmoidoscopia flexível do cólon ou rígida e levados para avaliação em laboratório na micro-câmara de *Ussing*, que consiste em uma câmara com duas metades funcionais. Uma delas é a própria câmara e a outra é o circuito elétrico. Este conjunto fica dentro de uma gaiola de Faraday, que funciona como um isolante eletromagnético, protegendo das influências externas (87), conforme ilustrado na Figura 11.

O tecido da biópsia é montado nas micro-câmaras de *Ussing* (Figura 11) e a atividade elétrica transepitelial pode ser monitorizada por medidas de diferença de potencial de um ponto do tecido em relação ao outro ( $V_{te}$ ), associadas ao cálculo das correntes de curto-circuito, conforme descrito nos protocolos de Freiburg (92). A diferença de potencial entre as membranas luminal e basolateral é medida por eletrodos de leitura e os dados obtidos são digitalizados pelo dispositivo de aquisição de dados. O protocolo experimental tem uma sequência de perfusão da biópsia com diferentes drogas para avaliação quantitativa da função do canal CFTR verificando assim de forma indireta, o fluxo de íons e a atividade dos canais, em particular o da CFTR- $\text{Cl}^-$ , além de permitir testar drogas, *ex-vivo* (87, 93).

Este teste, ao contrário da DPN e do TSC, apresenta uma distinção clara entre as três populações de indivíduos: indivíduos negativos para FC, FC com manifestações clássicas da doença (sem função CFTR; insuficiência pancreática-



CFPI) e FC com apresentação não característica (função residual de CFTR; suficiência pancreática - CFPS) (12, 87).



**Figura 11:** Fragmentos de biópsias retais e câmara de *Ussing* A. Fragmentos de biópsias retais B) *Insert* com a biópsia. C) micro-câmaras de *Ussing*. Arquivo Lafic-Ciped (Unicamp).

#### 1.4.3. Diferença de Potencial Nasal (DPN)

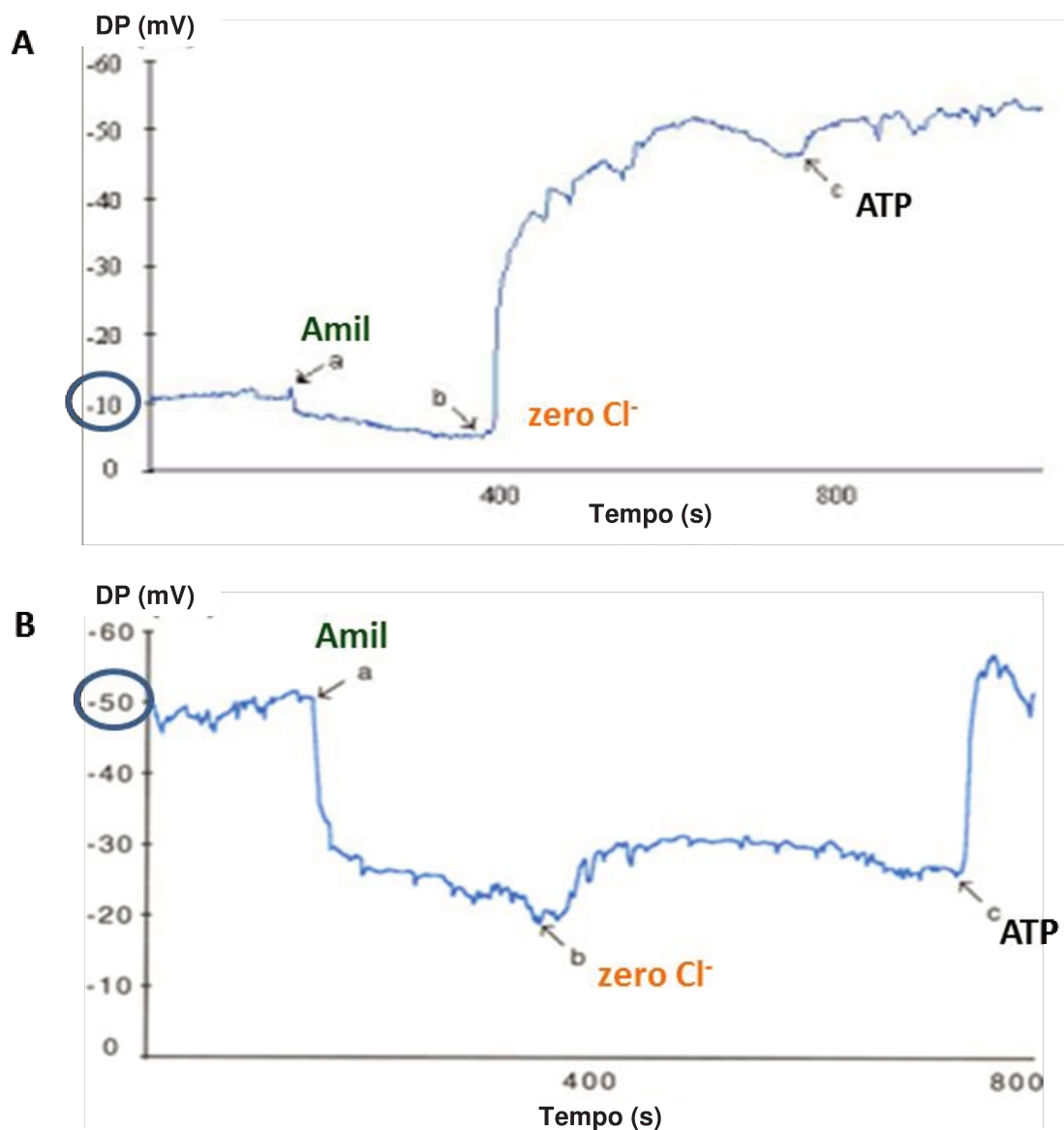
A medida de potencial nasal tem sido considerada um importante biomarcador da atividade da CFTR no diagnóstico da FC e no monitoramento experimental de novas terapias para a doença, tais como a utilização de moduladores da função da CFTR, Ivacaftor, Lumacaftor e outros moduladores em desenvolvimento, além de tratamentos relacionados ao gene *CFTR* e ao uso de inibidores ENaC (93, 94).

Desenvolvida há aproximadamente 40 anos, esta técnica permite quantificar a função do canal iônico no epitélio respiratório, além de ser o único método que avalia a função do ENaC no epitélio respiratório e o canal CFTR (94). Os últimos consensos reconhecem o DPN como método auxiliar no arsenal diagnóstico de FC e doenças a ela relacionadas.(23)

Os indivíduos com FC apresentam uma diferença de potencial na cavidade nasal em relação a um eletrodo de referência, o que não ocorre em indivíduos não afetados pela doença FC (Figura 12). Podemos utilizar a ativação e o bloqueio do transporte iônico como marcador para medir a diferença de potencial nas vias respiratórias relativamente ao eletrodo de referência (93).

A diferença de potencial, medida através da colocação de microeletrodos, ocorre entre o lado interno (mucosa) e externo (referência) das células epiteliais da mucosa nasal, em virtude do aumento no transporte de  $\text{Na}^+$  e ausência ou redução do transporte no canal de  $\text{Cl}^-$  mediado pela CFTR normal ou mutante (95). Como não é possível colocar um microeletrodo no lado externo destas células epiteliais, é

utilizado um eletrodo subcutâneo como referência. Este método *in vivo* é bastante valioso na distinção entre FC e indivíduos sem a doença, no entanto, só pode ser aplicado em crianças maiores de 6 anos de idade (93).



**Figura 12:** Curvas de resposta da diferença de potencial nasal. A) traçado de indivíduo normal B) traçado de indivíduo com FC onde se observa a DPN basal mais negativa (-10mV vs -50mV); a) a despolarização maior do potencial em resposta à perfusão do epitélio com uma solução contendo amilorida (droga bloqueadora do canal de  $\text{Na}^+$ ); b) ausência ou menor hiperpolarização do potencial em resposta ao estímulo da secreção do  $\text{Cl}^-$  com o uso de uma solução zero mM de  $\text{Cl}^-$ ; e c) ativação menor do canal alternativo de  $\text{Cl}^-$  ativado pelo  $\text{Ca}^{2+}$  através da aplicação com ATP (comparar a resposta com o traçado do indivíduo normal) (adaptado do site: cfmedicine.com).

#### 1.4.4. Evaporimetria: estimulação $\beta$ -adrenérgica da CFTR (glândula sudorípara)

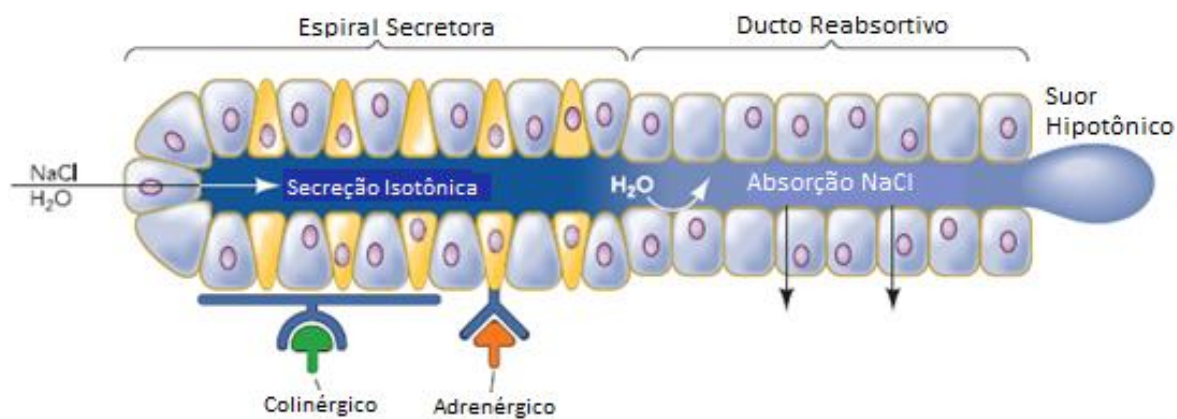
Este teste detecta, por um aparelho sensível denominado evaporímetro, a taxa de suor na pele. É realizado após protocolo de estimulação  $\beta$ -adrenérgica da glândula sudorípara, que reflete a função da CFTR como canal  $\text{Cl}^-$ . A glândula do suor constitui-se no órgão afetado na FC e doenças relacionadas a CFTR de mais fácil acesso e sua função não é afetada por inflamação nem por processos infecciosos (96).

O teste está baseado no fato de que a glândula sudorípara apresenta dois estímulos para a secreção de suor: o colinérgico, responsável pelo controle da temperatura intrínseca do corpo e que possui atividade normal nos indivíduos com e sem FC, e o estímulo  $\beta$ -adrenérgico, mediado pelo cAMP (Figura 13). A secreção de suor determinada por essa via é diretamente proporcional à atividade da proteína CFTR em sua função como transportador de  $\text{Cl}^-$  (9, 96), estando alterada nos indivíduos com FC, heterozigotos (Hz, portadores de uma única mutação *CFTR*) e CFTR-RD (9, 66, 86, 96). Este é o único teste até os dias de hoje capaz de distinguir os quatro tipos de população: indivíduos negativos para FC, Hz, FC e CFTR-RD, não permitindo, porém, distinguir indivíduos FC com e sem função residual da CFTR (66).

A atividade da proteína CFTR pode ser medida através da detecção de quantidades mínimas de suor realizada pelo evaporímetro. No *probe* teste é feita a Injeção Intradérmica (ID) de Carbacol (CCH) que estimulará inicialmente a secreção de suor por via colinérgica; depois esta via é inibida com a aplicação de atropina; e por fim, é feita a aplicação de um beta-coquetel, composto por atropina e isoproterenol, associado à aminofilina, que será responsável pela estimulação da CFTR como canal de  $\text{Cl}^-$ . No *probe* controle é aplicada injeção somente de atropina no momento do início do exame. Após as aplicações é realizada a medição de suor pelo equipamento durante cerca de 8 a 10 minutos por fase, conforme Figura 14 (66).

Os pacientes portadores de FC não apresentam sudorese após o estímulo com o beta-coquetel, enquanto que os pacientes com uma mutação apresentam cerca de 50% de sudorese quando comparada a fase colinérgica. Já os pacientes sem nenhuma mutação possuem a curva de sudorese semelhante à da fase colinérgica (66, 86). Para a obtenção do resultado do teste, é realizado o cálculo da relação entre a sudorese pelo estímulo  $\beta$ -adrenérgico e a sudorese pelo estímulo colinérgico.

Desta forma, a evaporimetria mede taxa de suor na pele pela estimulação seletiva da via  $\beta$ -adrenérgica, o que reflete a atividade da proteína CFTR. A duração do teste é de cerca de 30-40 minutos, com a obtenção imediata do resultado.



**Figura 13:** Diagrama representando os dois componentes da secreção da glândula do suor. Adaptado (97).



**Figura 14:** Paciente de nove anos sendo submetido à evaporimetria no Ciped (Unicamp). Arquivo Lafip - Ciped (Unicamp).

## JUSTIFICATIVA

Diante do conceito atual de que existe um amplo espectro de doenças associadas às mutações do gene *CFTR*, torna-se necessário ampliar a realização de testes diagnósticos, uma vez que o TSC apresenta limitações na identificação de fenótipos mais atípicos com valores de  $Cl^-$  no suor *borderline* ou normais. Nestes casos, o diagnóstico da FC e CFTR-RD só pode ser feito por uma avaliação coordenada de dados clínicos, genéticos e funcionais. Se forem encontradas mutações causadoras de FC ou associadas a CFTR-RD nos dois alelos, um diagnóstico mais confiável poderá ser alcançado. No entanto, devido à variabilidade fenotípica associada a alguns genótipos, a interpretação dos dados funcionais apresenta-se como um ponto crítico no desfecho do diagnóstico.

A presente pesquisa é justificada pela necessidade de aprimorar esse diagnóstico e de entender como as técnicas focadas no estudo da anormalidade da função da CFTR, como canal de  $Cl^-$ , podem contribuir para a confirmação ou exclusão de um diagnóstico FC ou mesmo CFTR-RD.

As medições da função da proteína CFTR como canal de  $Cl^-$  ativado pelo cAMP em biópsias retais *ex vivo* (teste de biópsia retal) têm sido utilizadas de modo a trazer novos conhecimentos ao diagnóstico e prognóstico da doença, demonstrando associações evidentes entre as manifestações clínicas e a função de CFTR residual.

A medição da secreção  $\beta$ -adrenérgica de suor, pela evaporimetria, tem sido validada como um novo teste que possui propriedades complementares ao TSC (padrão-ouro) para acessar a função da CFTR *in vivo*. O evaporímetro é um aparelho sensível, que mede a taxa de evaporação do suor após estimulação seletiva da via  $\beta$ -adrenérgica, permitindo diferenciar os indivíduos negativos para FC (sem nenhuma mutação *CFTR*) daqueles com FC (dois alelos mutantes), H<sub>z</sub> e pacientes CFTR-RD.

Isto evidencia a importância dos estudos funcionais da CFTR para um correto diagnóstico e prognóstico da FC e das CFTR-RD, justificando, assim, esta proposta.

A Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) é o primeiro e ainda o único centro no Brasil, e um dos poucos no mundo, além de EUA, França e Canadá, a dispor de ambas as técnicas (medição da função CFTR na biópsia retal e pela evaporimetria), delineando desta forma o caráter inovador da presente proposta.

## OBJETIVOS

### 3.1. Gerais

Avaliar a função da proteína CFTR num grupo de 19 indivíduos com dúvida diagnóstica em FC provenientes do Hospital Especializado Octávio Mangabeira (Salvador, Bahia) e analisar os resultados juntamente com os resultados do grupo de 32 indivíduos já previamente estudado na Unicamp e usado como validação da técnica da evaporimetria no Brasil.

### 3.2. Específicos:

- Avaliar a função da proteína CFTR por meio de:
  - teste de secreção  $\beta$ -adrenérgica do suor (evaporimetria)
  - teste de biópsia retal
  - TSC
- Comparar a atuação da evaporimetria com o teste de biópsia retal e TSC como ferramentas diagnósticas com valor adicional para o diagnóstico do espectro da FC
- Demonstrar o valor complementar das ferramentas utilizadas nesse estudo como técnicas de auxílio para o diagnóstico e distinção dos indivíduos controles negativos para FC e Hz, dos indivíduos FC com fenótipo clássico (CFPI), daqueles com manifestações não clássicas (CFPS) e ainda das CFTR-RD.

## MÉTODOS

### 4.1. Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp (CAAE: 37360514.9.0000.5404) e pela Direção do Hospital Especializado Octávio Mangabeira (anexo 5). A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtida de todos os pacientes e dos responsáveis legais dos indivíduos menores de 18 anos (anexos 1 a 4).

#### 4.2. Modelo do estudo

Estudo multicêntrico observacional analítico prospectivo do tipo corte transversal.

#### 4.3. Participantes

Estudamos a função da proteína CFTR na glândula sudorípara *in vivo*, com a evaporimetria e com TSC, e *ex vivo*, com a realização de teste de biópsia retal em 19 pacientes (Salvador-BA), chamados de Grupo 2, com manifestações atípicas de FC, porém sem diagnóstico definido: com bronquiectasia idiopática ou que não preenchem os critérios diagnósticos para FC (com dúvida diagnóstica), contando com a colaboração da Dra. Maria Angélica Santana, Hospital Especializado Octávio Mangabeira (Salvador-BA), e da Dra. Marisa Sousa, DCBM-Ualg (Faro, Portugal).

Os resultados obtidos foram agregados aos de 32 indivíduos já estudados (Unicamp, Campinas-SP) com a colaboração das Dras. Tanja Gonska, Sick Kids (Toronto, Canadá) e Marisa Sousa, DCBM-Ualg (Faro, Portugal), chamados de Grupo 1, formado por indivíduos controles negativos para FC (sem mutação *CFTR*), portadores de uma mutação *CFTR* ou com diagnóstico FC conhecido.

##### 4.3.1. Grupo 1

Para o Grupo 1 foram recrutados indivíduos dentre os 118 relatados anteriormente (87), que já haviam realizado TSC, teste de biópsia retal na Unicamp (Ciped-FCM/GASTROCENTRO) e diagnóstico genético, que estavam em seguimento no ambulatório de FC (Pediatria, Unicamp), além de pais de alguns pacientes e indivíduos negativos para FC (controles). Destes, 32 responderam favoravelmente à convocação e foram incluídos no estudo, realizando na época a evaporimetria.

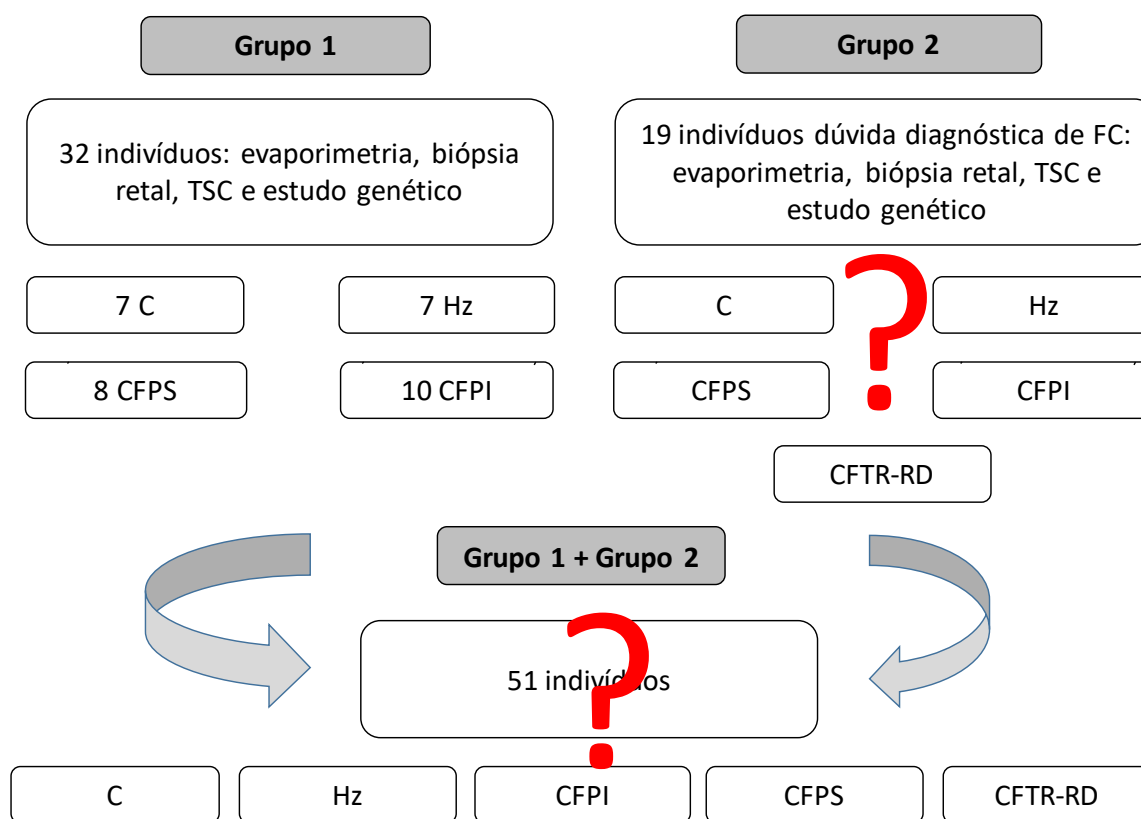
De acordo com os resultados obtidos, os indivíduos haviam sido classificados como:

- 7 Controles Negativo para FC (C), sem nenhuma mutação *CFTR*
- 7 heterozigotos obrigatórios, ou seja, pais de pacientes com uma mutação conhecida (Hz)
- 8 FC suficientes pancreáticos (CFPS)
- 10 FC insuficientes pancreáticos (CFPI)

#### 4.3.2. Grupo 2

Para o Grupo 2, 19 indivíduos foram recrutados para a realização da evaporimetria, TSC e teste de biópsia retal no Hospital Especializado Octávio Mangabeira, tendo sido, também, colhidas amostras sanguíneas para sequenciamento do gene *CFTR* (em análise no Dep. Genética Médica/FCM-Unicamp, Dra. Carmen Bertuzzo). Foram incluídos neste grupo os indivíduos com bronquiectasia de etiologia não definida, TSC *borderline* ou sintomas sinopulmonares com presença de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que nenhum dos indivíduos preenchia os critérios diagnósticos para FC.

Na Figura 15 observa-se o desenho do estudo e no Quadro 4 os critérios de inclusão.



**Figura 15:** Desenho do estudo



**Quadro 4:** Critérios de inclusão

<b>Grupo 1: Indivíduos com diagnóstico já definido</b>	<b>Grupo 2: Indivíduos com dúvida diagnóstica em FC que não preenchem critérios diagnósticos</b>
• indivíduos negativos para FC (controles)	• indivíduos com bronquiectasia de etiologia não definida e/ou
• indivíduos heterozigotos (pais de pacientes do ambulatório de FC)	• TSC <i>borderline</i> e/ou
• indivíduos com diagnóstico de CFPS em seguimento no ambulatório de FC	• sintomas sinopulmonares com presença de <i>Pseudomona</i> sp.
• indivíduos com diagnóstico de CFPI em seguimento no ambulatório de FC	

Os pacientes convocados com diagnóstico já conhecido de FC que estavam em seguimento no ambulatório de FC (Grupo 1), apresentavam uma ou mais das seguintes características: doença sinopulmonar crônica, anormalidades gastrointestinais e ou nutricionais, exames de imagem ou microbiologia da via respiratória sugestivas de FC, e ou evidência de alteração na função da CFTR (duas dosagens de  $\text{Cl}^- > 60 \text{ mEq/L}$ ) e ou detecção de duas mutações causadoras de FC.

Os indivíduos com dúvida diagnóstica de FC (Grupo 2) apresentavam doença sinopulmonar, bronquiectasias ou infecções respiratórias recorrentes, anormalidades gastrointestinais e ou nutricionais, ou mesmo exames de imagem ou microbiologia da via respiratória sugestivas de FC.

Os dados coletados de ambos os grupos (Grupo 1 e 2) foram obtidos através de análise de prontuários médicos, de entrevistas individuais ou com familiar responsável: nome, procedência, etnia, idade, gênero, peso e estatura no momento do exame, história familiar, sintomas clínicos, medicamentos em uso, resultados de tomografia de tórax, elastase fecal, o mais recente volume expiratório forçado no primeiro segundo, em porcentagem do valor predito para sexo ( $\text{FEV}_1$ ), idade e altura, dosagem de imunoglobulinas A, G, E e M, sorologia para aspergilose bronco pulmonar, sorologia, pesquisa e cultura do escarro para Bacilo de Koch (BK), espermograma (quando aplicável), dosagem de  $\text{Cl}^-$  anteriores no suor com peso do suor  $> 75 \text{ mcg}$  pelo método Macrotute® ou suor estimulado pela iontoforese com pilocarpina (TSC), cultura de secreção de vias respiratórias obtido por swab de

orofaringe. Seriam excluídos os pacientes com eventual história de hipersensibilidade conhecida a qualquer agonista utilizado no estudo.

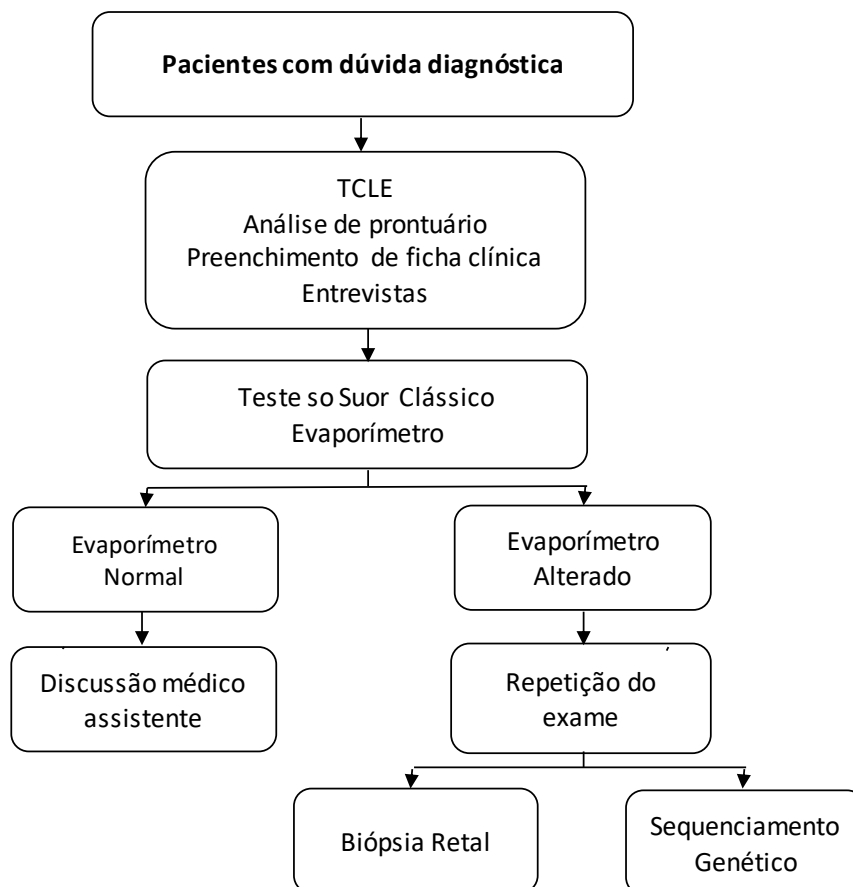
A dosagem da elastase fecal ou a quantificação de gordura na coleta de fezes em 72 hs determinaram se os pacientes apresentavam suficiência (CFPS) ou insuficiência pancreática (CFPI) (98), o que foi realizada somente para os indivíduos do Grupo 1.

A evaporimetria foi realizada nos 19 pacientes do Grupo 2, sendo que o número médio de testes realizados em cada indivíduo foi de 1 a 3, tendo sido escolhido o resultado que apresentou maior valor. Todos os 51 pacientes (Grupos 1 e 2) realizaram avaliação da função do canal CFTR por meio de biópsia retal em câmara de Ussing. As mutações no gene *CFTR* foram estudadas nos indivíduos do Grupo 1 e encontram-se em análise para os indivíduos do Grupo 2. Todos os 51 participantes foram pesados e medidos no momento da realização da evaporimetria, tendo sido calculado o Índice de Massa Corpórea (IMC) para indivíduos com idade superior a 19 anos, pela fórmula peso (kg) / altura<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>) de acordo com World Health Organization (WHO, 2000), e Score Z através do programa WHO AnthroPlus, para indivíduos com idade entre 3 e 19 anos.

Após investigações clínica, funcional e genética, o diagnóstico de FC foi baseado nas diretrizes atuais, ou seja, manifestação de sintomas clínicos da doença na presença de duas mutações *CFTR* causadoras de FC e / ou resultado do TSC  $\geq$  60 mmol / L (23).

O diagnóstico presumido de CFTR-RD (70, 89, 99) foi baseado na presença de sintomas clínicos como doença sinopulmonar, bronquiectasia difusa de etiologia não definida e alteração no resultado de ao menos um teste funcional.

O fluxograma abaixo (Figura 16) demonstra os procedimentos realizados no Grupo 2.



**Figura 16:** Fluxograma dos procedimentos para o Grupo 2 (Salvador-BA)

#### 4.4. Teste do suor clássico (TSC)

Na coleta do suor foi utilizado um aparelho de iontoforese desenvolvido pelo Centro de Engenharia Biomédica da Unicamp, com frequência de 0 e 1.000 Hz, corrente máxima de saída de 1,5 mA, software de apoio às configurações e aquisição de dados e dois eletrodos compostos por 70% de cobre e 30% de zinco (latão) com 30 mm de diâmetro, solução de pilocarpina 0,5% (eletrodo positivo) e ácido sulfúrico 0,004 N (eletrodo negativo), utilizando-se, para coleta do suor, papel de filtro de cerca de 17,5 cm<sup>2</sup>(100). O teste foi realizado segundo a técnica descrita por Gibson e Cook para a estimulação da sudorese pela iontoforese de pilocarpina e a dosagem do Cl<sup>-</sup> pela tilulometria manual de acordo com técnica de Sharles e Sharles (7, 101)

#### 4.5. Teste de secreção beta-adrenérgica/ Evaporimetria

A taxa de secreção de suor estimulado pelo estímulo  $\beta$ -adrenérgico foi medida por um evaporímetro (CyberDerm RG-1; DasyLab, Broomall, PA) (66), por meio de dois probes, que medem a taxa de evaporação do suor.

Para estímulo e inibição da sudorese, foram administradas quatro injeções ID na região volar do antebraço, sendo inicialmente uma de 8,8  $\mu$ g de atropina no *probe* controle, para inibição da secreção colinérgica de suor, e em seguida três injeções no *probe* teste, conforme sequência abaixo:

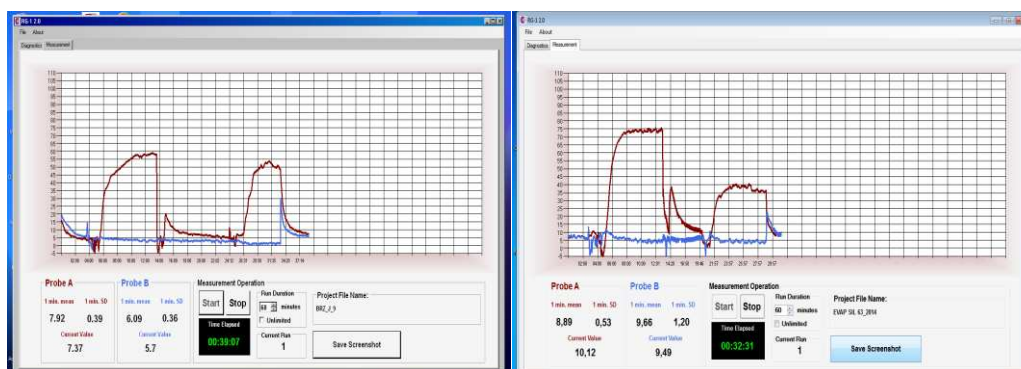
- 0,01 $\mu$ g de CCH, que estimula a secreção colinérgica do suor
- 8,8  $\mu$ g de atropina, que inibe a secreção colinérgica do suor
- coquetel contendo 8,8 $\mu$ g de atropina, 4,4 $\mu$ g de cloridrato de isoproterenol e 0,93mg de aminofilina ( $\beta$ -coquetel), que estimula a secreção seletiva  $\beta$ -adrenérgica do suor, relacionada com a CFTR.

A função da CFTR é estimada através da relação entre a taxa máxima de secreção de suor após a injeção do  $\beta$ -coquetel subtraída da mais baixa secreção após a injeção de atropina e a mais alta taxa de secreção do suor após a injeção do carbacol, também subtraída da mínima atropina (66).

Na Figura 17 são apresentados os traçados típicos obtidos para os diagnósticos presumidos de Controle Negativo para FC (C), Heterozigoto (Hz), FC e CFTR-RD, sendo o traçado azul para o *probe* controle e o traçado vermelho para o *probe* teste.

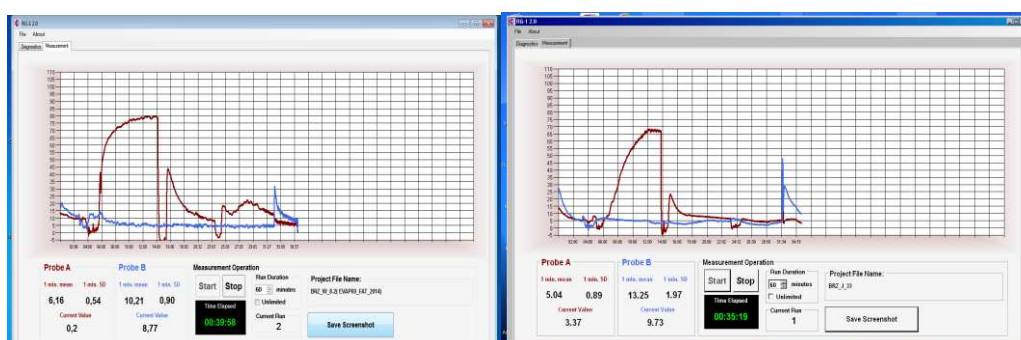
Função CFTR normal (C)

Portador de 1 mutação (Hz)



CFTR-RD

FC



**Figura 17:** Traçados típicos da evaporimetria com diagnósticos presumidos de Função CFTR normal - Controle (C), Portadores de uma mutação - Heterozigotos (Hz), Doenças relacionadas a CFTR (CFTR-RD) e Portadores de duas mutações causadoras de doença (FC). Arquivo Lafip-Ciped (Unicamp)

Na Tabela 1 são demonstrados os valores de referência para os resultados da evaporimetria para classificação diagnóstica presumida conforme sexo do indivíduo (66).

**Tabela 1:** Valores de *cut-off* para potencial diagnóstico para evaporimetria. Adaptado de (66).

	Saudável para FC		Heterozigoto		FC (SP e IP)	
	Pico Beta	Relação Beta / Carbacol	Pico Beta	Relação Beta / Carbacol	Pico Beta	Relação Beta / Carbacol
<b>Homem</b>	60 (50 - 65)	0,80 (0,70 - 0,90)	40 (25 - 55)	0,50 (0,40 - 0,70)	< 4,5	0
<b>Mulher</b>	40 (30 - 50)	0,75 (0,60 - 0,90)	15 (10 - 30)	0,45 (0,30 - 0,60)	< 4,5	0

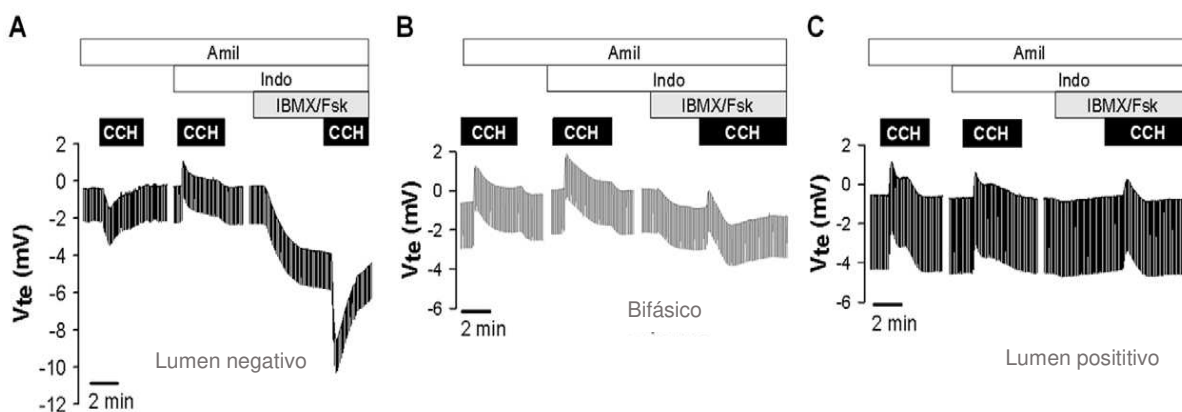
Em parceria com a equipe de engenharia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP), campus Campinas, foi desenvolvido um software que controla o evaporímetro automatizando um sistema

que era totalmente manual, o que permitiu agilidade e precisão de todo o processo de emissão dos laudos do exame.

#### 4.6. Avaliação da função da proteína CFTR em fragmentos de biópsia retal (Teste de Biópsia Retal)

As biópsias retais foram realizadas no Gastrocentro (Unicamp) e no Hospital Especializado Otávio Mangabeira (Salvador, Bahia) e estudadas no Laboratório de Investigação em Fibrose Cística (Lafic, Unicamp) e no Hospital Especializado Otávio Mangabeira. Foram obtidas amostras da mucosa retal (2 a 5 fragmentos) dos pacientes, permitindo a avaliação da função da proteína CFTR em microcâmaras de Ussing em circuito aberto conforme descrito anteriormente (12, 87, 92, 102). Obteve-se a função CFTR avaliando-se o traçado e quantificando as correntes de curto-circuito ( $I_{sc}$ ) associadas à estimulação da secreção de cloreto-dependente de cAMP, via CFTR.

Primeiramente, é aplicada Amilorida para inibir a absorção eletrogênica do  $Na^+$  e de Indometacina para inibir a produção de cAMP endógeno. Depois foram aplicadas substâncias de estimulação colinérgica (CCH) e de estimulação da produção de cAMP (forskolina e isobutilmetilxantina-IBMX) em situação controlada, para ativar a secreção de  $Cl^-$  via CFTR, mediada pelo cAMP. Na Figura 18, são apresentados os traçados típicos para função normal, função residual (CFPS) e sem função (CFPI).



**Figura 18:** Traçados típicos obtidos na câmara de Ussing apartir de estudos eletrofisiológicos em fragmentos de mucosa retal de (A) um indivíduo não-FC, mostrando uma resposta lúmen-negativa IBMX / Fsk e CCH; (B) de um paciente CFPS, mostrando função residual CFTR, conforme revelado por IBMX / Fsk e uma resposta bifásica ao CCH; e (C) um paciente CFPI com ausência de função CFTR, mostrando uma resposta lúmen-positiva IBMX / Fsk e CCH (adaptado de Sousa et al., 2012).

#### 4.7. Sequenciamento gene *CFTR*

Através de amostras de sangue periférico obtido dos pacientes para extração de DNA, foi realizada uma genotipagem extensa por sequenciamento do DNA genómico dos 27 exons *CFTR* e as respectivas regiões intrónicas flanqueantes para os pacientes do Grupo 1 (em colaboração com a Dra. Margarida D. Amaral e Dra. Anabela S. Ramalho, FCUL, Lisboa-Portugal – resultados provenientes do estudo Sousa et al., 2012, onde esses pacientes já haviam sido genotipados e estudados para biópsia retal). Para o Grupo 2, está sendo realizado o sequenciamento genético de última geração dos 27 exons e respectivas regiões intrónicas flanqueantes do gene *CFTR* (em colaboração com a Dra. Carmen Bertuzzo do Departamento de Genética Médica, FCM - Unicamp).

#### 4.8. Estatística

Os resultados do TSC, evaporimetria e teste de biópsia retal são expressos como média e desvios-padrão (SD), assim como a idade, o IMC e o VEF<sub>1</sub>.

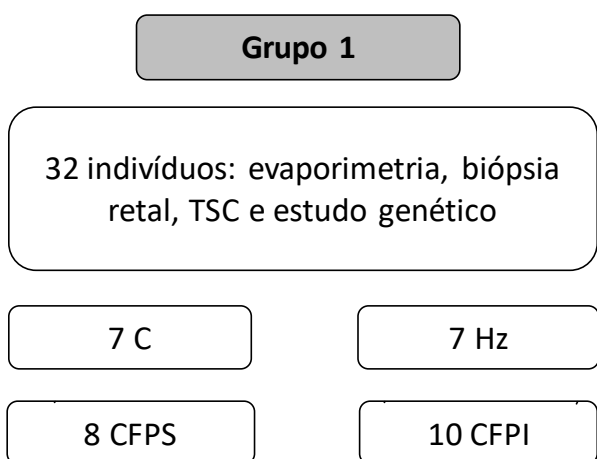
Para análises estatísticas foi utilizado o Graph Pad Prism / v.5, considerando-se valor de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo para ANOVA One-way (teste de Comparação Múltipla de Bonferroni), aplicado ao TSC e à evaporimetria

Já para a avaliação dos resultados do teste de biópsia retal, utilizou-se de comparações em pares de grupos com teste  $t$  (para duas amostras), ao invés de ANOVA One-way, devido às diferenças nos tipos de respostas e também porque as variações não são iguais entre os grupos.

## RESULTADOS

### 5.1. Caracterização do Grupo 1

Com base nas diretrizes para o diagnóstico de FC e após os testes funcionais (TSC, evaporimetria e teste de biópsia retal) e os resultados do estudo genético, os pacientes do Grupo 1 foram assim classificados: dez CFPI, oito CFPS, sete controles negativos para FC e sete Hz (Figura 19).



**Figura 19:** Caracterização do Grupo 1

A idade média foi de 30,5 anos, com mediana de 33 anos, idade mínima de 5 e máxima de 63 anos, sendo que 25 indivíduos se declararam caucasoides e 7 afrodescendentes (Tabela 2 e Figura 20). Na faixa etária até 19 anos, 18% dos indivíduos apresentaram *Z-score* inferior a -2 (Tabela 2 e Figura 21) e nos indivíduos com idade maior que 19 anos, 6% apresentaram diagnóstico de baixo peso, segundo o cálculo do IMC (Tabela 2 e Figura 22). Sintomas relacionados a doença sinopulmonar foram mencionados por 63% dos indivíduos e 41% referiram anormalidades gastrointestinais / nutricionais (Tabela 2). A cultura de secreção das vias aéreas foi realizada em 63% dos indivíduos, sendo que destes, *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada em 65% dos indivíduos, *Staphilococcus aureus* em 70%, *Stenotrophomonas maltophilia* em 15% e *Aspergillus* sp em 10%, com resultado negativo para 5% dos indivíduos (Tabela 2). A tomografia computadorizada de tórax foi realizada em 62% dos indivíduos, sendo observadas bronquiectasias em 46,9%



dos indivíduos (Tabelas 2 e 3). Realizou-se espirometria em 63% dos indivíduos, sendo que destes 5% tiveram registro de VEF<sub>1</sub> abaixo de 40% (distúrbio ventilatório grave), 62% dos pacientes obtiveram valores entre 40 e 70% e 33% valores acima de 70%, conforme Figura 23 e Tabela 2

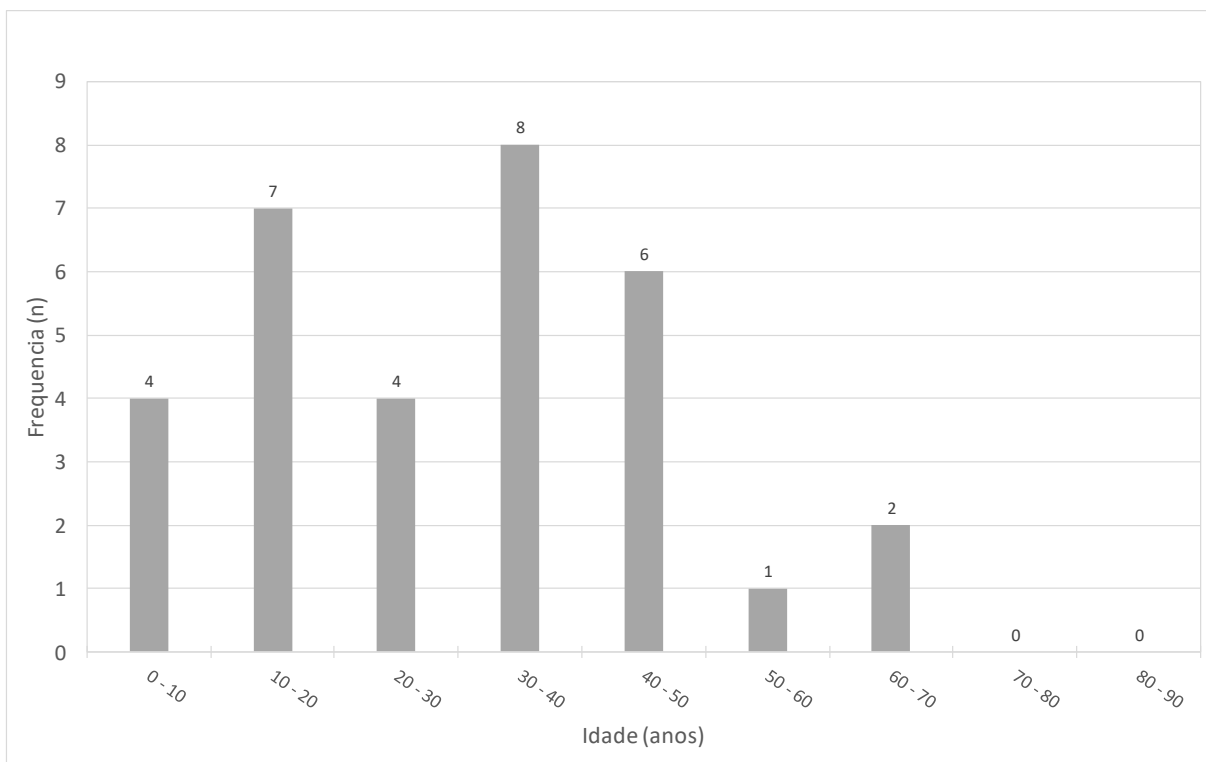
**Tabela 2:** Características clínicas dos indivíduos do Grupo 1

Características Clínicas	Resultados
Sexo Masculino	13 / 32
Sexo Feminino	19 / 32
Etnia Caucasiana	25 / 32
Idade*	30,5 +/- 16,4; 33,0 (5,0 - 63,0)
IMC (maiores de 19 anos)*	24,5 +/- 4,3; 24,7 (16,4 - 31,2)
Z Score (até 19 anos)*	-0,39 +/- 1,80; -0,06 (-3,55 - 2,16)
VEF1*	74,4 +/- 24,3; 69 (29 - 131)
Doença sinopulmonar	20 / 32
Anormalidades gastrointestinais / nutricionais	13 / 32
Bronquiectasia	15 / 32
<i>S. aureus</i>	14 / 20
<i>P. aeruginosa</i>	13 / 20
<i>S. maltophilia</i>	3 / 20
<i>Aspergillus sp.</i>	2 / 20
<i>B. cepacia</i>	0 / 20

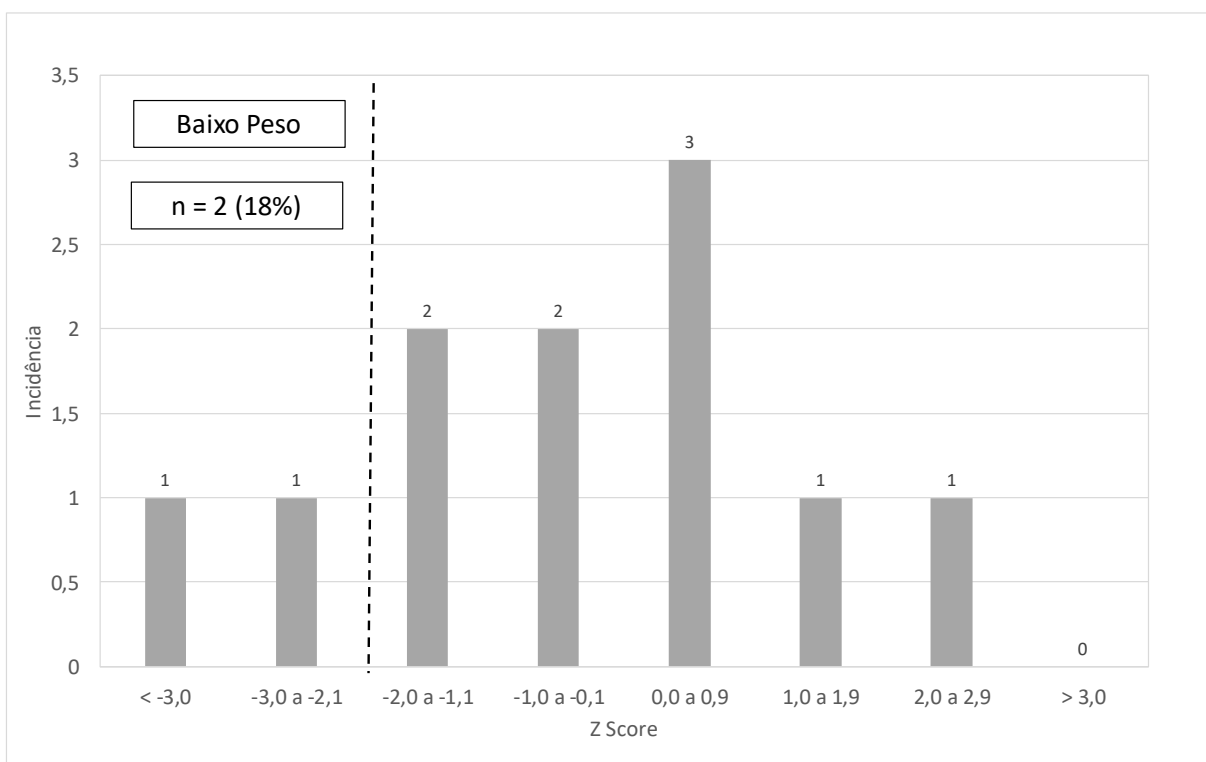
\*média +/- desvio padrão; mediana (mínimo e máximo)

**Tabela 3:** Resultados observados em tomografia tórax de indivíduos do Grupo 1

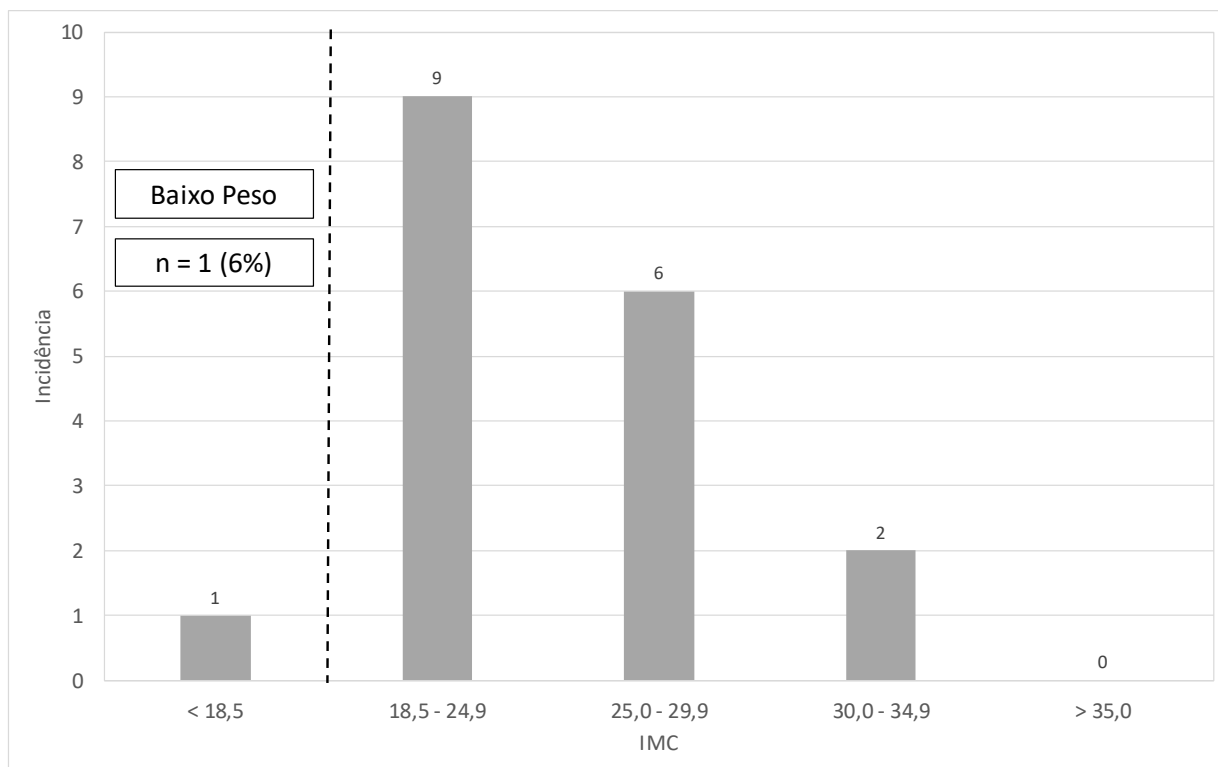
Resultado	Incidências	%
Bronquiectasia	15	46,9%
Laudo normal	5	15,6%
Não realizado / sem informação	12	37,5%
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>100%</b>



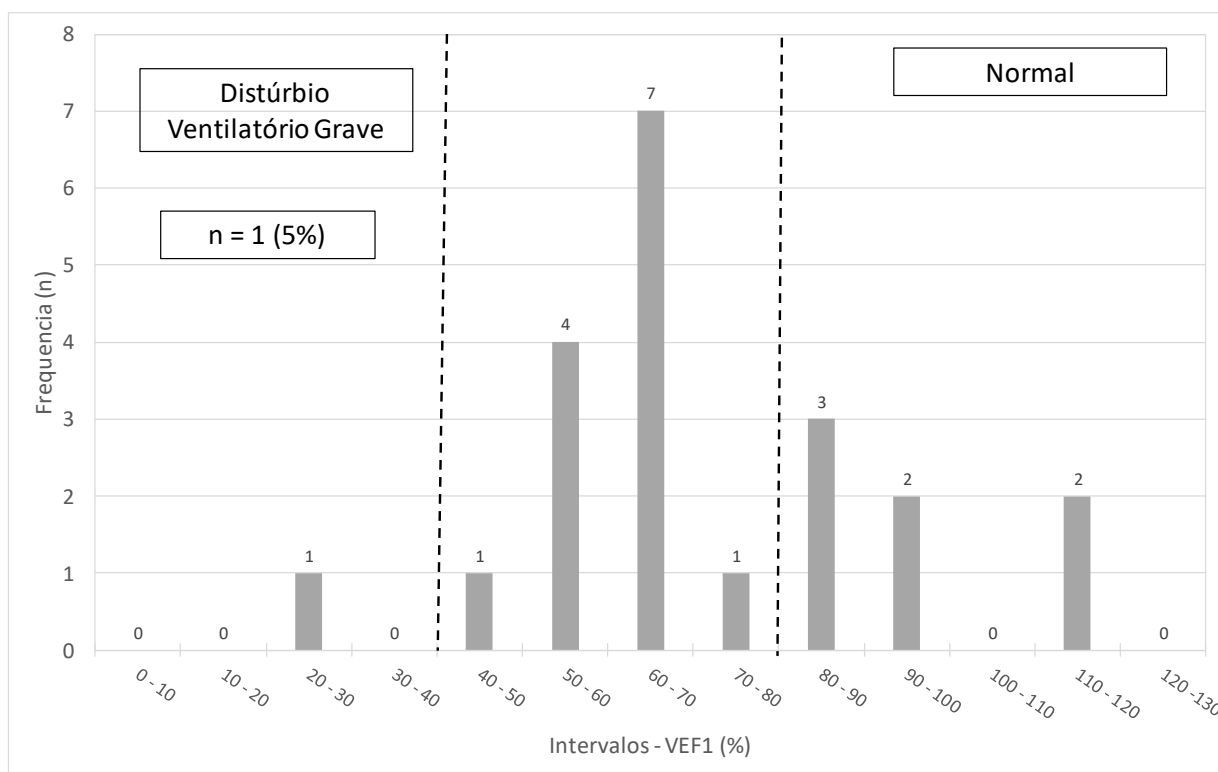
**Figura 20:** Distribuição de idade dos indivíduos do Grupo 1



**Figura 21:** Distribuição de Z-score - indivíduos com idade até 19 anos (Grupo1)



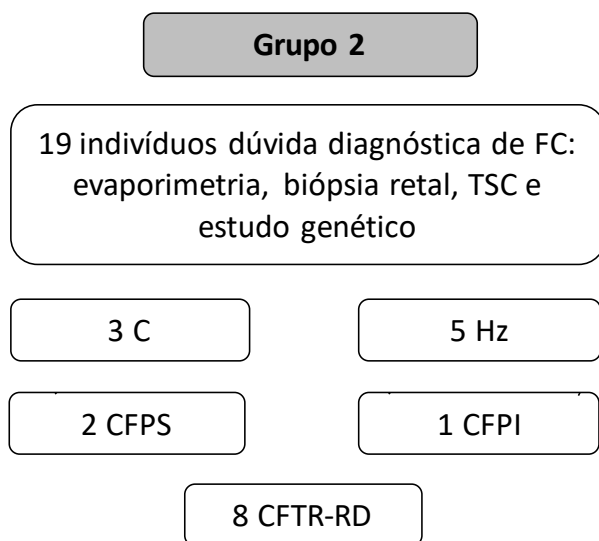
**Figura 22:** Distribuição do índice de massa corpórea - indivíduos com idade acima de 19 anos (Grupo 1)



**Figura 23:** Distribuição de volume expiratório forçado no 1º segundo (Grupo 1)

## 5.2. Interpretação diagnóstica e caracterização de indivíduos suspeitos de FC / CFTR-RD - Grupo 2

Considerando também as diretrizes atuais para o diagnóstico de FC e após os testes funcionais (TSC, evaporimetria e teste de biópsia retal) realizados nos dezanove indivíduos participantes, com suspeita clínica de FC estudados no grupo 2, os indivíduos foram classificados de forma presuntiva, pois não dispomos ainda do estudo genético: três como C, cinco como Hz, oito como CFTR-RD, dois como CFPS e um como CFPI, conforme mostra a Figura 24.



**Figura 24:** Caracterização presuntiva do Grupo 2

Foram realizados 43 evaporimetrias em 19 pacientes. A idade média foi de 34,2 anos, com mediana de 31,4 anos, idade mínima de 9,5 e máxima de 68,6 anos (Figura 25), sendo que 10 indivíduos se declararam caucasóides (Tabela 4). Na faixa etária até 19 anos, todos os indivíduos apresentaram *Z-score* acima -2 (Figura 26), porém naqueles com idade maior que 19 anos, 14% apresentou diagnóstico de baixo peso, segundo o cálculo do IMC (Figura 27 e Tabela 4). Com base nas entrevistas e dados coletados dos prontuários, 100 % dos pacientes referiram sintomas relacionados a doença sinopulmonar crônica e 38,8% anormalidades gastrointestinais / nutricionais (Tabela 4). *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada na cultura de secreção da via aérea superior em 82,3% dos indivíduos, *Staphilococcus aureus* em 64,7%, *Burkholderia cepacia* em 11,7% e *Stenotrophomonas maltophilia* em 5%, sendo que 5% não realizaram tal

procedimento (Tabela 4). A pesquisa de bacilo de Koch (BK) foi realizada em 66% dos pacientes, com resultado negativo em 100% deles (Tabela 4). Os achados tomográficos de tórax descritos concluíram que 84,1% dos indivíduos eram portadores de bronquiectasia (16) e 5,3% apresentaram outros achados (atelectasia), enquanto que 5,3% dos pacientes não realizaram o exame ou não tinham registro em seus prontuários e 5,3% apresentaram laudo normal (Tabela 5). O VEF<sub>1</sub> apresentou-se abaixo de 40% (distúrbio ventilatório grave) em 4 dos pacientes (27%), entre 40 e 70% em 9 (50%) e acima de 70% em 2 (11,1%), conforme Figura 28 e Tabela 4.

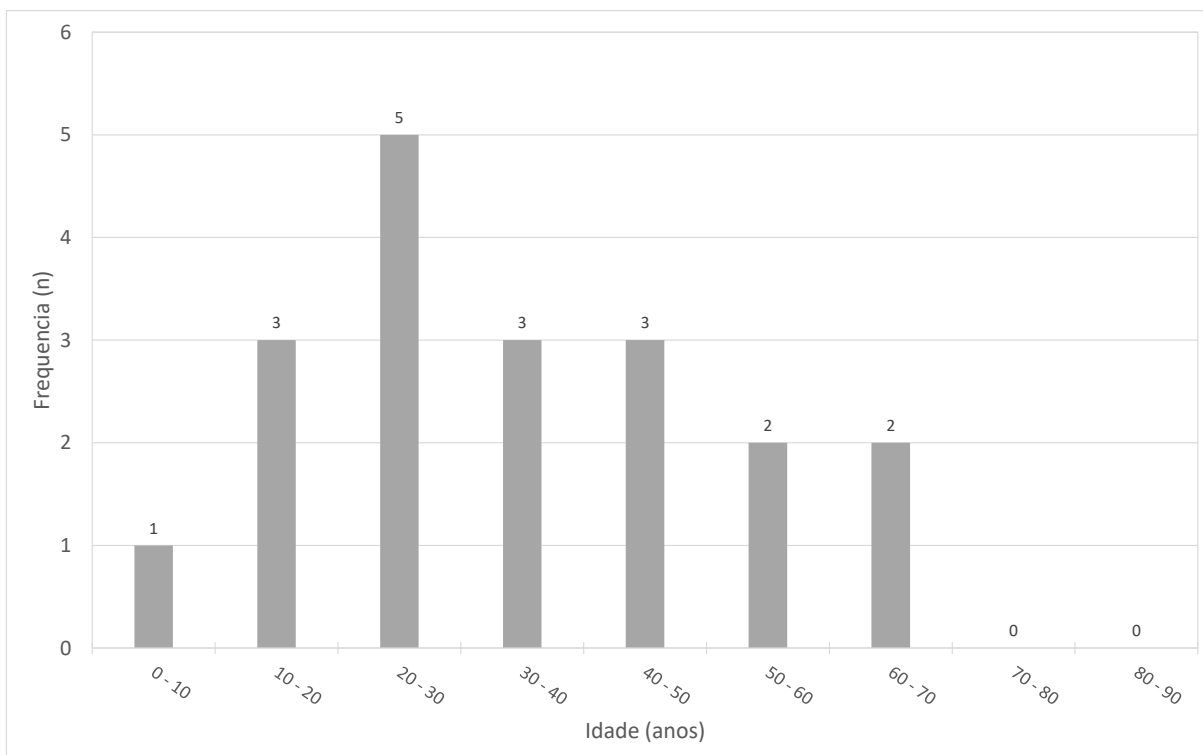
**Tabela 4:** Características clínicas dos pacientes do Grupo 2

Características Clínicas	Resultados
Sexo Masculino	4 / 19
Sexo Feminino	15 / 19
Etnia Caucasiana	10 / 19
Idade*	34,4 +/- 17,6; 34,7 (9,5 - 68,6)
IMC (maiores de 19 anos)*	22,2 +/- 4,1; 22,2 (16,2 - 33,1)
Z Score (até 19 anos)*	-0,62 +/- 1,20; -0,79 (-1,88 - 0,98)
VEF1*	58,5 +/- 25,0; 58,5 (19 - 126)
Doença sinopulmonar (presença)	19 / 19
Anormalidades gastrointestinais / nutricionais (presença)	7 / 19
Bronquiectasia (presença)	16 / 18
Pesquisa de BK e/ou cultura negativo	12 / 12
<i>S. aureus</i>	12 / 18
<i>P. aeruginosa</i>	15 / 18
<i>B. cepacia</i>	3 / 18
<i>S. maltophilia</i>	1 / 18

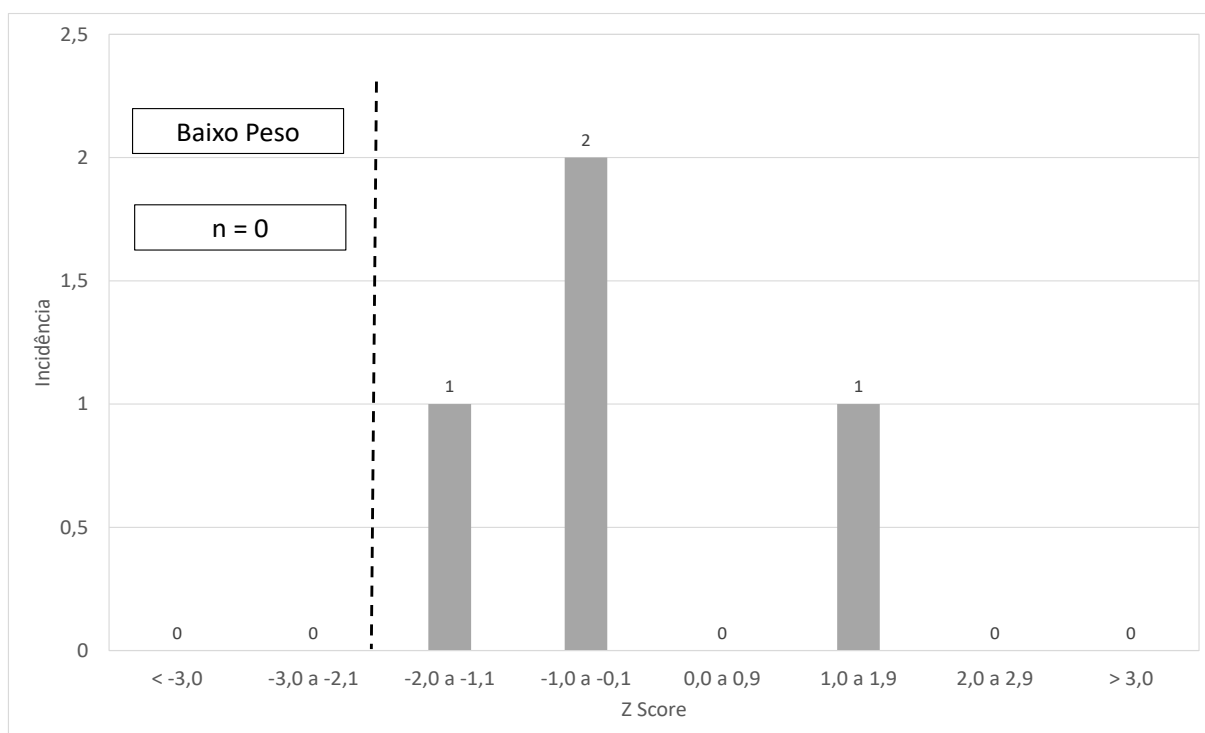
\*média +/- desvio padrão; mediana (mínimo e máximo)

**Tabela 5:** Resultados observados em tomografia tórax de indivíduos do Grupo 2

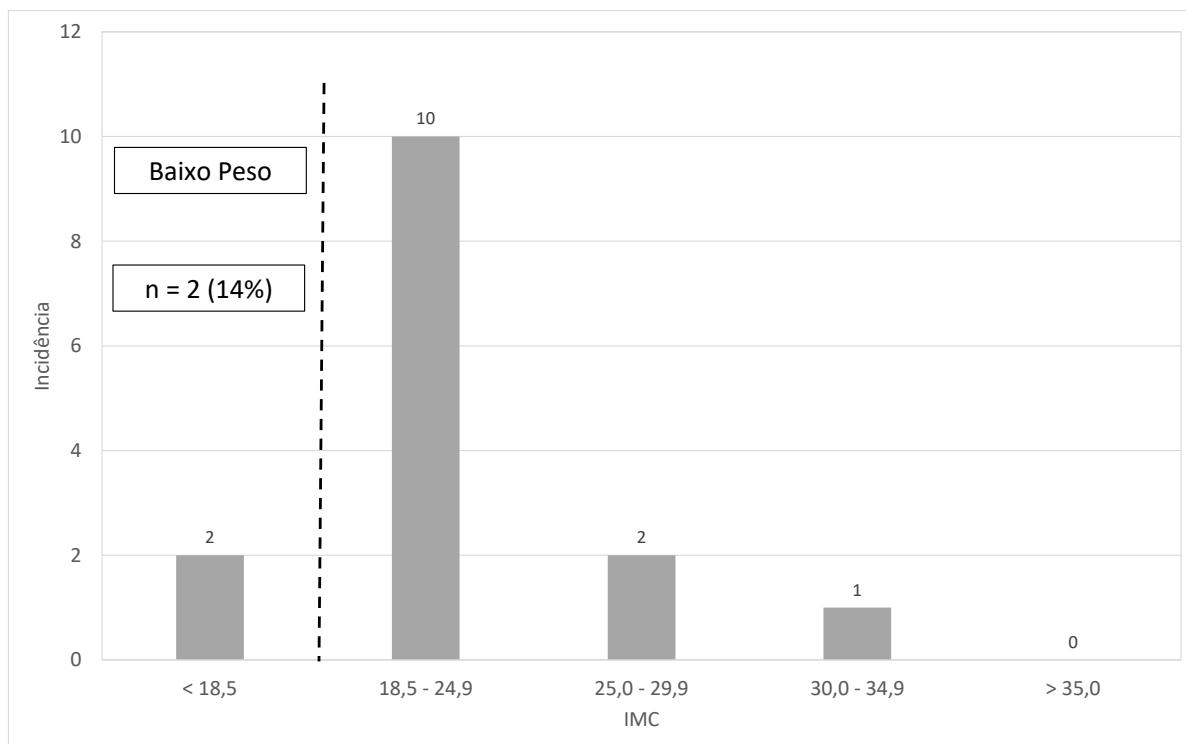
Resultado	Incidências	%
Bronquiectasia	16	84,1%
Laudo normal	1	5,3%
Outros achados	1	5,3%
Não realizado / sem informação	1	5,3%
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>100%</b>



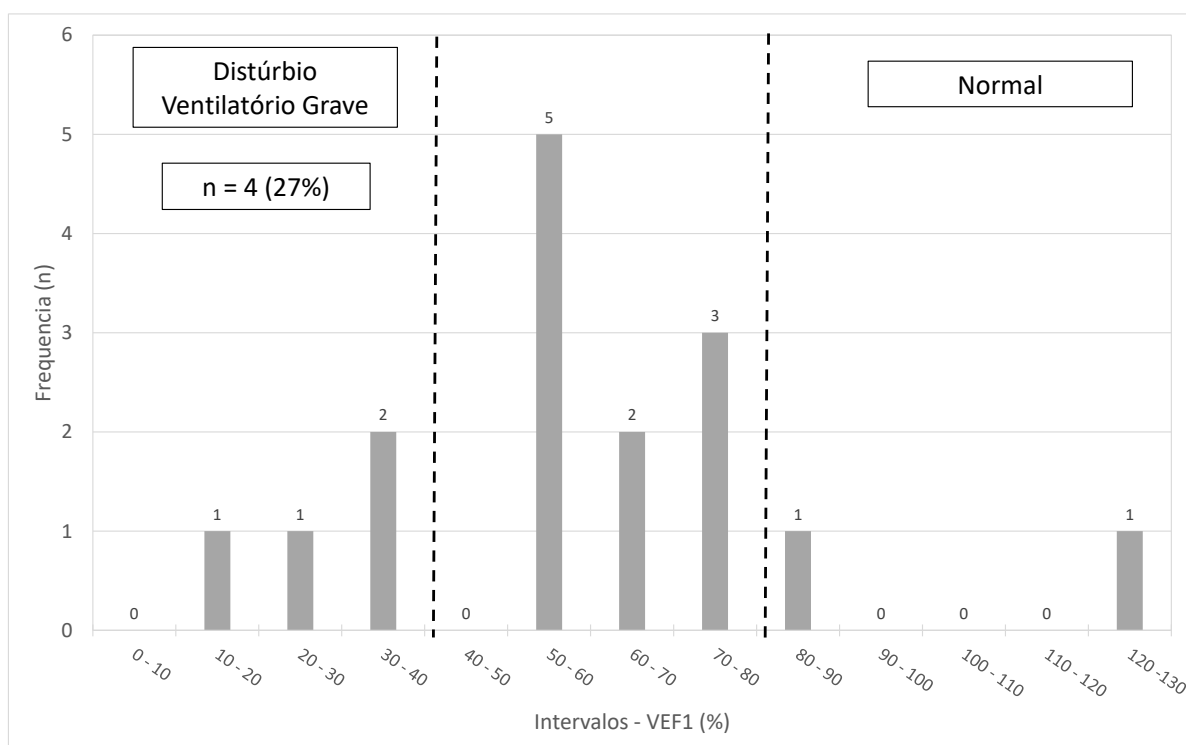
**Figura 25:** Distribuição de idade de indivíduos do Grupo 2



**Figura 26:** Distribuição de Z score - indivíduos com idade até 19 anos (Grupo 2)

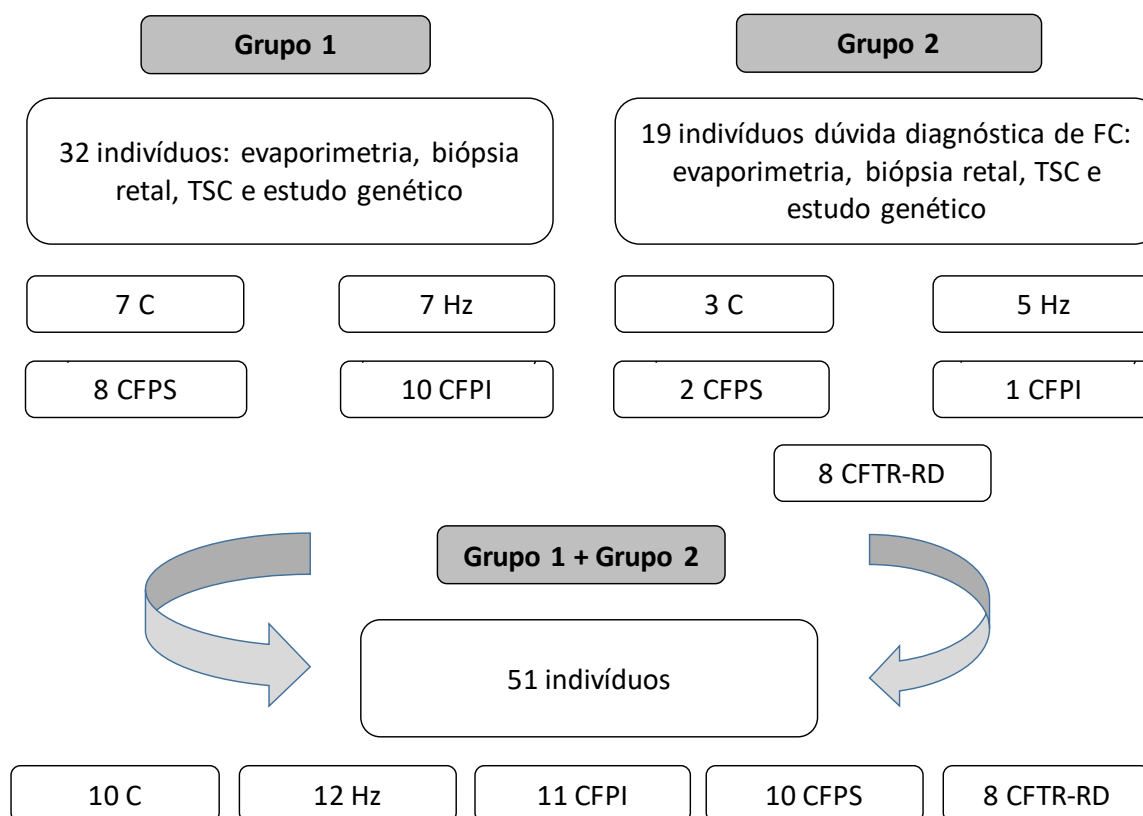


**Figura 27:** Distribuição do índice de massa corpórea - indivíduos com idade acima de 19 anos (Grupo 2)



**Figura 28:** Distribuição de volume expiratório forçado no 1º segundo (Grupo 2)

Em seguida, agrupou-se todos os indivíduos de ambos os grupos, conforme descrito na Figura 29, obtendo-se um total de 51 indivíduos com a seguinte classificação: 10 indivíduos C, 12 indivíduos Hz, 8 indivíduos CFTR-RD, 10 indivíduos CFPS e 11 indivíduos CFPI. As Tabelas 6 e 7 mostram a apresentação clínica e demográfica, os resultados dos testes de eletrofisiologia e a classificação diagnóstica dos indivíduos dos Grupos 1 e Grupo 2, respectivamente, considerando que o diagnóstico estabelecido para o Grupo 2 é presuntivo, uma vez que não dispomos ainda do estudo genético.



**Figura 29:** Descrição da classificação diagnóstica dos indivíduos após junção dos dois Grupos.



**Tabela 6:** Apresentação clínica e caracterização demográfica, genótipos, classificação diagnóstica e resultados das técnicas de eletrofisiologia - Grupo 1.

Identificação do Indivíduo	Diagnóstico	Sintomas Clínicos	Idade	Gênero	Genótipo	Teste do Suor	Relação Beta/Chol	Isc-IBMX/Fsk ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	Isc-CCH (IBMX/Fsk) ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) positivo	Isc-CCH (IBMX/Fsk) ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) negativo
33-2010	CFPI	BRONCH/GI	12	M	3120+1G>A/R1066C	121	0	10.08	28,85	0
143-2012	CFPI	BRONCH/GI	28	F	A561E/A561E	131	0,02	12.23	28,31	0
107-2010	CFPI	BRONCH/GI/HEP	18	F	F508del/S4X	114	0,03	12.91	21,42	-5,25
84-2010	CFPI	BRONCH/GI	11	F	F508del/R1066C	95,5	0	3.59	10,73	-2,48
118-2007	CFPI	SINOPULM/GI	10	F	F508del/1717-1G>A	119	0,04	28.26	33,89	0
51-2010	CFPI	BRONCH/GI/PANCR/HEP	8	M	F508del/F508del	106	0	5.94	17,74	0
81-2010	CFPI	BRONCH/GI/PANCR	40	M	F508del/F508del	112,5	0,02	9.02	14,22	0
133-2007	CFPI	BRONCH/GI/PANCR	17	M	F508del/F508del	121	0,03	10.32	25,36	0
31-2010	CFPI	BRONCH/GI/PANCR	18	F	F508del/G542X	117,5	0	12.26	18,78	-0,31
110-2007	CFPI	SINOPULM/GI/PANCR	39	M	G542X/2183AA>G	103,5	0,01	15.17	23,47	0
60-2010	CFPS	BRONCH	37	F	3120+1G>A/L206W	99	0	-47,31	5,47	-76,34
86-2010	CFPS	BRONCH	5	F	F508del/S549R(T>G)	116,5	0	-7.08	14,72	-4,51
08-2013	CFPS	PANCR	9	F	F508del/ neg.	123	0	-8,78	27,93	-7,72
66-2010	CFPS	BRONCH	37	F	F508del/3272-26A>G	104,5	0,02	-11.74	23,12	-19,13
80-2010	CFPS	SINOPULM/GI	37	F	F508del/P205S	90	0	-12.03	7,68	-10,37
63-2010	CFPS	BRONCH	45	F	F508del/R334W	109	0,02	-12.94	5,31	-9,59
111-2007	CFPS	BRONCH	26	F	G542X/I618T	75,5	0,03	-27.31	36,17	-53,07
124-2007	CFPS	BRONCH	31	F	G542X/R334W	115	0	-17.5	14,52	-18,1
17-2010	Saudável	ASSINTOM	62	M	n.a.	42	0,97	-173,6		-213,83
74-2010	Saudável	BRONCH	49	M	neg./neg.	25,5	0,99	-34.72		-89
72-2010	Saudável	SINOPULM/GI	45	F	n.i.	30	0,9	-20.29		-117,3
70-2010	Saudável	SINOPULM	13	F	c.2952T>G (polymorphism) /neg	41	0,62	-27.83		-141.64
59-2010	Saudável	ASSINTOM	22	F	n.a.	27	0,65	-22,57		-148,08
79-2010	Saudável	ASSINTOM	52	F	n.a.	9,5	0,56	-6,61		-72,73
94-2010	Saudável	ASSINTOM	22	M	neg./neg.	12	0,77	-26,22		-81,69
03-2014	Hetero	ASSINTOM	43	M	F508del/-	22	0,88	-61,9		-540,21
06-2014	Hetero	ASSINTOM	63	M	F508del/-	44	0,7	-17,94		-97,47
42-2010	Hetero	ASSINTOM	12	M	F508del/-	28	0,46	-15.78		-50,16
01-2014	Hetero	ASSINTOM	39	M	F508del/-	14	0,54	-30,99		-109,76
02-2014	Hetero	ASSINTOM	42	F	F508del/-	19	0,29	-44,47		-304,87
04-2014	Hetero	ASSINTOM	35	F	G542X / neg.	8,5	0,27	-21,33		-228,62
05-2014	Hetero	ASSINTOM	49	M	F508del/-	23	0,56	-84,57		-270,23

**Tabela 7:** Apresentação clínica e caracterização demográfica, genótipo, classificação diagnóstica presuntiva e resultados das técnicas de eletrofisiologia - Grupo 2.

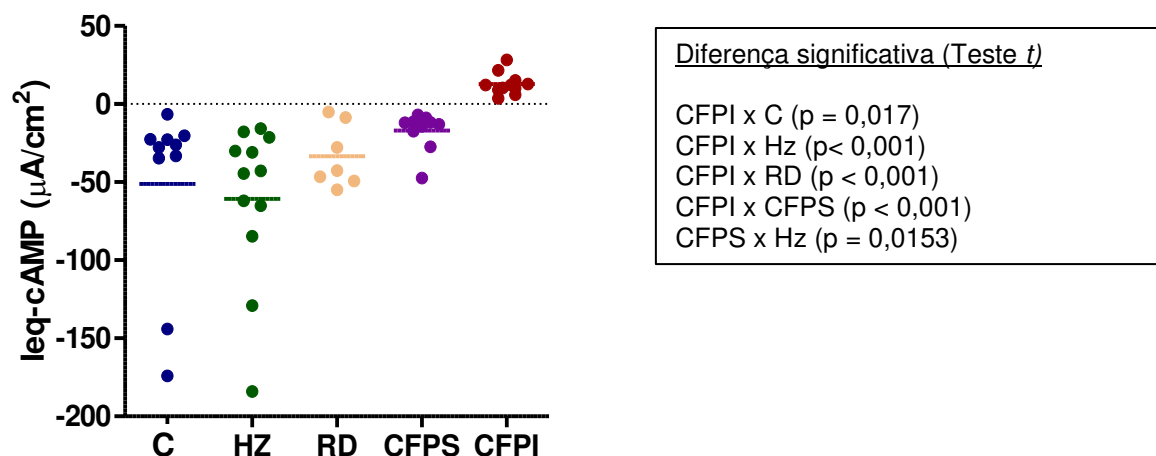
Identificação do Indivíduo	Grupo Suspeito	Sintomas Clínicos	Idade	Gênero	Genótipo	Teste do Suor	Classificação Diagnóstica Preliminar	Relação Beta/Chol	Isc-IBMX/Fsk ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	Isc-CCH (IBMX/Fsk) ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) positivo	Isc-CCH (IBMX/Fsk) ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) negativo
99-2010/1Bx1	FC/CFTR-RD	SINOPULM	38	F	F508del/D1152H	26,5	RD	0,05	-42,69		-97,69
30 Bx8	não-FC/CFTR-RD	BRONCH	25	F	em estudo	63,49	HC	1,03	-22,91		-141,59
47 Bx3	não-FC/CFTR-RD	BRONCH / ABPA	53	M	em estudo	17,51	HC	0,72	-143,97		-299,98
28 Bx6	não-FC/CFTR-RD	BRONCH	35	F	em estudo	38,49	HC	0,72	-33,18		-117,35
31 Bx12	não-FC/CFTR-RD	BRONCH	69	F	em estudo	31,94	HZ	0,53	-65,17		-291,84
27 Bx7	não-FC/CFTR-RD	BRONCH	23	F	em estudo	36,75	HZ	0,49	-42,77		-551,77
42 Bx14	não-FC/CFTR-RD	SINOPULM	10	F	em estudo	35,85	HZ	0,48	-129,1		-273,1
57 Bx17	não-FC/CFTR-RD	BRONCH	57	F	em estudo	24,64	HZ	0,46	-30,1		-145,5
35 Bx9	não-FC/CFTR-RD	SINOPULM	11	F	em estudo	41,12	HZ	0,39	-183,99		-327,09
17 Bx2	não-FC/CFTR-RD	BRONCH	44	F	em estudo	17,27	HZ/RD	0,37	-8,65		-53,29
25 Bx5	FC/CFTR-RD	BRONCH	22	M	em estudo	17,52	HZ/RD	0,41			
39 Bx10	FC/CFTR-RD	BRONCH	36	F	em estudo	26,24	RD	0,25	-27,82		-259,96
38 Bx13	FC/CFTR-RD	BRONCH	15	F	em estudo	28,15	RD	0,23	-54,82		-252,47
14 Bx4	FC/CFTR-RD	BRONCH	27	F	em estudo	18,74	RD	0,2	-49,25		-250,71
46 Bx15	FC/CFTR-RD	SINOPULM	43	F	em estudo	32,56	RD	0,13	-46,47		-198,1
51 Bx18	FC/CFTR-RD	BRONCH	43	F	em estudo	52,24	RD/CFPS	0,09	-5,04		-118,23
52 Bx19	FC/CFTR-RD	BRONCH	65	F	em estudo	119,37	CFPS/RD	0,01	-11,42	-	-32,94
33 Bx11	FC/CFTR-RD	BRONCH	27	M	em estudo	119,35	CFPS/RD	0,03	-14,3	-	-71,07
53 Bx16	FC/CFTR-RD	BRONCH	16	M	F508del/A559T	130,98	CFPI	0,08	21,52	80,51	

### 5.3. Secreção de CI-mediada por CFTR em biópsias retais (teste de biópsia retal) e ensaio secretor de suor beta-adrenérgico (evaporimetria)

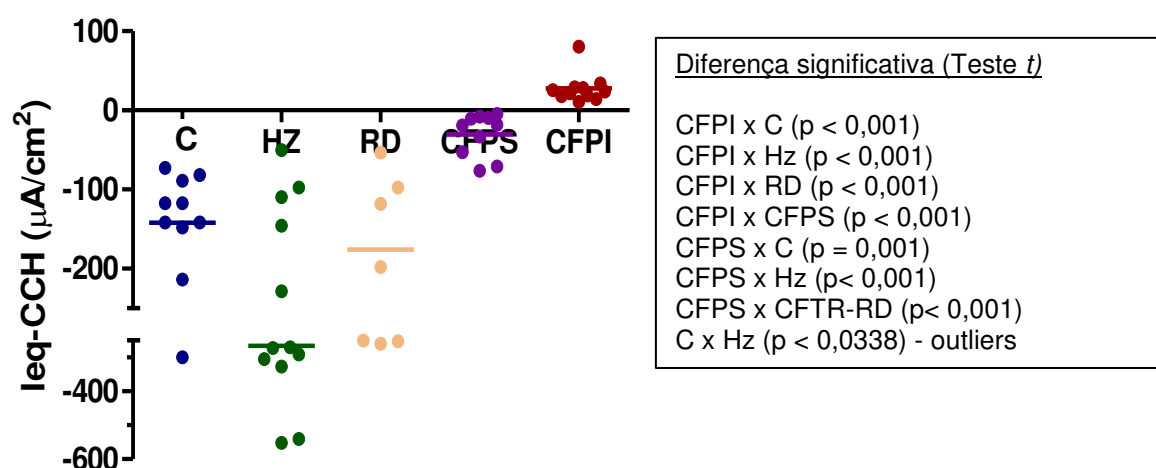
Nas biópsias retais de indivíduos C, Hz, CFTR-RD e CFPS, as correntes de curto-circuito induzidas por ativação de cAMP (leq-cAMP negativo) refletiram a presença de função mediada por CFTR. Em contraste, a ativação de cAMP induziu leq-cAMP positivo em pacientes com CFPI, indicando ausência completa de funções mediadas por CFTR (Figura 30A). Além disso, em comparação direta (teste *t*), a leq-cAMP medida no teste de biópsia retal, que sendo positivo em CFPI e negativo em C, Hz, CFTR-RD e CFPS, mostra diferenças estatísticas significativas entre CFPI e C ( $p = 0,0017$ ), Hz ( $p = 0,001$ ), CFTR-RD ( $p < 0,001$ ) e CFPS ( $p < 0,001$ ); e entre CFPS e Hz ( $p = 0,0153$ ), mas não há diferença estatística entre CFPS e CFTR-RD ( $p = 0,0503$ ). Maximizar a ativação da função CFTR no tecido retal com adição de CCH aumentou ainda mais as correntes negativas em C, Hz e CFTR-RD (leq-CCH), mas levou a respostas bifásicas em pacientes CFPS e respostas positivas em pacientes com CFPI, conforme relatado anteriormente (Figura 30B). Curiosamente, no Grupo 2, o leq-CCH foi estatisticamente diferente de modo significativo entre C e Hz, com Hz paradoxalmente mostrando leq-CCH mais negativo, sugerindo maior função CFTR ( $p < 0,0338$ ). Esse resultado foi devido principalmente à dois indivíduos outliers na análise. Além disso, o leq-CCH de pacientes com CFPI também é estatisticamente diferente de C, Hz e CFTR-RD ( $p < 0,001$ ) na comparação direta de teste *t*. Nos pacientes CFPS, o pico positivo inicial é seguido por um platô negativo que indica presença de função CFTR residual, enquanto os pacientes com CF-PI apenas demonstram correntes positivas. Ao usar a comparação direta do teste *t*, os dados de leq-CCH de pacientes CFPS também se mostraram estatisticamente diferentes do C ( $p < 0,001$ ), Hz ( $p < 0,001$ ), CFTR-RD ( $p < 0,001$ ) e CFPI ( $p < 0,001$ ).

A secreção de suor  $\beta$ -adrenérgica, na evaporimetria, foi aproximadamente a metade em Hz em comparação com C ( $p < 0,001$ ), enquanto que a taxa de secreção de suor  $\beta$ -adrenérgico estava completamente ausente e indistinguível entre CFPS e CFPI (Figura 30C, ANOVA unilateral,  $p < 0,001$ ). Os pacientes que cumpriam os critérios para o diagnóstico de CFTR-RD, observados na Tabela 7, demonstraram taxas de secreção de suor  $\beta$ -adrenérgicas estatisticamente inferiores, de forma significativa, em relação aos classificados como Hz ( $p < 0,001$ ), mas sua taxa média de secreção de suor  $\beta$ -adrenérgico é indistinguível estatisticamente dos pacientes

classificados como FC. O TSC foi superior nos pacientes CFPS e CFPI em comparação com indivíduos C e Hz ( $p < 0,001$ ), mas não foi significativamente diferente entre C e Hz e CFTR-RD ou entre CFPS e CFPI (Figura 30D).

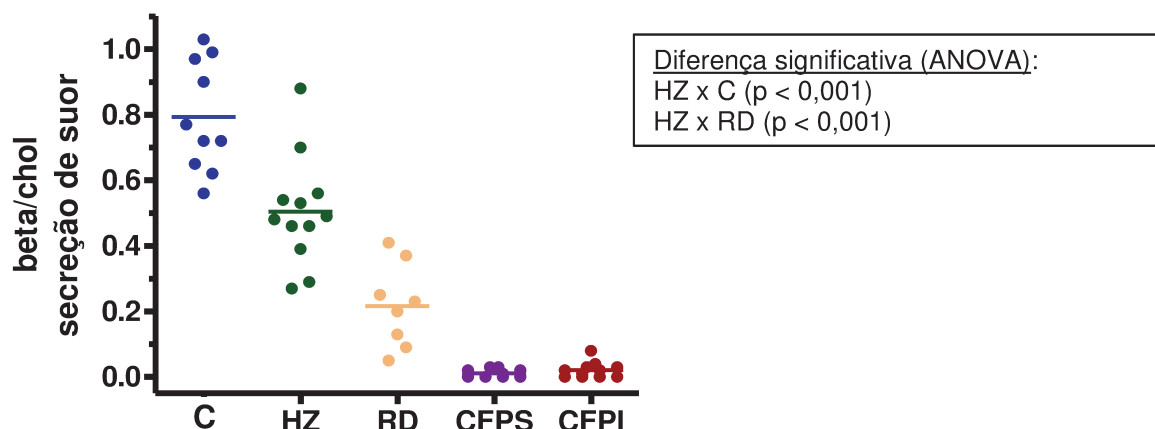


**Figura 30A:** Resumo da função da proteína CFTR medida como leq-cAMP (estimulação com IBMX, 100  $\mu\text{M}$  e Fsk, 2  $\mu\text{M}$ ) em fragmentos de mucosa retal ( $n = 50$ ) na câmara Ussing (teste de biópsia retal). Cada ponto representa a média de 2-5 biópsias do mesmo indivíduo em  $\mu\text{A} / \text{cm}^2$ . A linha representa a média das médias de cada grupo, onde C = *Control Negative for Cystic Fibrosis* (Controle Negativo para FC – C), RD = *Related Disorder* (Doenças Relacionadas a CFTR - CFTR-RD), CFPS = *Cystic Fibrosis Pancreatic Sufficiency* (Fibrose Cística com Suficiência Pancreática) e CFPI = *Cystic Fibrosis Pancreatic Insufficiency* (Fibrose Cística com Insuficiência Pancreática).

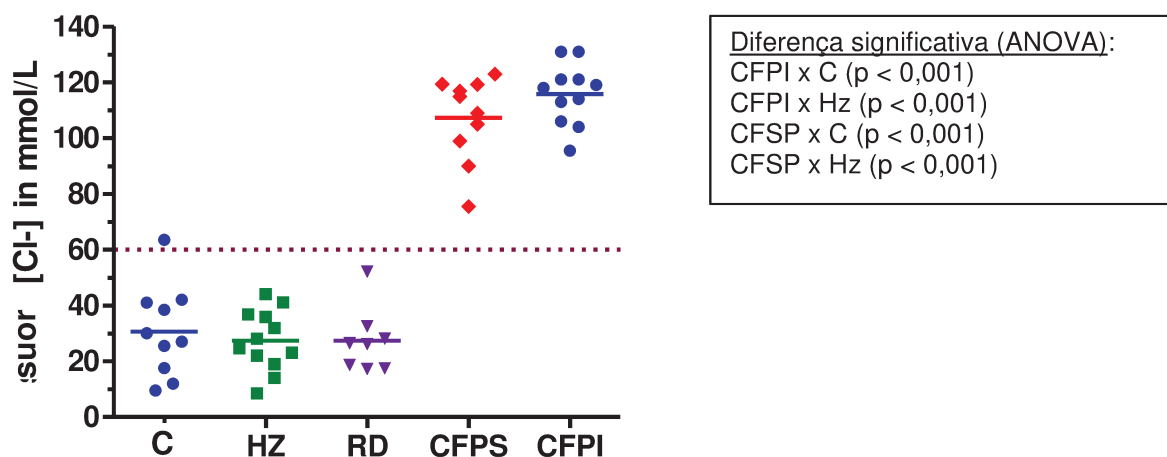


**Figura 30B:** Resumo da função da proteína CFTR medida como leq-CCH (aplicação de Carbachol, 100  $\mu\text{M}$ , sob estimulação de cAMP) em fragmentos de mucosa retal (teste de biópsia retal). CFPS refere-se a parte lúmen-negativa da resposta bifásica observada em pacientes com FC após a adição de carbachol (CCH) devido a presença de função CFTR residual. Os pacientes com CFPI mostram um pico positivo que indica ausência de função CFTR ( $n = 50$ ). Cada ponto representa a média de 2-5 biópsias do mesmo indivíduo em  $\mu\text{A} / \text{cm}^2$ . A linha representa a média das médias de cada grupo, onde C = *Control Negative for Cystic Fibrosis* (Controle Negativo para FC – C), RD = *Related Disorder* (Doenças Relacionadas a CFTR - CFTR-RD), CFPS = *Cystic Fibrosis Pancreatic Sufficiency* (Fibrose

Cística com Suficiência Pancreática) e CFPI = *Cystic Fibrosis Pancreatic Insufficiency* (Fibrose Cística com Insuficiência Pancreática).



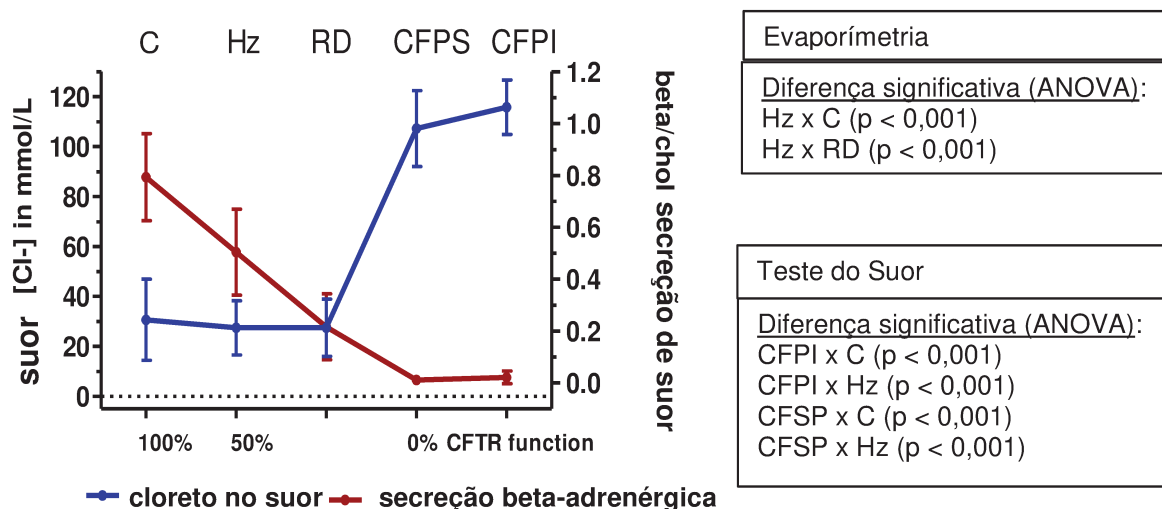
**Figura 30C:** Leitura da função da proteína CFTR por evaporimetria, como taxa de secreção de suor  $\beta$ -adrenérgica em relação à taxa de secreção de suor estimulada com carbacol (secreção de beta / col) (n = 51). A linha representa a média de cada grupo, onde C = *Control Negative for Cystic Fibrosis* (Controle Negativo para FC – C), RD = *Related Disorder* (Doenças Relacionadas a CFTR - CFTR-RD), CFPS = *Cystic Fibrosis Pancreatic Sufficiency* (Fibrose Cística com Suficiência Pancreática) e CFPI = *Cystic Fibrosis Pancreatic Insufficiency* (Fibrose Cística com Insuficiência Pancreática).



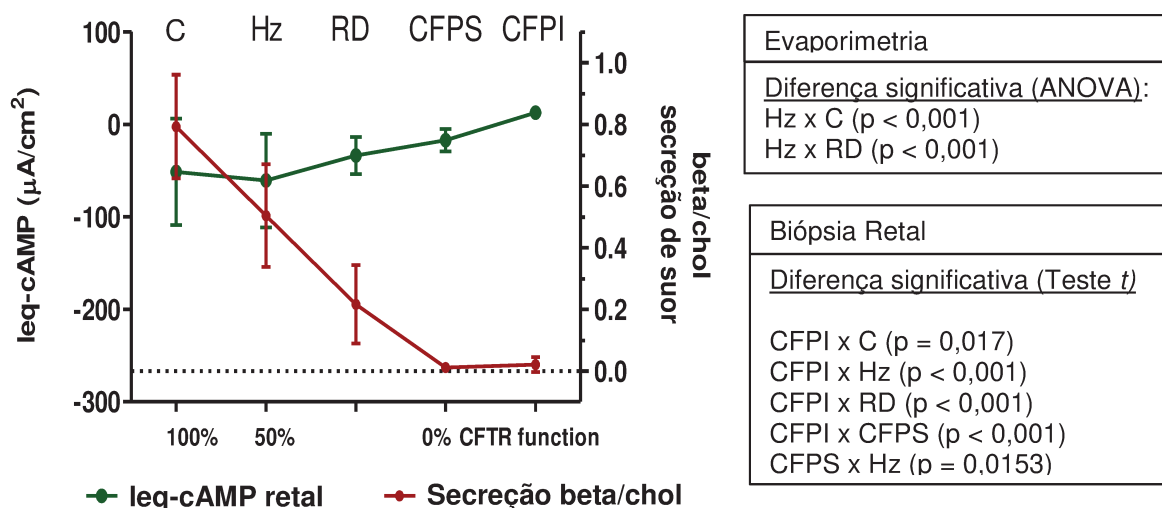
**Figura 30D:** Função da proteína CFTR medida com o teste do suor clássico (concentração de cloreto no suor em mmol / L) (n = 51). Cada ponto representa a média de 2 medições de cloreto no suor para um mesmo indivíduo. A linha representa a média das médias de cada grupo, onde C = *Control Negative for Cystic Fibrosis* (Controle Negativo para FC – C), RD = *Related Disorder* (Doenças Relacionadas a CFTR - CFTR-RD), CFPS = *Cystic Fibrosis Pancreatic Sufficiency* (Fibrose Cística com Suficiência Pancreática) e CFPI = *Cystic Fibrosis Pancreatic Insufficiency* (Fibrose Cística com Insuficiência Pancreática).

#### 5.4. Comparação do ensaio secretor de suor beta-adrenérgico (evaporimetria) com a secreção de Cl<sup>-</sup> mediada por CFTR em biópsias retais (teste de biópsia retal) e teste de suor clássico (TSC)

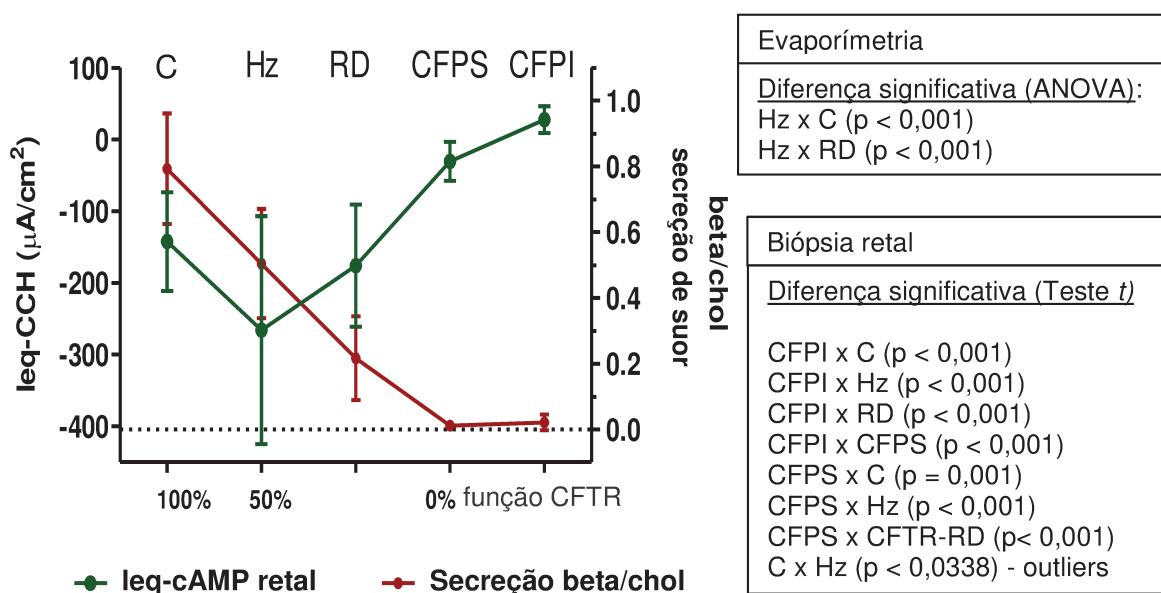
Conforme relatado anteriormente, a taxa de secreção  $\beta$ -adrenérgica de suor foi reduzida em aproximadamente 50% em Hz em comparação com indivíduos C. Este achado permitiu a discriminação estatisticamente significativa entre os casos C e Hz, conforme referido acima. Esta discriminação C / Hz não foi observada com o teste de biópsia retal ou com o TSC. No extremo mais grave do espectro de FC, a evaporimetria, assim como o TSC, não diferiram entre CFPS e CFPI, já que a secreção de suor  $\beta$ -adrenérgico estava completamente ausente em todos os pacientes com FC (Figura 31A). Neste espectro, o teste de biópsia retal mostrou sensibilidade superior ao distinguir os pacientes com CFPS e CFPI. Os pacientes com doença relacionada a CFTR (CFTR-RD), que, por definição, tem a função CFTR reduzida, também apresentaram taxas de secreção de suor  $\beta$ -adrenérgicas mais baixas em relação a Hz, porém, maiores em relação ao FC. Assim, a taxa de detecção linear da função CFTR da evaporimetria inclui o grupo de CFTR-RD, variando de C, Hz, CFTR-RD para pacientes com FC, como mostrado na Figura 31A. Por outro lado, no teste de biópsia retal, não houve distinção entre CFTR-RD e C, Hz em ambas as leituras analisadas (I-cAMP e I-CCH) (Figuras 31B e 31C). Neste teste diagnóstico, conseguimos detectar diferenças estatisticamente significativas apenas entre pacientes CFTR-RD e CFPS para I-CCH, mas não para I-cAMP, conforme referido acima. Nas duas leituras da função CFTR (I-cAMP e I-CCH), os pacientes com CFTR-RD mostraram também respostas diferentes em comparação com CFPI. Finalmente, no TSC, os pacientes com CFTR-RD apresentaram testes de suor normais ou limítrofes, que não eram distintos dos C ou Hz, mas que eram diferentes dos pacientes com FC. A faixa em que a evaporimetria é mais sensível, como teste diagnóstico de FC, é diferente em comparação com os testes de diagnóstico de FC funcionais já estabelecidos, como o teste de biópsia retal e o TSC. Todos os testes funcionais claramente separam indivíduos com FC de indivíduos não-FC. No entanto, o teste de biópsia retal mostrou ser um discriminador melhor na menor faixa de disfunção CFTR (distingue bem CFPS de CFPI) e a evaporimetria mostrou discriminar muito bem o espectro médio-leve da disfunção CFTR, desde C até FC (C, Hz, CFTR-RD) (Figuras 31B e 31C).



**Figura 31A:** Comparação da função da proteína CFTR medida por TSC e por evaporimetria (teste de secreção de suor  $\beta$  adrenérgico expresso como razão beta / chol) ( $n = 51$ ). Os dados são médias  $\pm$  DP, onde C = *Control Negative for Cystic Fibrosis* (Controle Negativo para FC – C), RD = *Related Disorder* (Doenças Relacionadas a CFTR - CFTR-RD), CFPS = *Cystic Fibrosis Pancreatic Sufficiency* (Fibrose Cística com Suficiência Pancreática) e CFPI = *Cystic Fibrosis Pancreatic Insufficiency* (Fibrose Cística com Insuficiência Pancreática).



**Figura 31B:** Comparação da função da proteína CFTR medida por diferença de potencial em fragmentos de mucosa retal (Ieq-cAMP) e por evaporimetria, expresso como razão beta / chol ( $n = 50$ ). Os dados são médias  $\pm$  DP, onde C = *Control Negative for Cystic Fibrosis* (Controle Negativo para FC – C), RD = *Related Disorder* (Doenças Relacionadas a CFTR - CFTR-RD), CFPS = *Cystic Fibrosis Pancreatic Sufficiency* (Fibrose Cística com Suficiência Pancreática) e CFPI = *Cystic Fibrosis Pancreatic Insufficiency* (Fibrose Cística com Insuficiência Pancreática).



**Figura 31C:** Comparação da função da proteína CFTR medida por diferença de potencial em fragmentos de mucosa retal (leq-CCH) e por evaporimetria, expresso como relação beta / chol ( $n = 50$ ). Os dados são médias  $\pm$  DP, onde C = *Control Negative for Cystic Fibrosis* (Controle Negativo para FC – C), RD = *Related Disorder* (Doenças Relacionadas a CFTR - CFTR-RD), CFPS = *Cystic Fibrosis Pancreatic Sufficiency* (Fibrose Cística com Suficiência Pancreática) e CFPI = *Cystic Fibrosis Pancreatic Insufficiency* (Fibrose Cística com Insuficiência Pancreática).

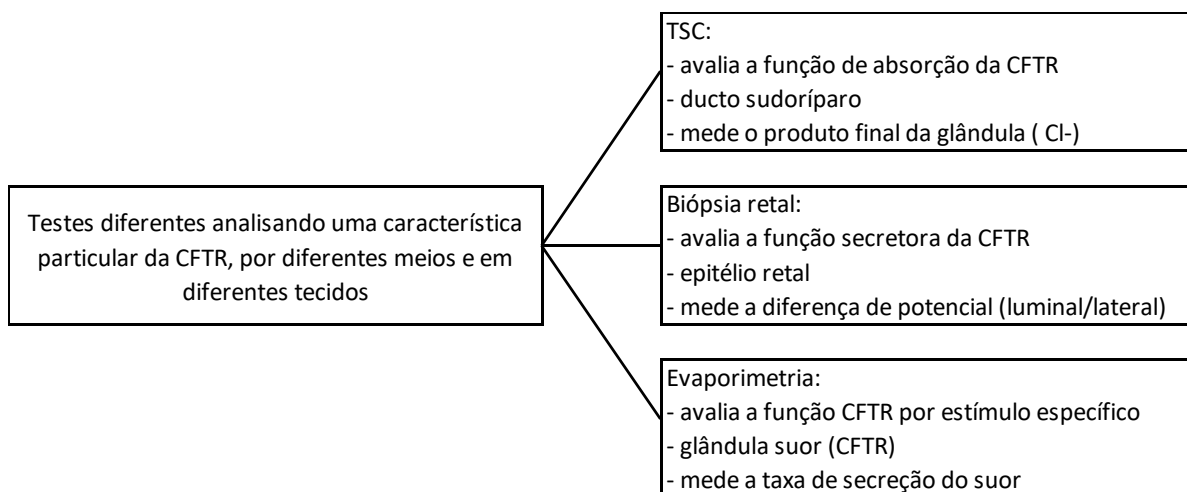
## DISCUSSÃO

A evaporimetria foi recentemente validada como um novo teste *in vivo* para medir a função CFTR (66). Este teste baseia-se no acesso à função secretora de  $\text{Cl}^-$  dos canais CFTR presentes na glândula sudorípara. A evaporimetria já mostrou maior sensibilidade na extremidade mais leve do espectro da disfunção CFTR em relação ao TSC clinicamente utilizado (66). Este estudo comparativo também demonstrou superioridade diagnóstica da evaporimetria em discriminar entre diferentes níveis leve-médio da disfunção CFTR quando comparado ao teste de biópsia retal, ou seja, entre C, Hz e CFTR- RD. Por outro lado, a medida de corrente intestinal, no teste de biópsia retal, mostra uma melhor discriminação no espectro severo da doença, ou seja, entre pacientes CFPS e CFPI.

Uma explicação principal para essas diferenças é que os vários testes avaliam a função CFTR por diferentes meios em diferentes tecidos. O TSC avalia a função de absorção de CFTR no ducto sudorípara, medindo a concentração de  $\text{Cl}^-$  no suor. No tecido retal, os canais CFTR apresentam funções secretoras e absorptivas de  $\text{Cl}^-$  ao longo do eixo epitelial da relação vilosidade-cripta, mas, devido ao protocolo do teste de biópsia retal, o CFTR é principalmente avaliado em sua função secretora.



As medidas de biópsia retal registram a resposta da diferença de potencial entre as faces luminal e basolateral do epitélio subjacente a um estímulo de ativação CFTR específico (cAMP e CCH). Em contraste, a evaporimetria avalia a taxa de suor secretado após uma estimulação CFTR muito específica (colinérgica e  $\beta$ -adrenérgica). Assim, todos esses testes diferentes avaliam apenas uma característica muito particular da função CFTR e fazem isso como um biomarcador alternativo para doença sistêmica de FC (Figura 32).



**Figura 32:** Descrição comparativa entre o teste do suor clássico, o teste de biópsia retal e a evaporimetria

Até o momento, nem o TSC, nem a DPN (não avaliada neste estudo), nem o teste da biópsia retal têm sido capazes, como um teste isolado, de prever com precisão o fenótipo individual de FC ou um envolvimento específico de órgão em doença de FC (87, 103, 104).

Da mesma forma, a evaporimetria sozinha não é capaz de prever o intervalo fenotípico completo do espectro FC, isto é, não consegue prever especificamente o envolvimento do pâncreas na FC. No Grupo 2, para a paciente portadora das mutações F508del / D1152H (Paciente 99/2010, Grupo 2) e para outros pacientes ainda sem análise genética (Paciente 51Bx18), o resultado combinando a evaporimetria e o teste de biópsia retal apoiou um diagnóstico de CFTR-RD ao invés de FC. Em vez de analisar o desempenho de um teste único, a avaliação futura de risco de diagnóstico para doença FC precisará se basear em uma combinação de testes funcionais, que podem fornecer uma ferramenta melhor para prever o fenótipo FC e / ou doença órgão-específica. Isso pode ser alcançado usando

a análise de componentes principais de todas as medidas funcionais disponíveis ou outros algoritmos estatísticos. De qualquer forma, a evaporimetria, que parece ser o teste mais sensível para identificar qualquer função CFTR anormal, poderá servir como um componente para o diagnóstico de FC (como observado na Figura 31 A,B e C).

À medida que a visão da FC como um espectro de doenças evolui, a determinação do ponto de corte de diagnóstico para o risco de doença de FC torna-se cada vez mais difícil. Estabelecer ou excluir um diagnóstico de FC ou CFTR-RD é ainda mais complexo em virtude da complexidade da genética CFTR. A evaporimetria pode ajudar a compreender esse espectro, pois pode ser um suporte à exclusão da doença FC em pacientes que apresentam sinais e sintomas semelhantes a FC, TSC limítrofe ou positivo, para os quais o resultado da evaporimetria apresenta-se em um intervalo normal. Desta forma, o diagnóstico de FC ou CFTR-RD foi presumidamente excluído no Grupo 2 para 8 pacientes com doença sinopulmonar ou bronquiectasia e em um diagnóstico incerto de FC (Tabela 7). No entanto, apesar da introdução da evaporimetria, há casos cada vez mais complexos para os quais um diagnóstico específico ou avaliação de risco não pode ser definido. Por exemplo, dois pacientes apresentaram ausência de secreção de suor  $\beta$ -adrenérgica, mas uma secreção normal de CFTR-CI na biópsia retal, apoiando um provável diagnóstico de CFTR-RD em vez de um FC; outros dois que também mostraram ausência de secreção de suor  $\beta$ -adrenérgica, apresentaram função CFTR residual na biópsia retal, mostrando um estado de suficiência pancreática (CFPS). Análises genéticas mais profundas ainda são necessárias para avaliar a relação entre a função genótipo-fenótipo-CFTR, que permanece complexa, como mostrado em vários fenótipos de FC.

Cada um dos testes para o diagnóstico funcional avaliados tem vantagens e limitações, o que, por sua vez, afetará a sua aplicação clínica. A evaporimetria é fácil de realizar após treinamento do profissional, sendo que tal técnica já foi estabelecida em alguns centros do mundo. Sua aplicação é, no entanto, limitada em pacientes com menos de 5 anos de idade devido à necessidade de injeções subcutâneas repetidas. A DPN requer uma configuração e conhecimento técnico complexos para permitir registros de alta qualidade. A necessidade de alta cooperação durante o exame e a inserção de uma agulha subcutânea também limita,

geralmente, sua aplicação a pacientes menores de 6 anos de idade. O registro da DPN e, portanto, a interpretação do resultado do teste, são facilmente influenciadas pela inflamação da mucosa, que é comumente encontrada em pacientes com doença sinopulmonar crônica. Em contraste, o teste de biópsia retal embora possa parecer mais invasivo, pode ser realizado em todas as faixas etárias. As biópsias de tecido retal podem ser obtidas de forma segura e as medidas funcionais da atividade de CFTR podem então ser realizadas *ex vivo*, sem a necessidade de cooperação do paciente. No entanto, a configuração técnica e o funcionamento da câmara de Ussing requerem treinamento eletrofisiológico avançado para se obter também registros de alta qualidade e consequente interpretação do resultado (Quadro 5).

**Quadro 5:** Vantagens e limitações dos testes de diagnóstico funcional avaliados (66, 87, 100, 105)

Teste de biópsia retal	Evaporimetria	Teste do suor clássico
Pode ser realizado em qualquer faixa etária (com ou sem sedação), de forma segura e indolor.	Geralmente factível em indivíduos com idade superior a 5 anos. Requer colaboração.	Pode ser realizado em qualquer faixa etária com desconforto mínimo.
Necessário treinamento de eletrofisiologia avançada.	Relativamente de fácil execução e interpretação, requerendo alguns dias de treinamento.	Necessário treinamento adequado e observância com rigor nas etapas.
Não há necessidade de cooperação do paciente.	Necessária colaboração do paciente. Poucos lugares no mundo realizam a técnica.	Necessária pouca colaboração. Há falta de padronização no Brasil, devendo-se seguir diretrizes internacionais.
Resultado após 2-3 horas de avaliação do fragmento obtido.	Resultado imediato após o término do exame (30 a 40 minutos).	Pode ser dosado em local diferente de onde foi coletado.

A vantagem deste estudo comparativo é que os mesmos profissionais realizaram os mesmos testes funcionais (TSC, teste de biópsia retal e evaporimetria), evitando assim qualquer variabilidade entre operadores dentro do mesmo teste. Além disso, todos os pacientes recrutados estão passando por genotipagem extensiva. No entanto, apenas um número limitado de mutações do gene *CFTR* foi realizado para indivíduos controles negativos para FC, sendo que para o Grupo 2, a avaliação genética ainda está sendo analisada para alguns pacientes.

Outra limitação deste estudo é a ausência de qualquer paciente com um CFTR-RD realmente estabelecido, como, por exemplo, CBAVD com análise genética, o que teria permitido uma melhor estimativa do desempenho do teste de

biópsia retal e evaporimetria neste espectro de disfunção CFTR. Finalmente, o número de pacientes envolvidos limita uma análise estatística mais profunda e detalhada para avaliar a sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico realizados aqui.

## CONCLUSÃO

Como conclusão principal, o presente estudo demonstrou que o teste de biópsia retal provou ser bom discriminador dentro do espectro severo da doença FC, sendo sensível para detectar níveis mais baixos de função CFTR. No entanto, a evaporimetria discrimina melhor níveis funcionais dentro do espectro mais moderado. A evaporimetria tem o potencial de tornar-se uma ferramenta adjuvante no diagnóstico de FC e, juntamente com a biópsia retal e o TSC, pode ajudar a definir os casos de FC e auxiliar no diagnóstico de CFTR-RD.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Navarro S. [Historical compilation of cystic fibrosis]. *Gastroenterol Hepatol*. 2016;39(1):36-42.
2. Andersen DH. Cystic Fibrosis of the pancreas and its relations to celiac disease: A clinical and pathologic study. *Am. J. Dis. Child*. 1938. p. 344-99.
3. MISCH KA, HOLDEN HM. Sweat test for the diagnosis of fibrocystic disease of the pancreas; report of a fatality. *Arch Dis Child*. 1958;33(168):179-80.
4. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*. 1983;301(5899):421-2.
5. ANDERSEN DH, HODGES RG. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child*. 1946;72:62-80.
6. Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet*. 1979;1(8114):472-4.
7. GIBSON LE, COOKE RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. 1959;23(3):545-9.
8. PARKINS RA, EIDELMAN S, RUBIN CE, DOBBINS WO, PHELPS PC. THE DIAGNOSIS OF CYSTIC FIBROSIS BY RECTAL SUCTION BIOPSY. *Lancet*. 1963;2(7313):851-6.
9. Sato K, Sato F. Defective beta adrenergic response of cystic fibrosis sweat glands in vivo and in vitro. *J Clin Invest*. 1984;73(6):1763-71.
10. Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev*. 1999;79(1 Suppl):S3-S22.
11. Knowlton RG, Cohen-Haguenuer O, Van Cong N, Frézal J, Brown VA, Barker D, et al. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature*. 1985;318(6044):380-2.
12. Hirtz S, Gonska T, Seydewitz HH, Thomas J, Greiner P, Kuehr J, et al. CFTR Cl<sup>-</sup> channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2004;127(4):1085-95.
13. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-80.
14. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066-73.
15. Borowitz D. CFTR, bicarbonate, and the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2015;50 Suppl 40:S24-S30.
16. Moskowitz SM, Chmiel JF, Stern DL, Cheng E, Gibson RL, Marshall SG, et al. Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet Med*. 2008;10(12):851-68.
17. Culling B, Ogle R. Genetic counselling issues in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2010;11(2):75-9.
18. Moskowitz SM, Gibson RL, Effmann EL. Cystic fibrosis lung disease: genetic influences, microbial interactions, and radiological assessment. *Pediatr Radiol*. 2005;35(8):739-57.
19. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(3):218-27.
20. Linsdell P. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel blockers: Pharmacological, biophysical and physiological relevance. *World J Biol Chem*. 2014;5(1):26-39.
21. Fanen P, Wohlhuter-Haddad A, Hinzpeter A. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;52:94-102.
22. Rowe SM, Verkman AS. Cystic fibrosis transmembrane regulator correctors and potentiators. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(7).
23. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr*. 2017;181S:S4-S15.e1.

24. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med*. 2016;4(8):662-74.
25. Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro M, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*. 2013;39(3):306-16.
26. De Boeck K, Amaral MD. Classification of CFTR mutation classes - Authors' reply. *Lancet Respir Med*. 2016;4(8):e39.
27. Amaral MD, Kunzelmann K. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends in pharmacological sciences*. 2007;28(7):334-41.
28. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993;73(7):1251-4.
29. Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet*. 2002;111(1):88-95.
30. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet*. 2003;67(Pt 5):471-85.
31. Ramalho AS, Beck S, Meyer M, Penque D, Cutting GR, Amaral MD. Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27(5):619-27.
32. Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21873-7.
33. Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Bijman J, Veeze H, Tümmler B. Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin Res*. 2000;3(4):277-93.
34. Mickle JE, Cutting GR. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med Clin North Am*. 2000;84(3):597-607.
35. Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Polymorphisms in the glutathione pathway modulate cystic fibrosis severity: a cross-sectional study. *BMC Med Genet*. 2014;15:27.
36. Bareil C, Thèze C, Bérout C, Hamroun D, Guittard C, René C, et al. UMD-CFTR: a database dedicated to CF and CFTR-related disorders. *Hum Mutat*. 2010;31(9):1011-9.
37. Kiesewetter S, Macek M, Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, et al. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet*. 1993;5(3):274-8.
38. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med*. 2015;277(2):155-66.
39. Mehta G, Macek M, Mehta A, Group ERW. Cystic fibrosis across Europe: EuroCareCF analysis of demographic data from 35 countries. *J Cyst Fibros*. 2010;9 Suppl 2:S5-S21.
40. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009;373(9678):1891-904.
41. Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev*. 2013;22(127):58-65.
42. Ribeiro JD, Ribeiro MA, Ribeiro AF. [Controversies in cystic fibrosis--from pediatrician to specialist]. *J Pediatr (Rio J)*. 2002;78 Suppl 2:S171-86.
43. Raskin S, Phillips JA, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet*. 1993;46(6):665-9.
44. GBEFC[Internet]. Relatórios Anuais. São Paulo: Grupo Brasileiro De Estudos De Fibrose Cística; [atualizada em 20/03/2016; acesso em 23/05/2018]. Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC) 2015. Disponível em: <http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2017/11/Registro2015.pdf>.
45. Kerem E. Cystic fibrosis: Priorities and progress for future therapies. *Paediatr Respir Rev*. 2017;24:14-6.
46. Fajac I, De Boeck K. New horizons for cystic fibrosis treatment. *Pharmacol Ther*. 2017;170:205-11.

47. Farrell PM, White TB, Derichs N, Castellani C, Rosenstein BJ. Cystic Fibrosis Diagnostic Challenges over 4 Decades: Historical Perspectives and Lessons Learned. *J Pediatr.* 2017;181S:S16-S26.
48. De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Med.* 2017;46(6 Pt 2):e97-e108.
49. Farrell LN, Strauss JS, Stranieri AM. The treatment of severe cystic acne with 13-cis-retinoic acid. Evaluation of sebum production and the clinical response in a multiple-dose trial. *J Am Acad Dermatol.* 1980;3(6):602-11.
50. Li L, Somerset S. Digestive system dysfunction in cystic fibrosis: challenges for nutrition therapy. *Dig Liver Dis.* 2014;46(10):865-74.
51. Frizzell RA, Hanrahan JW. Physiology of epithelial chloride and fluid secretion. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(6):a009563.
52. Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet.* 2015;16(1):45-56.
53. Blackman SM, Deering-Brose R, McWilliams R, Naughton K, Coleman B, Lai T, et al. Relative contribution of genetic and nongenetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. *Gastroenterology.* 2006;131(4):1030-9.
54. Abraham JM, Taylor CJ. Cystic Fibrosis & disorders of the large intestine: DIOS, constipation, and colorectal cancer. *J Cyst Fibros.* 2017;16 Suppl 2:S40-S9.
55. Siano M, De Gregorio F, Boggia B, Sepe A, Ferri P, Buonpensiero P, et al. Ursodeoxycholic acid treatment in patients with cystic fibrosis at risk for liver disease. *Dig Liver Dis.* 2010;42(6):428-31.
56. Kobelska-Dubiel N, Klincewicz B, Cichy W. Liver disease in cystic fibrosis. *Prz Gastroenterol.* 2014;9(3):136-41.
57. Tiddens HA, Rosenow T. What did we learn from two decades of chest computed tomography in cystic fibrosis? *Pediatr Radiol.* 2014;44(12):1490-5.
58. Chmiel JF, Aksamit TR, Chotirmall SH, Dasenbrook EC, Elborn JS, LiPuma JJ, et al. Antibiotic management of lung infections in cystic fibrosis. II. Nontuberculous mycobacteria, anaerobic bacteria, and fungi. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11(8):1298-306.
59. Jain M, Goss CH. Update in cystic fibrosis 2013. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189(10):1181-6.
60. Whelan FJ, Heirali AA, Rossi L, Rabin HR, Parkins MD, Surette MG. Longitudinal sampling of the lung microbiota in individuals with cystic fibrosis. *PLoS One.* 2017;12(3):e0172811.
61. Farrell PM, White TB, Howenstine MS, Munck A, Parad RB, Rosenfeld M, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis in Screened Populations. *J Pediatr.* 2017;181S:S33-S44.e2.
62. Sosnay PR, White TB, Farrell PM, Ren CL, Derichs N, Howenstine MS, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis in Nonscreened Populations. *J Pediatr.* 2017;181S:S52-S7.e2.
63. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr.* 2008;153(2):S4-S14.
64. Simmonds NJ, Bush A. Diagnosing cystic fibrosis: what are we sweating about? *Thorax.* 2012;67(7):571-3.
65. Bosch B, Bilton D, Sosnay P, Raraigh KS, Mak DY, Ishiguro H, et al. Ethnicity impacts the cystic fibrosis diagnosis: A note of caution. *J Cyst Fibros.* 2017.
66. Quinton P, Molyneux L, Ip W, Dupuis A, Avolio J, Tullis E, et al.  $\beta$ -adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(8):732-9.
67. Gilljam M, Ellis L, Corey M, Zielenski J, Durie P, Tullis DE. Clinical manifestations of cystic fibrosis among patients with diagnosis in adulthood. *Chest.* 2004;126(4):1215-24.
68. Dalcin PeT, Abreu E Silva FA. Cystic fibrosis in adults: diagnostic and therapeutic aspects. *J Bras Pneumol.* 2008;34(2):107-17.
69. Spicuzza L, Sciuto C, Di Dio L, Mattina T, Leonardi S, del Giudice MM, et al. Mild cystic fibrosis in patients with the rare P5L CFTR mutation. *J Cyst Fibros.* 2012;11(1):30-3.

70. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros*. 2011;10 Suppl 2:S86-102.
71. Dequeker E, Stuhrmann 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--updated European recommendations. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(1):51-65.
72. Lebecque P, Pepermans X, Marchand E, Leonard A, Leal T. ABPA in adulthood: a CFTR-related disorder. *Thorax*. 2011;66(6):540-1.
73. Levy H, Farrell PM. New challenges in the diagnosis and management of cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2015;166(6):1337-41.
74. Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA*. 1992;267(13):1794-7.
75. Ratbi I, Legendre M, Niel F, Martin J, Soufir JC, Izard V, et al. Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene rearrangements enriches the mutation spectrum in congenital bilateral absence of the vas deferens and impacts on genetic counselling. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1285-91.
76. Castellani C, Assael BM. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(1):129-40.
77. Ferec C, Cutting GR. Assessing the Disease-Liability of Mutations in CFTR. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(12):a009480.
78. Rademacher J, Welte T. Bronchiectasis--diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2011;108(48):809-15.
79. Moulton BC, Barker AF. Pathogenesis of bronchiectasis. *Clin Chest Med*. 2012;33(2):211-7.
80. Wang Z. Bronchiectasis: still a problem. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(1):157-72.
81. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008;7(3):179-96.
82. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 1989;245(4922):1059-65.
83. Dal'Maso VB, Mallmann L, Siebert M, Simon L, Saraiva-Pereira ML, Dalcin PeT. Diagnostic contribution of molecular analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in patients suspected of having mild or atypical cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*. 2013;39(2):181-9.
84. Yao R, Goetzinger KR. Genetic Carrier Screening in the Twenty-first Century. *Clin Lab Med*. 2016;36(2):277-88.
85. Schrijver I, Pique L, Graham S, Pearl M, Cherry A, Kharrazi M. The Spectrum of CFTR Variants in Nonwhite Cystic Fibrosis Patients: Implications for Molecular Diagnostic Testing. *J Mol Diagn*. 2016;18(1):39-50.
86. Gonska T, Ip W, Turner D, Han WS, Rose J, Durie P, et al. Sweat gland bioelectrics differ in cystic fibrosis: a new concept for potential diagnosis and assessment of CFTR function in cystic fibrosis. *Thorax*. 2009;64(11):932-8.
87. Sousa M, Servidoni MF, Vinagre AM, Ramalho AS, Bonadia LC, Felício V, et al. Measurements of CFTR-mediated Cl<sup>-</sup> secretion in human rectal biopsies constitute a robust biomarker for Cystic Fibrosis diagnosis and prognosis. *PLoS One*. 2012;7(10):e47708.
88. DI SANT'AGNESE PA, DARLING RC, PERERA GA, SHEA E. Sweat electrolyte disturbances associated with childhood pancreatic disease. *Am J Med*. 1953;15(6):777-84.
89. Taylor CJ, Hardcastle J, Southern KW. Physiological measurements confirming the diagnosis of cystic fibrosis: the sweat test and measurements of transepithelial potential difference. *Paediatr Respir Rev*. 2009;10(4):220-6.
90. Hardcastle J, Hardcastle PT, Taylor CJ, Goldhill J. Failure of cholinergic stimulation to induce a secretory response from the rectal mucosa in cystic fibrosis. *Gut*. 1991;32(9):1035-9.



91. Veeze HJ, Sinaasappel M, Bijman J, Bouquet J, de Jonge HR. Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 1991;101(2):398-403.
92. Mall M, Hirtz S, Gonska T, Kunzelmann K. Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2004;3 Suppl 2:165-9.
93. De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I, Sermet I, et al. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros*. 2011;10 Suppl 2:S53-66.
94. Solomon GM, Liu B, Sermet-Gaudelus I, Fajac I, Wilschanski M, Vermeulen F, et al. A multiple reader scoring system for Nasal Potential Difference parameters. *J Cyst Fibros*. 2017;16(5):573-8.
95. Schüler D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Ballmann M, Dechaux M, Edelman A, et al. Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *J Cyst Fibros*. 2004;3 Suppl 2:151-5.
96. Behm JK, Hagiwara G, Lewiston NJ, Quinton PM, Wine JJ. Hyposecretion of beta-adrenergically induced sweating in cystic fibrosis heterozygotes. *Pediatr Res*. 1987;22(3):271-6.
97. Quinton PM. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:212-25.
98. Lindkvist B. Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. *World J Gastroenterol*. 2013;19(42):7258-66.
99. Paranjape SM, Zeitlin PL. Atypical cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008;35(3):116-23.
100. Gomez CC, Servidoni MeF, Marson FA, Canavezi PJ, Vinagre AM, Costa ET, et al. Pulsed direct and constant direct currents in the pilocarpine iontophoresis sweat chloride test. *BMC Pulm Med*. 2014;14:198.
101. Shales O. A simple and accurate method for the determination for the chloride in biological fluids. In: Shales SS, editor. 1941.
102. Mall M, Wissner A, Seydewitz HH, Kuehr J, Brandis M, Greger R, et al. Defective cholinergic Cl(-) secretion and detection of K(+) secretion in rectal biopsies from cystic fibrosis patients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;278(4):G617-24.
103. van Barneveld A, Stanke F, Tamm S, Siebert B, Brandes G, Derichs N, et al. Functional analysis of F508del CFTR in native human colon. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(11):1062-9.
104. Derichs N, Sanz J, Von Kanel T, Stolpe C, Zapf A, Tümmler B, et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax*. 2010;65(7):594-9.
105. Servidoni MF, Gomez CCS, Marson FAL, Toro AADC, Ribeiro MG, Ribeiro JD, et al. Sweat test and cystic fibrosis: overview of test performance at public and private centers in the state of São Paulo, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2017;43(2):121-8.

## ANEXO 1: TCLE – Paciente menor (Biópsia Retal)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP  
Projeto de Pesquisa

***AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA CFTR ATRAVÉS DE ESTUDOS DE ELETROFISIOLOGIA EM BIÓPSIAS RETAIS E DA ESTIMULAÇÃO  $\beta$ -ADRENÉRGICA DAS GLANDULAS SUDORÍPARAS EM PACIENTES COM DOENÇAS RELACIONADAS À CFTR (CFTR-RD)***

Paciente menor- Biópsia Retal

Seu (sua) filho (a) está sendo convidado (a) a participar de um estudo que poderá ajudar no diagnóstico do problema de saúde que ele apresenta e que ainda não foi bem esclarecido. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, é feito em duas vias (uma delas ficará com você e a outra com o pesquisador) e tem por objetivo assegurar seus direitos como participante.

**Leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas**, o que poderá ser feito antes ou mesmo depois de assiná-lo. Se você não quiser que seu filho (a) participe ou desejar retirar sua autorização a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Este é um projeto de pesquisa para estudar o funcionamento das glândulas sudoríparas (de suor) de pessoas seguidas no Hospital de Clínicas da Unicamp que apresentem problemas pulmonares (bronquiectasia) ou alteração nos órgãos genitais masculinos que causa falta de produção de espermatozoides (azospermia) ou Fibrose Cística (doença que produz secreções espessas, causando problemas respiratórios e mal funcionamento do pâncreas) ou ainda outras doenças parecidas com a Fibrose Cística (chamadas de FC-RD).

Ao verificarmos os resultados dos exames que seu (sua) filho (a) realizou na etapa anterior desta pesquisa, que demonstram um funcionamento alterado destas glândulas, propomos o estudo das células do intestino, coletadas por exame de biópsia retal. Também será realizada a coleta de uma amostra de sangue para estudo de DNA pois pode ser que seu filho (a) tenha herdado de vocês (seus pais) algum erro que leve a esse problema. A biópsia retal, deverá ser realizada no Gastrocentro ou no Centro Cirúrgico Ambulatorial do Hospital das Clínicas Unicamp, com duração de 10 minutos, onde serão coletados de 4 a 5 fragmentos (pedaços) do intestino (reto), através de uma pinça de biópsia. Os riscos de sangramento e dor neste procedimento são mínimos, pois os pedaços retirados são pequenos e superficiais e o local possui poucos nervos, podendo ocorrer apenas desconforto semelhante ao da preparação que se faz para a lavagem intestinal.

A partir de 4ml de sangue coletado da veia do (a) paciente, será feita o estudo do material genético, chamado DNA, que é onde tem todas as informações seu (sua) filho (a) herdou de vocês (seus pais). Os riscos da coleta de sangue são manchas roxas no local e um pouco de dor durante a picada, cujo desconforto será diminuído pois o procedimento será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado.

O teste de DNA que será feito é parcial, podendo acontecer de não conseguirmos identificar o erro genético. Por outro lado, a presença da alteração genética pode não se relacionar diretamente com o aparecimento de sintomas de doenças porque outros fatores podem influenciar o surgimento das mesmas. Desta forma, o conhecimento do resultado do estudo genético poderá gerar ansiedade na espera de manifestações que não necessariamente ocorrerão. Isso deve ser levado em consideração por você para escolher se deseja ou não ser informado sobre o resultado do exame genético.

Você poderá autorizar a guarda do material biológico (biópsia e amostra de sangue) de seu (sua) filho (a) para o estudo da sua doença. Qualquer outro projeto que queira utilizá-lo, deverá ser previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM e autorizado por você novamente.

Informamos que não haverá nenhum benefício financeiro para que esses procedimentos sejam realizados. A única vantagem que o paciente terá é que ele (a) ou seus responsáveis terão conhecimento dos resultados dos exames que serão entregues pelo médico do ambulatório em que ele (a) faz seguimento, sendo por ele comunicado caso seja observada alguma alteração existente, ficando disponível o Aconselhamento Genético no Ambulatório de Fibrose Cística pela Geneticista Carmen Sílvia Bertuzzo.

Todos os resultados ficarão em absoluto sigilo, ficando disponíveis apenas para pesquisa, sendo que, em caso de publicação científica, nenhum nome de paciente será divulgado.

Em caso de dúvida, o (a) paciente poderá contatar os pesquisadores no **Centro de Investigação em Pediatria – CIPED**, onde serão realizados os testes, no **endereço** Rua Tessália Vieira de Camargo nº 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, CEP 13083-887, Campinas-SP, Brasil, **telefone:** (19) 3521-8970, **fone-fax:** (19) 3521-8814, **e-mail** ciped@fcm.unicamp.br.

Em caso de denúncias e/ou reclamações referentes aos aspectos éticos da pesquisa, entre em contato com os Comitês de Ética em Pesquisa (CEP): Unicamp Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/n.º, 1º andar, Canela – Salvador–Bahia; telefone (71) 3283- 8043; cep.hupes@gmail.com.

#### AUTORIZAÇÃO PARA INFORMAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS

DESEJO ser informado de alterações genéticas no exame do (a) meu (minha) filho (a)

NÃO DESEJO ser informado de alterações genéticas

#### AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO que as amostras de sangue do meu (minha) filho (a) sejam armazenadas, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO que as amostras de sangue do meu (minha) filho (a) sejam armazenadas, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional. As amostras de sangue serão armazenadas no laboratório de Fibrose Cística no CIPED- Unicamp.

#### Consentimento livre e esclarecido: Aceito participar

Nome do (a) participante: \_\_\_\_\_ portador do RG \_\_\_\_\_ telefone  
 \_\_\_\_\_ residente na rua \_\_\_\_\_ bairro  
 \_\_\_\_\_ cidade \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

Email \_\_\_\_\_

Parentesco do responsável legal: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 Nome e assinatura do responsável legal do (a) participante

#### Responsabilidade do Pesquisador

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

\_\_\_\_\_  
 Nome, assinatura e RG do pesquisador - data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

#### Pesquisadores Responsáveis:

Dra Helga Kaiser Sanches De Maria ou Dra. Maria de Fátima Servidoni

Profa. Dra. Mônica Corso Pereira

Profa. Dra. Carmem Silva Bertuzzo

Profa. Dra Maria Angélica Santana

Prof. Dra Edna Lucia Santos de Souza

Fone: 19 3521-8983

Fone: 19 3521-7776

Fone: 19 3521-8994

Fone: 71 3117-1610

Fone: 71 3283-0000

## ANEXO 2: TCLE – Paciente maior (Biópsia Retal)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP  
Projeto de Pesquisa

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA CFTR ATRAVÉS DE ESTUDOS DE  
ELETROFISIOLOGIA EM BIÓPSIAS RETAIS E DA ESTIMULAÇÃO  $\beta$ -ADRENÉRGICA DAS  
GLANDULAS SUDORÍPARAS EM PACIENTES COM DOENÇAS RELACIONADAS À CFTR  
(CFTR-RD)**

Paciente maior- Biópsia Retal

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo que poderá ajudar no diagnóstico do problema de saúde que você apresenta e que ainda não foi bem esclarecido. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, é feito em duas vias (uma delas ficará com você e a outra com o pesquisador) e tem por objetivo assegurar seu direito como participante.

**Leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas**, o que poderá ser feito antes ou mesmo depois de assiná-lo. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Este é um projeto de pesquisa para estudar o funcionamento das glândulas sudoríparas (de suor) de pessoas seguidas no Hospital de Clínicas da Unicamp que apresentem problemas pulmonares (bronquiectasia) ou alteração nos órgãos genitais masculinos que causa falta de produção de espermatozoides (azospermia) ou Fibrose Cística (doença que produz secreções espessas, causando problemas respiratórios e mal funcionamento do pâncreas) ou ainda outras doenças parecidas com a Fibrose Cística (chamadas de FC-RD).

Ao verificarmos os resultados dos exames que você realizou na etapa anterior desta pesquisa, que demonstram um funcionamento alterado destas glândulas, propomos o estudo da mesma proteína nas células do intestino, coletadas por exame de biópsia retal. Também será realizada a coleta de uma amostra de sangue para estudo de DNA pois pode ser que você tenha herdado dos seus pais algum erro que leve a esse problema. A biópsia retal, deverá ser realizada no Gastrocentro ou no Centro Cirúrgico Ambulatorial do Hospital das Clínicas Unicamp, com duração de 10 minutos, onde serão coletados de 4 a 5 fragmentos (pedaços) do intestino (reto), através de uma pinça de biópsia.

Os riscos de sangramento e dor neste procedimento são mínimos, pois os pedaços retirados são pequenos e superficiais e o local possui poucos nervos, podendo ocorrer apenas desconforto semelhante ao da preparação que se faz para a lavagem intestinal.

A partir de 4ml de sangue coletado da sua veia, será feito o estudo do material genético, chamado DNA, que é onde tem todas as informações que você herdou de seus pais.

Os riscos da coleta de sangue são manchas roxas no local e um pouco de dor durante a picada, cujo o desconforto será pequeno porque o procedimento será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado.

O teste de DNA que será feito é parcial, podendo acontecer de não conseguirmos identificar o erro genético. Por outro lado, a presença da alteração genética pode não se relacionar diretamente com o aparecimento de sintomas de doenças porque outros fatores podem influenciar o surgimento das mesmas. Desta forma, o conhecimento do resultado do estudo genético poderá gerar ansiedade na espera de manifestações que não necessariamente ocorrerão. Isso deve ser levado em consideração por você para escolher se deseja ou não ser informado sobre o resultado do exame genético.

Você poderá autorizar a guarda do material biológico (biópsia e amostra de sangue) para o estudo da sua doença. Qualquer outro projeto que queira utilizá-lo, deverá ser previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM e autorizado por você novamente.

Informamos que não haverá nenhum benefício financeiro para que esses procedimentos sejam realizados. A única vantagem que o paciente terá é saber os resultados dos exames que lhe serão entregues pelo médico do ambulatório em que faz seguimento, sendo por ele comunicado caso seja observada alguma alteração existente, ficando disponível o Aconselhamento Genético no Ambulatório de Fibrose Cística pela Geneticista Carmen Sílvia Bertuzzo.

Todos os resultados ficarão em absoluto sigilo, ficando disponíveis apenas para pesquisa, sendo que, em caso de publicação científica, nenhum nome de paciente será divulgado.

Em caso de dúvida, você poderá contatar os pesquisadores no **Centro de Investigação em Pediatria – CIPED**, onde serão realizados os testes, no **endereço** Rua Tessália Vieira de Camargo nº 126, Cidade

Universitária Zeferino Vaz, CEP 13083-887, Campinas-SP, Brasil, **telefone:** (19) 3521-8970, **fone-fax:** (19) 3521-8814, **e-mail** ciped@fcm.unicamp.br.

Em caso de denúncias e/ou reclamações referentes aos aspectos éticos da pesquisa, entre em contato com os Comitês de Ética em Pesquisa (CEP): Unicamp Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/n.º, 1º andar, Canela – Salvador–Bahia; telefone (71) 3283- 8043; cep.hupes@gmail.com.

#### AUTORIZAÇÃO PARA INFORMAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS

DESEJO ser informado de alterações genéticas ( )

NÃO DESEJO ser informado de alterações genéticas ( )

#### AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

( ) concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO que as amostras de sejam armazenadas, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

( ) concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO que as amostras de sangue sejam armazenadas, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional. As amostras de sangue serão armazenadas no laboratório de Fibrose Cística no CIPED- Unicamp.

**Consentimento livre e esclarecido:** Aceito participar

Nome do (a) participante: \_\_\_\_\_ portador do RG \_\_\_\_\_ telefone

\_\_\_\_\_ residente na rua \_\_\_\_\_ bairro

\_\_\_\_\_ cidade \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

Email \_\_\_\_\_

Parentesco do responsável legal: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do responsável legal do (a) participante

#### Responsabilidade do Pesquisador

Asseguo ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguo, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

\_\_\_\_\_  
Nome, assinatura e RG do pesquisador - data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

#### Pesquisadores Responsáveis:

Dra Helga Kaiser Sanches De Maria ou Dra. Maria de Fátima Servidoni

Fone: 19 3521-8983

Profa. Dra. Mônica Corso Pereira

Fone: 19 3521-7776

Profa. Dra. Carmem Silva Bertuzzo

Fone: 19 3521-8994

Profa. Dra Maria Angélica Santana

Fone: 71 3117-1610

Prof. Dra Edna Lucia Santos de Souza

Fone: 71 3283-0000

## ANEXO 3: TCLE – Paciente menor

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Projeto de Pesquisa

***AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA CFTR ATRAVÉS DE ESTUDOS DE ELETROFISIOLOGIA EM BIÓPSIAS RETAIS E DA ESTIMULAÇÃO  $\beta$ -ADRENERGICA DAS GLÂNDULAS SUDORÍPARAS EM PACIENTES COM DOENÇAS RELACIONADAS À CFTR (CFTR-RD)***

**Paciente menor**

Seu (sua) filho (a) está sendo convidado (a) a participar de um estudo que poderá ajudar no diagnóstico do problema de saúde que ele (a) apresenta e que ainda não foi bem esclarecido. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tem por objetivo assegurar seus direitos como participante, feito em duas vias, uma delas ficará com você e a outra com o pesquisador.

**Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas.** Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las durante a leitura. Se você não quiser que seu filho (a) participe ou desejar retirar sua autorização a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Este é um projeto de pesquisa para estudar o funcionamento das glândulas sudoríparas (de suor) de pessoas seguidas no Hospital de Clínicas da Unicamp com problemas pulmonares (bronquiectasia) ou com alteração nos órgãos genitais masculinos que causa falta de produção de espermatozoides (azospermia) ou com Fibrose Cística, doença que produz secreções espessas, causando problemas respiratórios e mal funcionamento do pâncreas e ainda outras doenças parecidas com a Fibrose Cística, que são chamadas de FC-RD. Essas doenças têm alteração nas glândulas de suor com a produção de um suor mais salgado que nas pessoas em geral. A função dessas glândulas será avaliada através da coleta do suor realizada por um aparelho chamado Evaporímetro em um braço, enquanto que no outro braço, será realizado o Teste do Suor (TS). O aparelho será colocado em contato com a pele, não oferecendo risco de queimadura, choque ou dor, sendo que o teste todo terá duração de 60 minutos (1 hora). Para a estimulação do suor serão feitas, em momentos diferentes, 4 injeções de medicamentos. No outro braço faremos o TS através de um aparelho que aplica uma corrente elétrica baixa na pele para a estimular a produção do suor durante 10 minutos. O risco do TS é de provocar coceira e irritação local. O risco de injeções, além da dor pela punção, é de provocar vermelhidão e coceira no local. Todos esses riscos são reversíveis (desaparecem) e não devem durar mais de 15 minutos.

Informamos que não haverá nenhum benefício financeiro para que esses procedimentos sejam realizados. A única vantagem que o (a) paciente terá é que ele (a) ou seus responsáveis terão conhecimento dos resultados dos exames que serão entregues pelo médico do ambulatório em que ele (a) faz seguimento, sendo por ele comunicado caso seja observada alguma alteração. Qualquer dúvida poderá contatar os pesquisadores no **Centro de Investigação em Pediatria – CIPED**, onde será realizado o teste, **endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP 13083-887 – Campinas, SP, Brasil **Telefone:** (19) 3521-8970 **Fone-fax:** (19) 3521-8814 **e-mail:** [ciped@fcm.unicamp.br](mailto:ciped@fcm.unicamp.br). Todos os resultados ficarão em absoluto sigilo, estando somente disponíveis para pesquisa.

Em caso de publicação científica, nenhum nome de paciente será divulgado. Os pacientes que apresentarem o teste do evaporímetro alterado poderão ser convidados para realizar outros exames, biópsia retal e coleta de sangue para estudo genético. Estes exames são também importantes para esclarecerem o diagnóstico. O convite será apresentado por meio de novo termo de consentimento com novos esclarecimentos.

Em caso de denúncias e/ou reclamações referentes aos aspectos éticos da pesquisa, entre em contato com os Comitês de Ética em Pesquisa (CEP): Unicamp Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br), Hospital Universitário Prof. Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/n.º, 1º andar, Canela – Salvador– Bahia; telefone (71) 3283- 8043; [cep.hupes@gmail.com](mailto:cep.hupes@gmail.com).

**Consentimento livre e esclarecido:** Aceito participar

Nome do (a) participante: \_\_\_\_\_ portador do RG \_\_\_\_\_ telefone  
\_\_\_\_\_ residente na rua \_\_\_\_\_ bairro  
\_\_\_\_\_ cidade \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

Email \_\_\_\_\_

Parentesco do responsável legal: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do responsável legal do (a) participante

**Responsabilidade do Pesquisador:**

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

\_\_\_\_\_  
Nome, assinatura e RG do pesquisador - data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## Pesquisadores Responsáveis:

Dra Helga Kaiser Sanches De Maria ou Dra. Maria de Fátima Servidoni

Fone: 19 3521-8983

Profa. Dra. Mônica Corso Pereira

Fone: 19 3521-7776

Profa. Dra. Carmem Silva Bertuzzo

Fone: 19 3521-8994

Profa. Dra Maria Angélica Santana

Fone: 71 3117-1610

Prof. Dra Edna Lucia Santos de Souza

Fone: 71 3283-0000

## ANEXO 4: TCLE – Paciente maior

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Projeto de Pesquisa

***AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA CFTR ATRAVÉS DE ESTUDOS DE ELETROFISIOLOGIA EM BIÓPSIAS RETAIS E DA ESTIMULAÇÃO  $\beta$ -ADRENERGICA DAS GLÂNDULAS SUDORÍPARAS EM PACIENTES COM DOENÇAS RELACIONADAS À CFTR (CFTR-RD)***

**Paciente maior**

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo que poderá ajudar no diagnóstico do problema de saúde que você apresenta e que ainda não foi bem esclarecido. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tem por objetivo assegurar seus direitos como participante, feito em duas vias, uma delas ficará com você e a outra com o pesquisador.

**Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas.** Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las durante a leitura. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Este é um projeto de pesquisa para estudar o funcionamento das glândulas sudoríparas (de suor) de pessoas seguidas no Hospital de Clínicas da Unicamp com: problemas pulmonares (bronquiectasia) ou com alteração nos órgãos genitais masculinos que causa falta de produção de espermatozóides (azospermia) ou com Fibrose Cística, doença que produz secreções espessas, causando problemas respiratórios e mal funcionamento do pâncreas e ainda outras doenças parecidas com a Fibrose Cística, que são chamadas de FC-RD. Essas doenças têm alteração nas glândulas de suor com a produção de um suor mais salgado que nas pessoas em geral. A função dessas glândulas será avaliada através da coleta do suor realizada por um aparelho chamado Evaporímetro em um braço, enquanto que no outro braço, será realizado o Teste do Suor (TS). O aparelho será colocado em contato com a pele, não oferecendo risco de queimadura, choque ou dor, sendo que o teste todo terá duração de 60 minutos (1 hora). Para a estimulação do suor serão feitas, em momentos diferentes, 4 injeções de medicamentos. No outro braço faremos o TS através de um aparelho que aplica uma corrente elétrica baixa na pele para a estimulação da sudorese durante 10 minutos. O risco do TS é de provocar coceira e irritação local. O risco das injeções, além da dor pela punção, é de provocar vermelhidão e coceira no local. Todos esses riscos são reversíveis (desaparecem) e não devem durar mais de 15 minutos.

Informamos que não haverá nenhum benefício financeiro para que esses procedimentos sejam realizados. A única vantagem que o paciente terá é saber os resultados dos exames que lhe serão entregues pelo médico do ambulatório em que faz seguimento, sendo por ele comunicado caso seja observada alguma alteração. Qualquer dúvida poderá contatar os pesquisadores no. **Centro de Investigação em Pediatria – CIPED, endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP 13083-887 – Campinas, SP, Brasil. **Telefone:** (19) 3521-8970. **Fone-fax:** (19) 3521-8814, **e-mail:** ciped@fcm.unicamp.br. Todos os resultados ficarão em absoluto sigilo, estando somente disponíveis para pesquisa. Em caso de publicação científica, nenhum nome de paciente será divulgado.

Os pacientes que apresentarem o teste do evaporímetro alterado poderão ser convidados para realizar outros exames, biópsia retal e coleta de sangue para estudo genético. Estes exames são também importantes para esclarecerem o diagnóstico. O convite será apresentado por meio de novo termo de consentimento com novos esclarecimentos.

Em caso de denúncias e/ou reclamações referentes aos aspectos éticos da pesquisa, entre em contato com os Comitês de Ética em Pesquisa (CEP): Unicamp Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/n.º, 1º andar, Canela – Salvador– Bahia; telefone (71) 3283- 8043; [cep.hupes@gmail.com.br](mailto:cep.hupes@gmail.com.br)



**Consentimento livre e esclarecido: Aceito participar**

Nome do (a) participante: \_\_\_\_\_ portador do RG \_\_\_\_\_ telefone  
\_\_\_\_\_ residente na rua \_\_\_\_\_ bairro  
\_\_\_\_\_ cidade \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

Email \_\_\_\_\_

Parentesco do responsável legal: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do responsável legal do (a) participante

**Responsabilidade do Pesquisador:**

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

\_\_\_\_\_  
Nome, assinatura e RG do pesquisador - data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Pesquisadores Responsáveis:**

Dra Helga Kaiser Sanches De Maria ou Dra. Maria de Fátima Servidoni

Profa. Dra. Mônica Corso Pereira

Profa. Dra. Carmem Silva Bertuzzo

Profa. Dra Maria Angélica Santana

Prof. Dra Edna Lucia Santos de Souza

Fone: 19 3521-8983

Fone: 19 3521-7776

Fone: 19 3521-8994

Fone: 71 3117-1610

Fone: 71 3283-0000

## ANEXO 5: Parecer Consubstanciado - CEP (Unicamp)

**COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DA UNICAMP -  
CAMPUS CAMPINAS**



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA CFTR ATRAVÉS DE ESTUDOS DE ELETROFISIOLOGIA EM BIÓPSIAS RETAIS E DA ESTIMULAÇÃO  $\beta$ -ADRENERGICA DAS GLANDULAS SUDORÍPARAS EM PACIENTES COM DOENÇAS RELACIONADAS À CFTR (CFTR - RD)

**Pesquisador:** Helga Kaiser Sanches De Maria

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 37360514.9.0000.5404

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da UNICAMP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 894.705

**Data da Relatoria:** 10/12/2014

**Apresentação do Projeto:**

Resumo: O gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) foi identificado como o gene que origina a doença Fibrose Cística (FC) na ocorrência de mutações disfuncionais. Está também implicado numa nova entidade clínica denominada "Doenças Relacionadas à CFTR" (CFTR-RD, CFTRRelated Disorders). A proteína CFTR funciona como um canal regulador do transporte de água e eletrólitos, sendo a sua principal função o transporte de  $Cl^-$  dependente de AMPcíclico. A FC é uma doença autossômica recessiva letal, com manifestações clínicas que comprometem o sistema o digestivo, reprodutor e, principalmente, o respiratório. Foram descritas cerca de 2000 alterações no gene CFTR e a mutação F508del é a mais frequente (aproximadamente 90% dos pacientes FC). No Brasil, porém, esta mutação é menos frequente (cerca de 65%), ocorrendo mutações raras e formas atípicas da doença, algumas designadas atualmente como CFTR-RD. Podemos dizer que a classificação das doenças que expressam o defeito no gene CFTR é complexa. A FC clássica caracteriza-se por manifestações multisistêmicas, apresentando insuficiência pancreática exócrina, ausência congênita bilateral das vias deferentes (CBAVD), em homens, e insuficiência respiratória. Os pacientes apresentam também um teste do suor alterado (atual padrão-ouro no diagnóstico da FC). A FC não clássica pode apresentar

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 894.705

sintomas mais tardios, suficiência pancreática, exame do suor normal, borderline ou alterado. Nas CFTRRD, os indivíduos apresentam uma forma leve da doença, comprometendo um órgão apenas e testes do suor normais ou borderline. Os casos que se apresentam com CBAVD, bronquiectasias disseminadas, pancreatite crônica, acompanhando a disfunção da proteína CFTR sem preencher os critérios diagnósticos para FC, podem ser definidos como CFTRRD. Diante do conceito atual de que existe um amplo espectro de doenças associadas às mutações do gene CFTR, torna-se necessário ampliar a realização de testes diagnósticos, uma vez que o teste do suor clássico apresenta limitações na identificação das doenças com valores de sódio e cloreto borderline ou normais. Nestes casos, o diagnóstico da FC e CFTR-RD só pode ser feito por uma avaliação coordenada de dados clínicos, genéticos, funcionais e bioquímicos. Se forem encontradas mutações causadoras de FC ou associadas a CFTR-RD nos dois alelos, um diagnóstico mais confiável poderá ser alcançado. No entanto, devido à variabilidade fenotípica associada a alguns genótipos, a interpretação dos dados funcionais apresenta-se como um ponto crítico no desfecho do diagnóstico. A presente proposta é justificada com a necessidade de acurar esse diagnóstico. Assim, estudaremos a função da atividade da proteína CFTR na glândula sudorípara in vivo com o evaporímetro, teste do suor (TS) e em biópsias retais (BR) ex vivo, em indivíduos com essas manifestações atípicas, porém sem diagnóstico definido: pacientes com bronquiectasia idiopática ou CBAVD. A função de CFTR medida através da biópsia retal demonstra associações evidentes entre as manifestações clínicas e a função de CFTR residual, como demonstrado nos estudos realizados em colaboração com a Prof. Marisa Sousa (Portugal), Prof. Karl Kunzelmann (Alemanha) e Prof. Margarida Amaral (Portugal). Isto traz-nos a importância dos estudos funcionais da CFTR para um correto diagnóstico e prognóstico da FC e das CFTRRD; e justifica, por outro lado, esta proposta. O evaporímetro é um aparelho sensível, que coleta o suor após estimulação seletiva da via - adrenérgica. Permite diferenciar os indivíduos saudáveis (sem nenhuma mutação CFTR) daqueles com FC (2 alelos mutantes) e portadores (1 alelo mutante). Este método pode ser um instrumento importante, para identificar estes 3 grupos de indivíduos. A Unicamp é o primeiro e ainda o único centro no Brasil (e um dos poucos no mundo - existem apenas três locais nos EUA e Canadá) a dispor de ambas as técnicas: medição da função CFTR na biópsia retal e no evaporímetro, delineando desta forma o caráter inovador da presente proposta. A correta implementação e validação destas poderosas ferramentas de diagnóstico para FC e, principalmente, para as CFTR-RD, são o objetivo principal de diagnóstico nesta proposta. Deste modo, o objetivo geral deste trabalho é a avaliação da função da proteína CFTR em pacientes com suspeita de CFTR-RD, nomeadamente fibrose cística atípica, bronquiectasias idiopáticas, CBAVD,

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 894.705

pancreatite idiopática para confirmação/exclusão de diagnóstico através de estudos de eletrofisiologia da estimulação -adrenérgica nas glândulas sudoríparas e naqueles em que for necessário biópsia retal. Com o presente estudo será possível validar este novo método diagnóstico, resultante de duas importantes ferramentas : o estudo da função da CFTR na glândula sudorípara após estimulação -adrenérgica e na biópsia retal após estimulação com agonistas do AMP cíclico. Com esta proposta, pretendemos criar um novo fluxograma de investigação e um protocolo para a diferenciação de níveis moderados a elevados de função CFTR com o exame do evaporímetro através de uma crosstalk com os resultados da avaliação da atividade da CFTR nas biópsias retais, permitindo a realização de um exame flexível e com possibilidade de aplicação desde as crianças a indivíduos adultos. Com a análise posterior das mutações no gene CFTR nestes pacientes CFTR-RD, esta proposta permitir-nos-á recolher informações valiosíssimas sobre o comportamento da CFTR nos pacientes CFTRRD – um grupo ainda pouco estudado. Estas informações assumem importância clínica no prognóstico e tratamento destes indivíduos e trazem novos achados à comunidade de pesquisa no âmbito da FC e das CFTR-RD.

### **Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Avaliação da função da proteína CFTR em pacientes com suspeita de doenças relacionadas à CFTR (CFTR-RD), nomeadamente fibrose cística atípica, bronquiectasias idiopáticas, CBAVD e pancreatite idiopática, para confirmação / exclusão de diagnóstico através de estudos de eletrofisiologia: estimulação adrenérgica das glândulas sudoríparas e eletrofisiologia em biópsias retais. **Objetivo Secundário:** Avaliar como os métodos de eletrofisiologia da função da CFTR-CI auxiliam no diagnóstico de Fibrose Cística no grupo de pacientes avaliados e como estes testes se correlacionam com o fenótipo e TS.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** Pela estimulação da sudorese: 1) dor durante a injeção das drogas intradérmicas. 2) reação local discreta com hiperemia e prurido. Pela biópsia retal: dor local e sangramento discreto.

**Benefícios:** Não existe benefício direto ao paciente exceto através da possibilidade de elucidação diagnóstica de sua enfermidade por meios de diagnósticos mais acurados.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Esta Versão é resposta às pendências levantadas nos 3 pareceres anteriores.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta TCLE para a pesquisa e para a biópsia retal, com versões para voluntários maiores e

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 894.705

menores de idade.

O TCLE da pesquisa apresentava as seguintes inadequações: 1-

Não explica porque o voluntário foi escolhido.

RESPOSTA: texto modificado

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

2- Usa termos técnicos de difícil entendimento da população leiga

RESPOSTA: texto modificado

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

3- Descreve os possíveis riscos da pesquisa como um projeto de pesquisa e não como um texto para um voluntário leigo.

RESPOSTA: texto modificado

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

4- Informa que uma CÓPIA do documento ficará com o voluntário, mas deve ser uma VIA. RESPOSTA: substituído cópia por via.

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

5- Apresenta o mesmo documento para voluntários maiores e menores de idade. RESPOSTA: apresentado termos diferentes para maiores e menores.

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

6- Apresenta espaço para o "aceite do menor", mas o documento para os voluntários menores não é o TCLE, mas sim o Termo de Assentimento, que deve ser redigido de modo que o menor o compreenda. Este documento é desejável, mas não é obrigatório.

RESPOSTA: item retirado do termo.

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

7- Não apresenta endereços para contato com a pesquisadora e com o CEP. RESPOSTA: acrescentado endereço e e-mail do CIPED.

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

8- Não tem espaço para definição sobre o grau de parentesco do responsável. RESPOSTA: espaço acrescentado

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

9- Não informa que o voluntário tem direito aos resultados dos exames e nem como poderá obtê-lo. RESPOSTA: Informa que o exame poderá ser obtido no ambulatório de seguimento.

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DA UNICAMP -  
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 894.705

10- No TCLE da biópsia, o tempo necessário para a realização do exame não foi preenchido (rever o parágrafo).

RESPOSTA: informa o tempo

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

11- A descrição do procedimento de biópsia está complexa. RESPOSTA: texto modificado

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

12- Alguns parágrafos dos TCLE têm muita informação o que dificulta o entendimento. RESPOSTA: texto modificado

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

13- Solicita informação quanto ao desejo de saber sobre alterações genéticas e DNA, mas estas informações não foram fornecidas em nenhum outro momento, nem o seu significado.

Quanto ao TCLE relativo à biópsia retal, apresenta as seguintes inadequações: RESPOSTA: informação fornecida.

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

14- Parte do texto está escrito como sendo o pesquisador (ex. "ao verificarmos os resultados..." e parte como o voluntário ("fui informado"), e isto vai se alternando no decorrer do texto. Padronizar o texto.

RESPOSTA: texto modificado

PENDÊNCIA RESOLVIDA

15- Informa sobre a guarda de material, mas não explica o que é o material genético RESPOSTA: texto modificado

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

16- Apresenta parágrafo dizendo que foi informado que pode autorizar a guarda de material, quando na realidade, deveria informar que, caso o paciente autorize, o material poderá ser utilizado em outro projeto que seja aprovado pelo CEP, devendo haver as opções para guarda de material e, se for afirmativo, se há necessidade de nova autorização do voluntário ou não (ex. não aceita armazenamento, aceita armazenamento com novo consentimento ou aceita armazenamento sem necessidade de novo consentimento)

RESPOSTA: texto modificado

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

17- Apresenta espaço para autorização de armazenamento do DNA familiar, mas não há descrição deste exame no TCLE. RESPOSTA: texto modificado

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DA UNICAMP -  
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 894.705

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto considerado aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

- O sujeito de pesquisa deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DA UNICAMP -  
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 894.705

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

CAMPINAS, 02 de Dezembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Renata Maria dos Santos**  
**Celeghini**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br