



ALINE CRISTINA GONÇALVES

**USO DA SALIVA PARA O DIAGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA E
AVALIAÇÃO DA SAÚDE BUCAL E DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DA
SALIVA DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA ATENDIDOS NO HOSPITAL
DE CLÍNICAS DA UNICAMP**

Campinas

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

ALINE CRISTINA GONÇALVES

**USO DA SALIVA PARA O DIAGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA E AVALIAÇÃO DA
SAÚDE BUCAL E DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DA SALIVA DE PACIENTES
COM FIBROSE CÍSTICA ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNICAMP**

Dissertação de mestrado apresentado à Pós-Graduação de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Emílio Levy

Co-Orientador: Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Aline Cristina Gonçalves e orientada pelo orientador Prof. Dr. Carlos Emílio Levy

CAMPINAS

2013

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

G586u

Gonçalves, Aline Cristina, 1980-

Uso da saliva para o diagnóstico da fibrose cística e avaliação da saúde bucal e de parâmetros bioquímicos da saliva de pacientes com fibrose cística atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp / Aline Cristina Gonçalves. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Carlos Emílio Levy.

Coorientador : José Dirceu Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fibrose cística. 2. Saliva. 3. Eletrodos íon-seletivo. 4. Cloro. 5. Saúde bucal. I. Levy, Carlos Emílio, 1949-. II. Ribeiro, José Dirceu, 1952-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Use of saliva for diagnostic of cystic fibrosis and evaluation of oral health and biochemical parameters of saliva of patients with cystic fibrosis attended in the Hospital de Clinicas Unicamp

Palavras-chave em inglês:

Cystic fibrosis

Saliva

Ion-selective electrodes

Chlorine

Oral health

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Carlos Emílio Levy [Orientador]

Elsa Masae Mamizuka

Elizete Aparecida Lomazi

Data da defesa: 29-08-2013

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

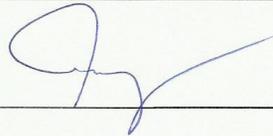
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ALINE CRISTINA GONÇALVES

Orientador PROF. DR. CARLOS EMILIO LEVY

MEMBROS:

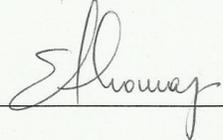
1. PROF. DR. CARLOS EMILIO LEVY



2. PROFA. DRA. ELSA MASAE MAMIZUKA



3. PROFA. DRA. ELIZETE APARECIDA LOMAZI



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

Data: vinte e nove de agosto de dois mil e treze

ABSTRACT

Background: Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disease most common among Caucasians. Characterized by a defect in ion transport across the cell membrane in airway epithelial cells, pancreas, salivary glands, sweat glands, intestine, and reproductive tract. Mucous secretions become thick and viscous, causing obstruction at the level of ducts and glandular tubules. **Objective:** To investigate the biochemical parameters of saliva, gingival health and dental patients with CF and analyze its relationship with disease severity and medications. **Patients and methods:** Prospective study of CF patients in attended of Hospital de Clínicas da Unicamp, and healthy subjects. These patients were compared biochemical parameters of saliva with healthy subjects, the technique of ion-selective electrode, Radiometer blood gas analyzer ABL835®. We conducted a descriptive study of some indicators of oral health, salivary microbiota and sputum of CF patients and analyzed with the severity of the disease by the Shwachman score. **Results:** The chloride and sodium ions in saliva were significantly higher in patients with cystic fibrosis than in controls. With application of the ROC curve determined respectively for sodium and chlorine Cut-off 13.5 mmol/L and 20 mmol/L; Sensitivity 73.4% and 68.1% and Specificity 70.6% and 72.9%. With respect to gingival index, we observed a direct relationship with the index plaque, however, there was no correlation between plaque index and gingival index with Shwachman, chronic use of antibiotics and DNase. **Conclusions:** We found a low prevalence of caries in children with CF and significant amount of enamel defects, accumulation of dental calculus, no correlation between plaque index (PI) and gingival inflammation index (GI) and score Shwachman, and between PI and GI and use of dornase alpha and chronic use of antimicrobials. There was no correlation between the concentrations of Cl^- and Na^+ in saliva with Shwachman clinical score. In the CF group levels of sodium, chloride, potassium and pH were found increased and the volume of saliva was lower than that observed in the control group. Further studies are needed to clarify the usefulness of the assessment of biochemical parameters in saliva for diagnosis of CF. In assessing the salivary microflora with the material of the respiratory tract, saliva does not show good correlation with the presence of chronic lung pathogens and should not be used for this purpose.

RESUMO

Introdução: Fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva mais comum entre caucasianos. Caracteriza-se pelo defeito no transporte iônico através da membrana celular nas células epiteliais das vias aéreas, pâncreas, glândulas salivares, sudoríparas, intestino e aparelho reprodutor. As secreções mucosas ficam espessas e viscosas, causando obstrução ao nível de ductos e canalículos glandulares. **Objetivo:** Verificar os parâmetros bioquímicos da saliva, a saúde gengival e dental de pacientes com FC e analisar sua relação com a gravidade da doença e medicações. **Casuística e método:** Estudo prospectivo de pacientes atendidos no ambulatório de FC do HC Unicamp e indivíduos saudáveis. Destes pacientes foram comparados os parâmetros bioquímicos da saliva com os de indivíduos saudáveis, pela técnica de eletrodo íon seletivo, aparelho de gasometria ABL835®. Foi realizado um estudo descritivo de alguns indicadores da saúde bucal, microbiota salivar e do escarro de pacientes com FC e analisados com a gravidade da doença pelo escore de Shwachman. **Resultados:** Os íons cloro e sódio na saliva foram estatisticamente maiores, nos pacientes com fibrose cística que nos controles. Com aplicação da curva ROC determinamos, respectivamente para o sódio e cloro Cut-off de 13,5 mmol/L e 20 mmol/L; Sensibilidade:73,4% e 68,1% e Especificidade:70,6% e 72,9%. Com relação ao índice gengival (IG), observamos uma relação direta com o índice de placa (IP), contudo, não houve correlação entre o índice de placa ou índice gengival com o escore de Shwachman, uso crônico de antimicrobianos e de dornase alfa. **Conclusões:** Observou-se baixa prevalência de cárie nas crianças com FC e quantidade significativa de defeitos de esmalte, acúmulo de cálculo dental ou tártaro, que não há correlação entre IP e IG e escore de Shwachman, e entre IP e IG e uso de Dornase Alfa e uso crônico de antimicrobianos. Não

houve correlação entre as concentrações de Cl^- e Na^+ na saliva com o escore clínico de Shwachman. No grupo FC os níveis de sódio, cloro, potássio e o pH encontraram-se aumentados e o volume de saliva foi menor que o observado no grupo controle. Novos estudos serão necessários para esclarecer a real utilidade da avaliação dos parâmetros bioquímicos na saliva para diagnóstico da FC. Na avaliação da microbiota da saliva com o material do trato respiratório, a saliva não apresenta boa relação com a presença de patógenos pulmonares crônicos e não deve ser utilizada para este fim.

SUMÁRIO

1- Introdução.....	23
2- Justificativa.....	45
3- Objetivos	47
4- Casuística e Métodos.....	49
5- Resultados.....	61
6- Discussão.....	75
7- Conclusões.....	85
8- Referências	89
8- Anexos	103
9- Apêndices	111
Publicações em Periódicos	114
Publicações de abstracts/resumos em anais de congressos	136

*Dedico este trabalho à minha família pelo apoio, incentivo e confiança,
À minha amada avó Júlia Meira de Souza (in memoriam) por ter me ensinado a confiar na
minha capacidade e a não desistir dos meus ideais.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente em minha vida, me guiando e me fortalecendo nos momentos difíceis. Agradeço também pelas pessoas colocadas em meu caminho, pois com cada uma delas aprendi algo.

Aos meus amados pais Maria Elena e Luiz Carlos pelos ensinamentos, amor, carinho e dedicação. Agradeço especialmente à minha mãe pelo apoio e incentivo constantes;

Aos meus amados irmãos Luís Eduardo e Luís Guilherme pela compreensão e apoio;

Ao meu querido tio Antonio Carlos de Souza pelo apoio e incentivo constantes;

À minha cunhada Milena pelo apoio e incentivo;

Aos meus queridos amigos Flávia, Andrezza, Aldari, Anderson e Mara por compreenderem os momentos que não estive presente, pelas vezes que dormi assistindo filme ou na mesa dos barzinhos... Agradeço principalmente as minhas amigas irmãs, Flávia e Andrezza pelo apoio, incentivo e por estarem presente em todos os momentos da minha vida, mesmo quando distantes;

Aos amigos que ganhei durante o mestrado Kátia A. Aguiar, Mayara Magri, Fernando Marson e Taís Hortêncio pelos momentos de descontração, desabafos e pelas trocas de conhecimento;

À minha querida colega Carla Gomez pela ajuda na coleta de dados para que o Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro pudesse fazer o escore clínico dos pacientes;

Aos meus colegas Renan, Loredana e Élio;

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Emílio Levy, por me orientar e compartilhar seu conhecimento;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro, pelas contribuições, disposição, incentivo, apoio e reconhecimento dos meus esforços;

À minha co-orientadora Dra. Regina M. Holanda Mendonça pela humildade em passar parte de seus conhecimentos, pelo apoio, incentivo, paciência e amizade;

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro pelas contribuições, disposição e ensinamentos;

À Profa. Dra. Ilma Ap. Paschoal pela generosidade de nos ceder sua ideia de usar o equipamento de gasometria para quantificar os íons da saliva e por compartilhar seus conhecimentos,

À Maria Ângela Ribeiro por sua contribuição e por sempre estar disposta a contribuir com esse projeto;

À Comissão julgadora do exame de qualificação, Prof. Dr. Aníbal Eugenio Vercesi e Profa. Dra. Elizete Ap. Lomazi pelas importantes contribuições;

À Comissão Julgadora da Defesa da Dissertação, Prof. Dra. Elizete Ap. Lomazi e a Prof. Dra. Elsa Masae Mamizuka pelas importantes e generosas contribuições;

À Fibrocis por me passar a relação dos pacientes atendidos no ambulatório;

Aos pacientes e seus responsáveis, por aceitarem participar desse estudo;

À todos profissionais do Serviço de Odontologia do Hospital de Clínicas da Unicamp pela acolhida;

À Denise Bonicio, técnica do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica- HC - Unicamp, pela paciência em me ensinar e auxiliar para a realização desse projeto;

À Eliane Cristina do Laboratório de Gasometria da Divisão de Patologia Clínica – HC - Unicamp, pela compreensão e colaboração no processamento das amostras;

À Prof. Dra. Silvia Mazon e Profa.Dra Maria Ângela Antonio e por me darem a oportunidade de fazer o estágio docente pela disciplina MD758 e pelos ensinamentos que me passaram;

Ao Helymar da Costa Machado do setor de estatística da FCM, pela contribuição e paciência em transmitir seu conhecimento;

Ao Walmir Antônio Corradini, secretário da PGSCA, pela colaboração;

Ao setor de audiovisual da FCM, pela confecção dos pôsteres para os congressos;

À todos os funcionários da FCM e do HC da Unicamp que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	<i>Associação Dentária Americana</i>
AS	Ágar Sangue
ACHOC	Ágar Chocolate
BCSA	<i>Selective Agar Burkholderia Cepacia</i>
BHI	Brain heart infusion
CBC	Complexo <i>Burkholderia Cepacia</i>
CEO	Dentes cariados, esfoliados e obturados
CPO-D	Dentes cariados, perdidos e obturados
Cl ⁻	Cloro
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
CIPED	Centro de Investigação em Pediatria
CO ₂	Dióxido de carbono
Cut-off	Determina o limite para dizer se um exame é positivo ou negativo
DDE	Defeitos de desenvolvimento do esmalte
DNA	Deoxyribonucleic acid
ENAc	Canal de sódio
FC	Fibrose Cística
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GFC	Grupo Fibrose Cística
GC	Grupo controle
HC	Hospital de Clínicas
HCO ₃	Bicarbonato
IG	Índice gengival
IgA	Imunoglobulina A
Ig G	Imunoglobulina G
IP	Índice de placa
K ⁺	Potássio

MAN	Ágar Manitol
MC	Ágar McConkey
MEP	Exopolissacarídeo mucoide
mEq/ L	Mili equivalente por litro
mmol/L	Mili mol por litro
MgCl	Cloreto de magnésio
Min.	Minuto
Na ⁺	Sódio
NMT	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
RNAm	Ácido ribonucleico (RNA) mensageiro
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TS	Teste do Suor
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WHO	World Health Organization

1- INTRODUÇÃO

1.1 Características genéticas da fibrose cística

A fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva, com maior prevalência em indivíduos caucasoides ocorrendo em 1:2.500, afetando cerca de 70.000 indivíduos da população mundial (Barth, 2005; Riordan, 2008). Causada por mutações no gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), a FC acomete 1:10.000 nascidos vivos no Brasil. Essa doença evolui com comprometimento progressivo em vários órgãos e sistemas do organismo sendo incurável até o presente momento (Ribeiro et al., 2009). O gene da fibrose cística é localizado no braço longo do cromossomo 7, no locus q31, composto por aproximadamente 250 Kb de DNA com 27 éxons. Este gene tem a propriedade de codificar um RNAm de 6,5 quilobases, que transcreve uma proteína transmembrana reguladora de transporte iônico, denominada CFTR, composta de 1480 aminoácidos. A CFTR é essencial para o transporte de íons através da membrana celular e sua função está relacionada à regulação do fluxo de cloro, sódio e água (Mishra et al., 2007).

Cerca de mais de 1500 mutações foram descritas na literatura mundial, porém, a mais frequente é a F508del, na qual ocorre uma deleção de três pares de bases, acarretando na perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR (Steven et al., 2005) (Figura 1).

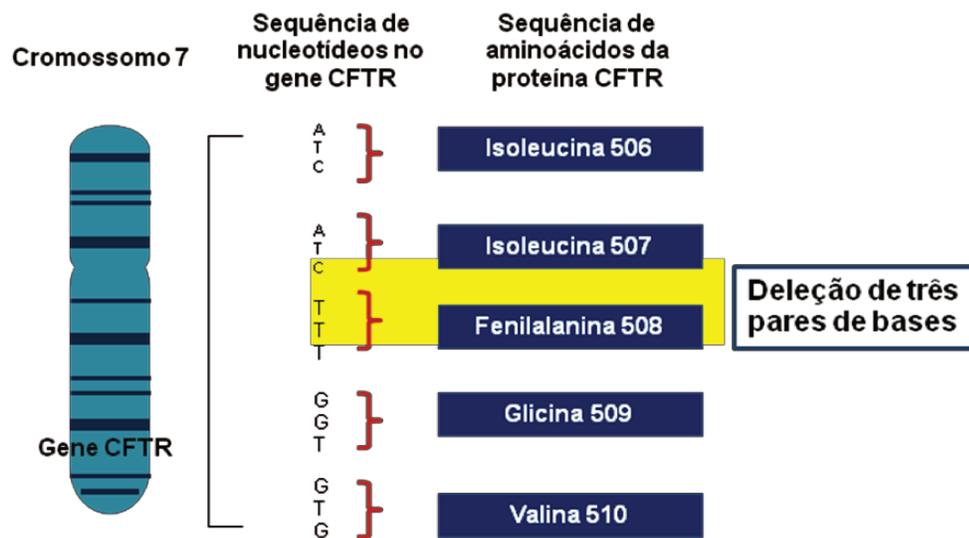


Figura 1. Gene da fibrose cística localizado no braço longo do cromossomo 7. A mutação DELF 508, ocorre quando há uma deleção de três pares de bases, acarretando na perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFR.

Mishra e colaboradores (2005) relataram que mutações diferentes causam diferentes defeitos na produção e função da proteína. Baseados em extensa revisão de literatura, descreveram a classificação das mutações em 6 classes:

- Classe I – defeito na síntese de proteína: Mutações nesta classe incluem os fenótipos de FC mais graves resultando em nenhuma proteína sintetizada.

- Classe II – defeito no processamento da proteína: Estas mutações resultam em uma proteína CFTR que não trafega para a localização celular correta devido ao mau dobramento da proteína.

- Classe III – mutação de regulação defeituosa: Neste caso a proteína é produzida, trafega até a membrana da célula, mas não responde a estimulação da AMPc.

- Classe IV – condução defeituosa: O gene *CFTR* codifica uma proteína que trafega corretamente até a membrana da célula e responde a estímulos, mas gera uma corrente de cloreto reduzida.

- Classe V – quantidade reduzida: Estas mutações produzem uma quantidade reduzida e de baixo nível de proteína funcional que é translocada para a membrana da célula.

- Classe VI – estabilidade reduzida da proteína: Esta classe de mutação foi introduzida recentemente e nela incluem-se mutações que causam o comprometimento da proteína CFTR. As mutações do gene *CFTR* são consideradas severas ou brandas.

Dependendo da maneira como a proteína funcional é afetada o transporte de cloreto não ocorre ou fica diminuído. Geralmente, mutações severas resultam na falha da síntese proteica ou no bloqueio do processo, e mutações brandas causam alteração na condutância ou a síntese da proteína é reduzida (Johnson, 1997).

Em 1948, o pediatra americano Paul di Sant'Agnese observou o que muitos dos lactentes que apresentavam prostração no calor eram portadores de FC. Ao investigar a composição iônica do suor de pacientes portadores de fibrose cística em 1953, di Sant'Agnese forneceu evidências científicas para a sabedoria popular que, desde a Idade Média, atribuía baixa expectativa de vida às crianças nas quais se percebia um suor salgado.

Ele descobriu que o suor dos doentes tinha concentrações mais elevadas de cloreto, sódio e potássio.

Para diminuir a dificuldade de obtenção do suor em quantidade suficiente para dosar a concentração de eletrólitos, Gibson & Cooke (1959), propuseram a técnica de estimulação colinérgica de pequena área da pele com pilocarpina cuja absorção é intensificada pela passagem de corrente elétrica de pequena intensidade no local, processo denominado iontoforese. Atualmente, a análise quantitativa dos níveis de cloro no suor é aceita como o teste discriminatório para o diagnóstico de FC (Mishra et al., 2007).

Quinton (1983) identificou nos ductos sudoríparos o transporte do cloro como defeito básico da FC. No mesmo período, Knowles et al. (1983) e Boucher (1986), observaram que a reabsorção aumentada do sódio era um achado comum no epitélio das vias aéreas de pacientes com FC.

Quando a concentração de cloro no suor é >60 mEq/L, o resultado é considerado positivo para FC. Os níveis considerados normais são até 45 mEq/L, adolescentes e adultos jovens podem ter os valores de Cl^- mais elevados, por esse motivo os resultados entre 45 mEq/L e 60 mEq/L são considerados duvidosos, devendo o exame ser repetido (Green et al., 2006). Algumas doenças (Tabela 1) além da FC também causam alterações nos eletrólitos do suor. Atualmente, são aceitos intervalos de referência universais para cloretos no suor, sendo aplicáveis a todos os pacientes, indiferentemente de sexo ou idade (Mishra et al., 2007). Em função da dificuldade de realização da técnica de iontoforese, tem-se buscado outras possibilidades de diagnóstico, que apresentem maior facilidade de execução. Dentre as possíveis opções, a avaliação dos parâmetros bioquímicos da saliva apresenta-se como uma perspectiva promissora.

Tabela 1. Algumas doenças além da fibrose cística com teste do suor > 60mEq/L.

Reversível	Irreversível
Insuficiência adrenal	Displasia ectodérmica
Anorexia nervosa	Síndrome de Klinefelter
Dermatite atópica	Disfunção autonômica
Doença celíaca	Colestase familiar
Hipoparatiroidismo familiar	Disfunção autonômica
Hipotiroidismo	Síndrome de Mauriac
Desnutrição	Hipogamaglobulinemia
Pseudohipoadosterismo	Mucopolissaridose tipo I
	Doença de armazenamento de glicogênio tipo I (Doença de Von Gierke)

Colher saliva é mais fácil do que colher suor. No entanto, estudos sobre as consequências da fibrose cística na função das glândulas salivares têm produzido resultados muito conflitantes. A iontoforese apresenta inúmeras dificuldades, como baixa quantidade de suor, disponibilidade de equipamento e imobilização da criança. Devido à incapacidade de compreensão por parte da criança, muitas vezes o exame é extremamente desgastante para a criança e a família, e em algumas ocasiões, necessita ser repetido para que se obtenha volume adequado do suor para análise.

Determinadas doenças sistêmicas como a FC, podem comprometer o funcionamento das glândulas salivares e conseqüentemente a produção de saliva, influenciando tanto na quantidade de saliva produzida quanto na qualidade deste fluido, uma

vez que, pode afetar os constituintes químicos e as propriedades físicas do mesmo (Moura et al., 2007). O valor diagnóstico da saliva vem sendo corroborado por uma série de estudos que utilizam esse fluido corporal para analisar substâncias específicas importantes na elucidação diagnóstica de doenças (Schwartz et al., 1995; Lawrence, 2002; López et al., 2003; Yarat et al., 2004; Chiappin et al., 2007).

Vários estudos investigaram a avaliação dos componentes da saliva como recurso para diagnóstico da FC. Além do aumento da visco-elasticidade da saliva na FC, existem vários eletrólitos e proteínas em diferentes concentrações quando comparado com a saliva de indivíduos saudáveis (Mandel, 1990; Aps et al., 2002). Os eletrólitos em maior concentração na saliva são Cl, Na, K e HCO₃. Esses eletrólitos se originam do soro, a partir do qual são transportados para os ácinos e ductos salivares (Aps & Martens, 2005). Muitos desses estudos foram realizados antes de determinar a natureza das mutações que se relacionam com a gravidade da doença (Catalán et al., 2010).

Na fibrose cística, a disfunção da proteína CFTR torna a membrana apical impermeável ao Cl⁻, o que dificulta a sua saída. Como este acompanha o movimento da água, a hidratação da superfície da célula é comprometida. Para manter a neutralidade elétrica, há um fluxo de compensação de sódio para dentro das células, resultando numa forte desidratação da superfície da célula (Quinton, 1983).

Catalán et al. (2010) observaram em ratos, a diminuição ou ausência de CFTR e como resultado os níveis de Na⁺ e Cl⁻ na saliva, eram significativamente elevados. A disfunção da proteína CFTR diminui a permeabilidade da membrana celular para o cloreto, causando dificuldades de transporte e saída destes íons. Consequentemente, a concentração de Cl⁻ na membrana apical das células epiteliais aumenta (Davis, 2006).

Greabu et al. (2009), consideram que a presença de secreções orgânicas alteradas em pacientes com FC estimulou a investigação da utilização da saliva como método diagnóstico paliativo ao teste de suor, sendo de baixo custo e fácil acesso ao sistema público de saúde.

A saliva é composta em mais de 99% de água e menos de 1% de sólidos, principalmente proteínas e eletrólitos. Diariamente é secretado, cerca de 0,5 a 1 litro de saliva pelas glândulas salivares, sendo que 85% a 90% dessa secreção têm origem nas glândulas salivares maiores e o restante, aproximadamente 10%, nas glândulas salivares menores. Aproximadamente 0,3mL/min. de saliva são excretados em repouso e de 2 a 3 mL/min. durante estimulação (Fejerskov & Kidd, 2005).

Esse fluido contribui para várias funções: capacidade tampão, ação antibacteriana, mastigação, deglutição, fala, e lubrificação do epitélio (Fejerskov & Kidd, 2005). Trata-se de um fluido cujo conteúdo pode variar, dependendo se coletada diretamente de uma glândula (parótida, submandibular, sublingual, glândulas salivares menores) ou da saliva total, a qual representa uma mistura das secreções das glândulas salivares acrescidas de substâncias oriundas do fluido crevicular gengival, secreções brônquicas ou nasais, células epiteliais descamadas, restos de alimentos, microorganismos e os produtos de seus metabolismos (Kaufman & Lamster, 2000).

O pH salivar é entre 6 e 7 para facilitar a ação digestiva do ptialina e normalmente apresenta uma maior concentração de potássio e bicarbonato que dos níveis observados no fluido intersticial (Thylstrup 1988; Ross, 1993).

As glândulas salivares são de natureza exócrina e localizam-se próximas à cavidade bucal, com três pares de glândulas maiores (submandibulares, parótidas e sublinguais) (Figura 2) e várias glândulas menores, distribuídas pela mucosa bucal. A secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autônomo, embora vários hormônios possam também modular sua composição (Thylstrup & Fejerskov, 2001; Scully, 2003).

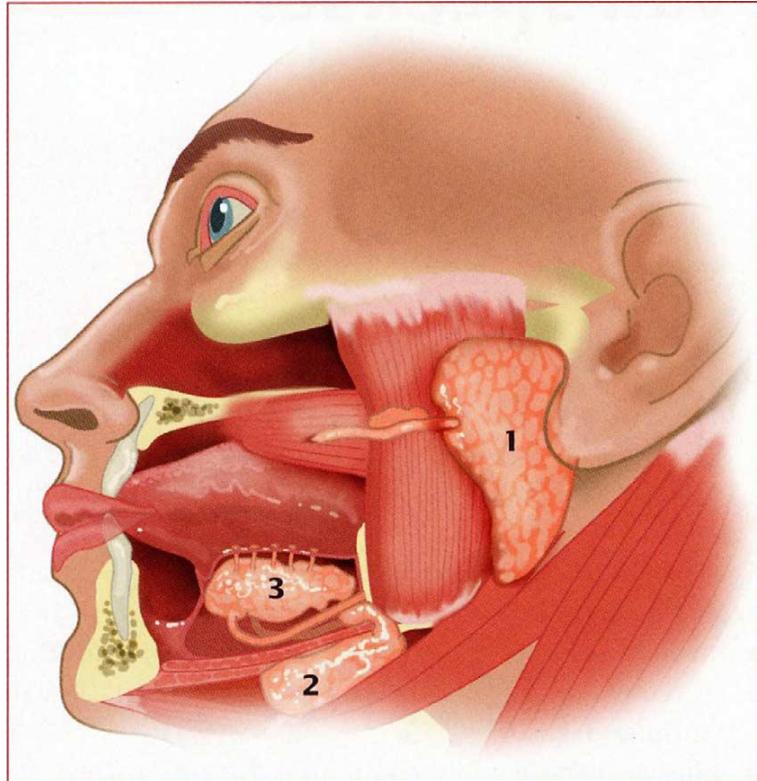


Figura 2. Ilustração das glândulas salivares maiores. **1- Glândula Parótida; 2- Glândula Submandibular; 3- Glândula sublingual.** Fonte: A. Van Nieuw Amerongen, 2004.

Cada glândula maior secreta um produto diferente: a parótida produz secreção puramente serosa, que contém ptialina, também conhecida como a amilase, responsável por 25% do total da saliva em repouso; a submandibular, uma mistura serosa e mucosa, representando 60% da saliva; e a sublingual uma secreção quase puramente mucosa, cerca de 5% da saliva (Thylstrup 1988; Ross, 1993). A saliva que está presente na boca é referida como “saliva total” e, além dos componentes orgânicos e inorgânicos, apresenta células epiteliais descamadas e bactérias (Edgar, 1992).

A taxa de secreção salivar na boca é determinada pela taxa de formação de saliva primária nas células acinares. Sabe-se que fatores fisiológicos influenciam a composição e o fluxo salivar e que a composição final da saliva depende fortemente do fluxo (Edgar, 1992; Thylstrup & Fejerskov, 2001; Fejerskov & Kidd, 2005).

A saliva passa por duas etapas antes de ser secretada: A primeira envolve os ácinos e a segunda, os ductos salivares. Os ácinos produzem uma solução de íons com

concentrações não muito diferentes do líquido extracelular, porém à medida que a secreção primária flui pelos ductos, ocorrem dois importantes processos de transporte ativo que modificam acentuadamente a composição iônica da saliva (Guyton & Hall, 2006).

Nos ácinos das glândulas salivares, a secreção primária tem concentrações iônicas semelhantes às do plasma e líquido intersticial. Ao longo dos ductos, a absorção de íons específicos (Na^+ , Cl^-) e a secreção e/ou movimentação em sentido oposto de K^+ e HCO_3^- , faz com que diminuam os íons cloreto e sódio e aumentem os íons bicarbonato e potássio (Figura 3).

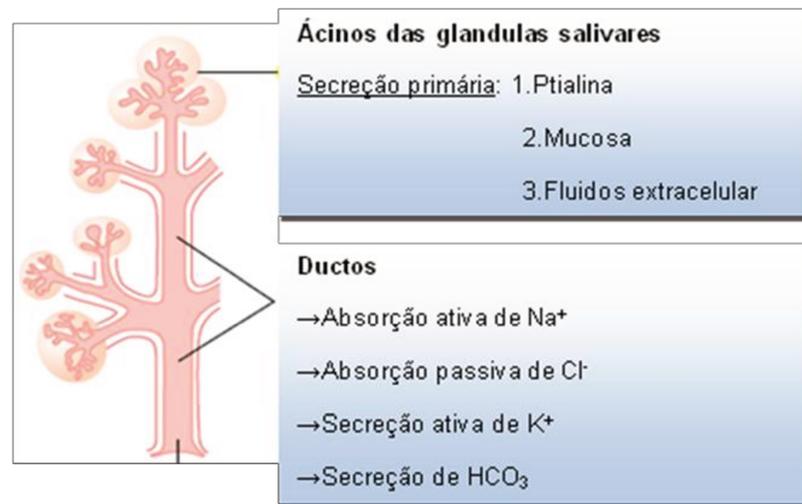


Figura 3. Estrutura das glândulas salivares. Ácino e ducto salivar. Fonte: Guyton, 2009, figura adaptada.

As parótidas não apresentam secreção tônica e só se manifestam quando estimuladas. Durante a salivação máxima, após estímulo, o fluxo de saliva pode aumentar até 20 vezes. Esta secreção acinar primária aumentada flui tão rapidamente pelos ductos que pode impedir a troca iônica adequada, fato que faz as concentrações iônicas subirem até aproximadamente 50% a 70% daquelas encontradas no plasma (Guyton & Hall, 2006).

Nas glândulas sudoríparas, assim como nas glândulas salivares, na região dos ácinos, a secreção primária glandular tem composição iônica muito semelhante àquela do líquido intersticial. Ao passar pelos ductos glandulares, o suor perde íons cloreto e sódio, os quais são absorvidos pelo canal de Cl^- (CFTR) e pelo canal de Na^+ (ENaC). A absorção iônica

sem uma correspondente absorção de água (explicada pela impermeabilidade dos ductos à água) torna o suor normal hipotônico (Catalán et al., 2010).

A membrana apical das células epiteliais apresenta canais, assim, nas células normais o CFTR, quando estimulado pela adenosina monofosfato cíclica (AMPc) ou pelo cálcio (Ca) ionóforo, se abre dando saída ao cloro. Na fibrose cística, o CFTR não responde ao estímulo do AMPc, somente os canais estimulados pelo Ca ionóforo se abrem, determinando uma diminuição relativa da permeabilidade ao íon Cl⁻. A menor saída de cloreto da célula traz como consequência uma maior reabsorção de sódio para manter o equilíbrio cloreto/sódio dentro da célula (Reddy et al., 2006; Catalán et al., 2010). O mecanismo de produção de saliva tem semelhanças com a produção de suor.

A participação do CFTR e do ENaC nos ductos das glândulas salivares foi demonstrada em camundongos homozigotos para a mutação F508del (Catalán et al., 2010), de onde se pode aventar a hipótese que esses canais desempenhem um papel na absorção iônica nos ductos das glândulas salivares, semelhante àquele observado nas glândulas sudoríparas.

Os principais componentes inorgânicos da saliva são: íons hidrogênio, cálcio, magnésio, sódio, potássio, cloretos, fluoretos, complexos iônicos do flúor, fosfatos, tiocianato, bicarbonatos e outros elementos em menores concentrações (Edgar 1992; Fejerskov & Kidd, 2005).

Células serosas, mucosas ou uma combinação denominada meia-lua serosa constituem ambos os grupos de glândulas salivares. As células serosas são ricas em proteína e pobres em carboidrato, produzindo uma secreção de consistência aquosa (fina). As células mucosas são pobres em proteína e ricas em carboidratos, e liberam um produto viscoso chamado mucina (Ross, 1993). A diferença entre a glicoproteína serosa e mucosa está na quantidade de carboidrato associado à proteína (Fejerskov & Kidd, 2005).

Na composição orgânica da saliva destacam-se a presença de proteínas, enzimas, imunoglobulinas, glicoproteínas, glicose (Maringoni et al., 1991; Martins-Gomes et al., 2001; Fejerskov & Kidd, 2005).

A saliva protege a boca e facilita a deglutição do alimento. O epitélio que reveste a boca deve ser mantido constantemente úmido e lubrificado, para evitar ulcerações e infecções. Este ambiente quente e úmido, freqüentemente contendo resíduos de alimentos é um bom ambiente para o crescimento de microorganismos (Davies et al. 2002).

A saliva é o principal fator de defesa da cavidade oral, suas alterações na sua qualidade e quantidade afetam a saúde oral. No Diabetes Melito, as principais alterações encontradas na saliva são hipossalivação e alteração da sua composição, principalmente aquelas relacionadas à elevação dos níveis de glicose, potássio, cálcio, magnésio, proteínas, alfa-amilase, IgA, IgG e maior atividade da peroxidase (Ferreira & Vannuci, 2002; Lopez et al., 2003).

As glândulas salivares na FC estão frequentemente envolvidas com alterações histológicas, dilatação progressiva dos ductos, metaplasia escamosa do epitélio de revestimento e atrofia glandular seguida de fibrose (Schosield & Cotran, 1996).

A FC é caracterizada pelo defeito no transporte iônico através da membrana celular nas células epiteliais das vias aéreas, pâncreas, glândulas salivares, sudoríparas, intestino e aparelho reprodutor, resultando em secreções mucosas muito espessas e viscosas, que causam obstrução ao nível de ductos e canalículos glandulares (Ribeiro et al., 2002; Barth, 2005). As manifestações clínicas resultantes incluem insuficiência pancreática (80% dos casos), azoospermia (mais de 90% dos homens afetados), íleo meconial em recém-nascidos (17%), diabetes mellitus associada à doença pancreática (20% dos adultos), doença obstrutiva do trato biliar (em 15% a 20% dos indivíduos) e infecção pulmonar crônica com excessiva inflamação, levando à deterioração progressiva da função do pulmão (95% dos pacientes) (Zielenski, 2000; Ribeiro et al., 2002; Sólis et al., 2007).

A proteína CFTR forma o canal de Cl^- (CFTR), o que permite que os íons cloreto atravessem a membrana celular em ambas às direções (fato muito importante na produção de muco, enzimas digestivas e suor), de acordo com o gradiente eletroquímico do microambiente, em células epiteliais de vários órgãos (Donaldson & Boucher, 2003; Riordan, 2008).

O defeito na proteína CFTR acarreta em redução de excreção do Cl^- pelas células, aumentando a eletronegatividade intracelular, resultando em aumento do fluxo de Na^+ , com a finalidade de preservar o equilíbrio eletroquímico interno, e da H_2O do líquido de superfície das vias aeríferas, que é carregada pelos canais de sódio (ENaC). Esse mecanismo causa a diminuição do líquido de superfície das vias aeríferas, levando à desidratação das secreções respiratórias e aumento da viscosidade, com consequente diminuição do *clearance* mucociliar, favorecendo a obstrução dos ductos em decorrência do acúmulo de muco, desencadeando um processo inflamatório crônico que, por sua vez, predispõe à instalação de agentes infecciosos nas vias aéreas (Ribeiro et al., 2002).

A perda da função pulmonar é a principal causa de morte em pacientes com FC. Terapias mais atuais para melhora da função pulmonar, incluindo uso de agentes mucolíticos, monitoramento de agentes infecciosos, antibioticoterapia mais agressiva, aspectos nutricionais, aumentaram a expectativa de vida média de indivíduos com FC para aproximadamente 39 anos (Ashlock & Olson, 2011).

A colonização quando o microrganismo é encontrado nas vias aeríferas, porém sem que o paciente tenha evidências diretas de infecção e dano tissular (inflamação, febre, etc) ou indiretas (resposta de anticorpos específicos). A colonização pode ser aguda ou crônica, sendo esta última considerada quando o mesmo microrganismo é encontrado em mais de três amostras consecutivas, com no mínimo, um mês de intervalo entre elas. O paciente é considerado infectado quando ocorrem os primeiros sinais de exacerbação pulmonar direto (inflamação, febre, aumento da tosse e da secreção, perda de peso, etc) ou indireto (resposta de anticorpos específicos) e o microrganismo é encontrado nas vias aeríferas (Doring et al., 2000).

A infecção também pode ser definida como aguda ou crônica, sendo que, nos casos de infecção crônica, o paciente pode apresentar períodos de agudização intermitentes. Fatores do indivíduo associados com a patogenicidade dos agentes infecciosos determinam a gravidade da infecção.

Embora exista um espectro limitado de patógenos respiratórios classicamente associados à doença respiratória na FC, um número crescente de microrganismos vem sendo

reconhecido como potenciais agentes patogênicos. O espectro de patógenos em FC varia com a idade do paciente, mas, de uma forma geral, é bem estabelecido na literatura que existem quatro bactérias “clássicas”: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e o complexo *B.cepacia* (CBC). A maior sobrevivência dos pacientes fibrocísticos, os quais são submetidos a ciclos repetidos de antibióticos, bem como o uso de novos métodos de diagnóstico microbiológico contribuíram para o reconhecimento de patógenos emergentes ou “não-clássicos”, como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* e micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (NMT) além de outros (*Ralstonia* sp, *Cupriavidus* sp, *Pandoraea* sp, *Inquilinus limosus*, *Aspergillus* sp). Portanto é necessário monitorar o surgimento de cepas de patógenos clássicos e não-clássicos principalmente aqueles mais resistentes aos antibióticos, como *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e *P.aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos. Além disso, é importante avaliar através do exame bacteriológico, possíveis reduções de carga microbiana pulmonar, especialmente de *P. aeruginosa* e CBC, visto que a erradicação total destes patógenos na fase de colonização ou infecção crônicas é praticamente impossível em FC (Gilligan et al., 2006; Lutz et al., 2011).

A fina camada de muco, produzido pelos pneumócitos tipo I e II, que normalmente reveste as superfícies internas dos alvéolos pulmonares é, na FC, anormalmente espessa, obstruindo o fluxo de ar e fornecendo um substrato para a fixação de bactérias saprófitas e patogênicas, particularmente *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Lehninger et al., 2006).

Os pacientes com FC são colonizados e/ou infectados por uma variedade limitada de microrganismos, cujas prevalências variam de acordo com a idade e/ou gravidade da doença.

Na infância, geralmente os pacientes se infectam por *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e, ocasionalmente, por *Pseudomonas aeruginosa*. Na era pré-antibiótica, o *S. aureus* foi considerado um patógeno importante, cuja presença nas vias aeríferas esteve associada à maior causa de mortalidade. Embora seja predominante em crianças e adolescentes, com prevalência de cerca de 60%, o agente pode ser encontrado em indivíduos de todas as faixas etárias. A prevalência no final da adolescência e início da idade adulta é reduzida para 30%. Infecções crônicas por *S. aureus* são muito comuns, porém,

atualmente, o papel deste agente na FC é pouco conhecido e as exacerbações causadas por este agente podem ser tratadas em curto tempo com terapias antimicrobianas agressivas. Dados de alguns estudos sugerem que a infecção persistente por *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina ou meticilina (MRSA) podem ter um impacto negativo na função pulmonar (Gilligan et al., 2006; Kiska et al., 2012). Em 2008, *S. aureus* foi isolado em 50,9% de pacientes com FC, sendo maior a prevalência entre 06 e 07 anos de idade (Lipuma, 2010). Ren et al. (2007) verificaram que em pacientes de todas as idades, o isolamento de MRSA como o único microrganismo em culturas de escarro associado a uma função pulmonar significativamente mais deficiente, aumento da probabilidade de hospitalização e tratamento com antibióticos.

A *P. aeruginosa* é considerada o principal agente infeccioso envolvido na pneumopatia crônica de pacientes com FC sendo a prevalência mais representativa em adultos jovens (cerca de 80%), embora seja crescente o número de infecções detectadas na infância. A colonização inicial ocorre com cepas móveis, “não mucóides”, ou “planctônicas” que, com a evolução da doença, tornam-se mais virulentas, alteram sua morfologia, perdem os flagelos, tornam-se imóveis e passam a produzir uma cápsula de um polissacarídeo denominado alginato, que lhes confere a capacidade de crescer formando “biofilmes” e a característica “mucóide” (Gilligan et al., 2006; Kiska et al., 2012).

A elastinase é uma metaloproteína termolábil, contendo zinco que provoca as lesões hemorrágicas observadas em infecções por *P. aeruginosa* através da ligação à lâmina elástica dos vasos sanguíneos. A elastinase cliva anticorpos da classe IgG e certos componentes do complemento. A protease alcalina provoca necrose tecidual. A *P. aeruginosa* produz duas hemolisinas e três exotoxinas (A, B e C). A exotoxina A causa necrose tecidual local e inibe granulócitos e células progenitoras de macrófagos na medula óssea (Zambon & Nisengard, 1997).

Uma das características clinicamente mais importantes da infecção por *P.aeruginosa* é a tendência dessa bactéria de mudar para um morfotipo colonial mucóide, provavelmente iniciando um estágio crônico-infectante da doença (Lyczak et al., 2002). O morfotipo mucóide resulta da produção bacteriana em grande escala de polissacarídeos que

envolvem a célula. Esse material foi designado como *mucoïd exopolysacaride* ou MEP (exopolissacarídeo mucóide) (Gilligan, 1991) ou alginato. Este polissacarídeo possui um papel importante na evasão bacteriana da resposta imune do hospedeiro (Lyczak et al., 2002).

P. aeruginosa na forma mucóide é a mais virulenta, podendo ser encontrada em pacientes com infecções graves, muitas vezes no mesmo paciente onde já existe na sua forma não mucóide. Estudos revelam que a distinção destas formas da bactéria é importante para o modo do tratamento. Muitas vezes a forma mucóide e não mucóide podem ser originadas da mesma cepa, porém podem apresentar perfil bioquímico e de suscetibilidade a antibióticos muito diferentes (Miller & Gilligan, 2003).

O muco espesso e viscoso dificulta a erradicação dos microrganismos do trato respiratório dos pacientes, em especial a *Pseudomonas aeruginosa*, que uma vez instalada, não pode ser erradicada pela antibioticoterapia, o paciente se torna crônico, muitas vezes sem evidências diretas de doença pulmonar, mas podendo apresentar fases de agudização intermitentes e, nestes casos, o objetivo da terapia acaba sendo apenas de reduzir o número de colônias e contribuir para uma melhora na qualidade de vida do paciente. Diante disso, o uso prolongado de antibióticos é inevitável, porém, contribui para a seleção natural de microrganismos com perfil de resistência diferenciado, tais como as cepas mucóides de *Pseudomonas aeruginosa*, além de favorecer a colonização e infecção por outros agentes oportunistas, tais como o Complexo *Burkholderia cepacia* (Coenye et al., 2001; Gilligan et al., 2006; Konemman, 2006).

O Complexo *Burkholderia cepacia* compreende microrganismos não fermentadores da glicose de crescimento lento. Seu isolamento a partir de secreções do trato respiratório muitas vezes é impedido pela presença de outros microrganismos de crescimento mais rápido, que competem por nutrientes (Gilligan et al., 2006).

A presença do Complexo *Burkholderia cepacia* nas vias aéreas pode estar associada a um acelerado declínio da função pulmonar, pneumonia necrozante e um quadro séptico denominado de “Síndrome cepacia” (Coenye et al., 2001; Gilligan et al., 2006; Konemman, 2006).

As proteínas de membrana externa associadas aos pili na superfície da bactéria têm um papel importante na adesão de *B. cepacia* ao trato respiratório. Essa bactéria é capaz de invadir o epitélio aéreo e pode também causar bacteremia disseminada. É intrinsecamente resistente a vários antibióticos pela presença de porinas (Lyczak et al., 2002). Essa resistência está relacionada também à permeabilidade seletiva da parede celular, alteração da célula-alvo e à inativação enzimática de antibióticos (Miller & Gilligan, 2003).

Haemophilus influenzae não é persistente nos pulmões por longo período. Embora sua colonização tenha sido relacionada com exacerbações pulmonares, não há evidência de que possa ter ocorrido uma infecção primária com declínio pulmonar (Gilligan, 1991). O isolamento dessa espécie das secreções de pacientes com FC é desafiador, especialmente em pacientes coinfectados com *P. aeruginosa*. Muitas vezes *H. influenzae* começa colonizando primariamente o trato respiratório superior. Dados relacionados ao potencial patogênico dessa bactéria, virtualmente não existem, mesmo assim muitos clínicos consideram a possibilidade desse microrganismo colonizar os pulmões, de maneira significativa o bastante para justificar a terapia (Lyczak et al., 2002).

Achromobacter xylosoxidans está sendo identificado com maior frequência, principalmente na população adulta. O papel de qualquer desses agentes na doença pulmonar, não foi ainda determinado (Miller & Gilligan, 2003), embora a associação destes microrganismos com exacerbações pulmonares já tenha sido relatada (Saiman & Siegrl, 2004).

Ambas as bactérias podem ser patógenos emergentes em pacientes com FC, por isso é crítico estabelecer a transmissibilidade desses microrganismos. A prevalência desses microrganismos tem sido frequentemente relatada, porém com diferenças entre os centros de tratamento de pacientes com FC. A patogenicidade de *S. maltophilia* parece não ser significativa enquanto que *A. xylosoxidans* parece estar relacionado a casos específicos de maior virulência em FC (Gilligan et al., 2006; Mantovani et al., 2012; Kiska et al., 2012).

O principal agente fúngico responsável pela infecção pulmonar em pacientes com FC é *Aspergillus fumigatus*. Os fungos filamentosos são frequentemente recuperados de amostras respiratórias de pacientes com FC, especialmente com o aumento do uso de ágar

seletivo para *C. B. cepacia* que auxilia no crescimento de fungos. Somente *Aspergillus* spp. tem sido reconhecido sendo associado aos sintomas pulmonares em pacientes com FC (Miller & Gilligan, 2003).

Maiz et al.(2008), mostraram que a maioria dos indivíduos com FC apresentaram resposta imune a *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, confirmando a elevada taxa de exposição dos doentes a estes fungos.

1.2 Odontologia

O dente pode ser dividido entre coroa, colo e raiz (Herring & Shah, 2006) (Fig.4). O osso alveolar, estrutura onde os dentes são alojados, é formado predominantemente por colágeno, sialoproteínas, osteopontinas e proteoglicanos.

A camada mais interna do dente, a polpa, contém os nervos e suprimento vascular. A dentina é um tecido mineralizado, formado pela extensão dos odontoblastos e tecidos conectivos localizados na dentina.

O esmalte, que cobre a coroa é o tecido mais mineralizado e mais rígido do corpo (Alves et al., 2007), o qual uma vez formado não sofre remodelação como outros tecidos duros. Trata-se de um tecido acelular que não tem meios fisiológicos de reparação de fora do potencial protetor e de remineralização fornecida pela saliva. Fazem parte de sua composição, os cristais de hidroxiapatita altamente organizados (Hoffmann et al., 2007). Todo o processo está sob instrução genética. O controle genético da amelogênese é mal compreendido, mas requer as atividades dos vários componentes que são excepcionalmente importantes para a formação do esmalte dentário (Seow, 1997).

O cimento radicular é a substância que cobre a raiz do dente, sendo constituído por tecido conectivo semelhante ao osso.

O ligamento periodontal fixa o dente ao processo alveolar, sendo formado por tecido fibroso, células epiteliais e células mesenquimais indiferenciadas. A gengiva, estrutura

que cobre o processo alveolar e parte dos dentes é composta principalmente de colágeno, proteoglicanos, fibronectina, osteonectina e elastina.

O espaço entre o dente e o epitélio gengival é denominado de sulco gengival, cuja profundidade é determinada pelo ligamento periodontal. A principal função do periodonto, formado pelo cemento radicular, osso alveolar, gengiva e ligamento periodontal, é apoiar os dentes e suportar as forças de oclusão (Alves et al., 2007).

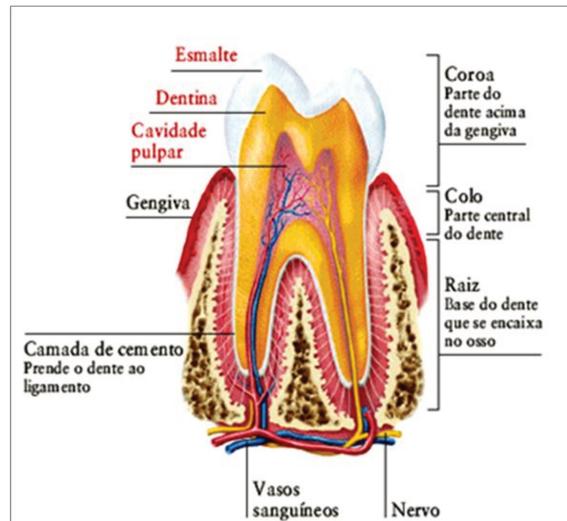


Figura 4. Estrutura dental. Fonte: <http://www.forp.usp.br/restauradora/dente.gif>

Dentro das várias atividades preventivas, a educação e a motivação do indivíduo ocupam lugar de destaque e devem ser aplicadas com o objetivo de mudar hábitos e comportamentos, no sentido de promover a saúde e melhorar a higiene bucal do paciente (Brandão, 1998). Contudo, segundo Blinkhorn (1993), na maioria das vezes, a mudança de hábito é muito difícil de ser atingida em virtude de influências sociais, culturais e governamentais que ocasionam uma verdadeira inversão de valores.

Neste sentido, para que o cirurgião-dentista consiga promover a educação, faz-se necessária a utilização de estratégias e métodos adequados de motivação e, principalmente, reforço das informações (Santos et al., 2003). A continuidade da motivação é a responsável pela sedimentação dos conhecimentos (Santos et al., 2002).

O biofilme dental é o fator de maior importância na etiologia da cárie e das doenças periodontais e há uma relação muito grande com a higiene bucal deficiente (Domejean-Orliaguet et al., 2006; Gutmann et al., 2009; Beikler & Flemmig, 2011).

A gengivite e a periodontite são dois processos inflamatórios, crônicos e distintos, pertencentes ao espectro de doenças periodontais da cavidade oral que afetam os tecidos de suporte dental, em resposta ao acúmulo de bactérias. Em contraste com a periodontite, a gengivite se inicia após alguns dias de procedimentos de higiene oral inadequada devido ao depósito de placa bacteriana. A gengivite é uma inflamação superficial e não destrói o tecido conjuntivo e osso circundante. Na gengivite, o sangramento gengival pode ocorrer após a estimulação mecânica suave em casos graves ou durante a escovação e mastigação. A regressão completa da gengivite ocorre com procedimentos adequados de higiene oral (Kebuschull et al., 2010).

O último levantamento epidemiológico nacional, concluído em 2003, para as doenças bucais, denominado de SB – Brasil constatou o declínio, de lesões de cárie na população infantil brasileira. Observou-se que cerca de 70% das crianças brasileiras de 12 anos têm pelo menos um dente permanente com experiência de cárie. O Brasil atingiu as metas propostas pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para o ano 2000 somente no grupo etário de 12 anos nas regiões Sul e Sudeste (Ministério da Saúde, 2004). Foi aceito e estabelecido universalmente, que a cárie dentária é uma doença multifatorial, infecciosa, transmissível (Fitzgerald & Keyes, 1960) e dependente de dieta. Produz uma desmineralização das estruturas dentárias (Keyes, 1962).

Há um consenso de que a alimentação e o estado nutricional exercem influência sobre a condição bucal imediata e futura da criança (Batista et al., 2007). Deficiências nutricionais nos primórdios do desenvolvimento ou durante a fase de maturação podem causar alterações na estrutura do esmalte e também na sequência eruptiva dos dentes.

O desenvolvimento do esmalte dentário ocorre por um longo período e qualquer alteração ocorrida durante a amelogênese, mesmo que de curta duração, pode determinar o aparecimento de defeitos circunscritos nos dentes em formação (Hanser-Ducatti et al., 2004).

Além de fatores hereditários e distúrbios locais, como traumas e infecções, fatores de natureza sistêmica têm sido associados à etiologia dos defeitos de desenvolvimento do esmalte (DDE), como ingestão de doses elevadas de fluoretos (Fejerskov et al., 1994), doenças respiratórias (Guergolette et al., 2009; Ford et al., 2009), complicações perinatais e prematuridade. Também são descritos como causas o baixo peso ao nascimento, as desordens metabólicas de cálcio e fosfato, e as doenças infecciosas nos primeiros anos de vida (Jälevik et al., 2001; Arrow, 2009).

Enquanto os DDE em dentes decíduos são ocasionados principalmente no período pré-natal e ao nascimento, os defeitos em dentes permanentes decorrem de injúrias ocorridas na primeira infância. O primeiro ano de vida, época na qual os dentes permanentes estão em desenvolvimento, corresponde também ao período de maior vulnerabilidade a agravos nutricionais, infecciosos e ambientais (Rugg-Gun et al., 1998).

Sabe-se que a formação do esmalte dentário pode ser dividida em três estágios: (i) o estágio da formação da matriz, no qual as proteínas envolvidas na amelogenese são produzidas; (ii) o estágio da calcificação, no qual é depositado mineral, e a maior parte das proteínas originais são removidas; e (iii) o estágio da maturação no qual o esmalte recém mineralizado sofre processo final de calcificação, e as proteínas ainda remanescentes são removidas. Esses processos acontecem sob influência genética e mudanças ambientais, dessa forma, o desenvolvimento de defeitos do esmalte podem resultar de qualquer dano ocorrido nesses estágios.

Geralmente é aceito que distúrbios que ocorram durante os primeiros estágios de desenvolvimento do esmalte resultarão na redução da quantidade ou espessura do esmalte, ou seja, a hipoplasia do esmalte (Seow, 1997). Hipoplasia de esmalte pode ser então, definida como deficiência na quantidade do esmalte, resultante de alterações do desenvolvimento, e podem ocorrer na forma de fóssulas, fissuras ou perdas de áreas grandes de esmalte. Em contraste, distúrbios ocorridos durante o estágio da calcificação e maturação do desenvolvimento do esmalte podem levar a deficiências na mineralização (hipocalcificação) e geralmente se manifestam como mudanças na translucência ou opacidades do esmalte. As opacidades podem ser demarcadas ou difusas. A opacidade demarcada apresenta um esmalte

de espessura normal e com uma superfície intacta, porém existe uma alteração na translucidez do esmalte, de grau variável. Essa translucidez é demarcada a partir do esmalte adjacente normal com limites nítidos e claros, podendo apresentar uma coloração branca, bege, amarela ou marrom. A opacidade difusa também é uma anormalidade envolvendo uma alteração na translucidez do esmalte, de grau variável, e de coloração variável como a opacidade demarcada. Todavia, não existe um limite claro entre o esmalte normal adjacente e a opacidade difusa, podendo apresentar-se clinicamente de forma linear ou em placas, ou ter uma distribuição confluyente (World Health Organization, 1997).

Os microorganismos encontrados com maior frequência em lesões de cárie são os cocos facultativos Gram-positivo, especificamente *Streptococcus mutans* e *S. salivarius*. Também encontramos *Lactobacillus sp.*, *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii* (Wolinsky,1994). Tem sido demonstrada em lesões avançadas de cárie, a presença de uma comunidade bacteriana diversificada e complexa representada por muitas espécies, que incluem tanto bactérias gram-positivas e gram-negativas, anaeróbias facultativas e estritas. Entre os gêneros identificados pode-se incluir: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Porphyromonas dentocariosa*, *Arachnia sp*, *Selenomonas sp*, *Olsenella sp*, *Pseudoramibacter sp*. (Figueroa-Gordon & Acevedo, 2008).

Os *Lactobacillus* possuem a capacidade de produzir ácido láctico e de crescer no ambiente relativamente ácido que foi criado pela sua fermentação. Devido a essas características são denominados acidogênicos e acidófilos. Tais fatores podem ser importantes para sua associação com algumas lesões cariosas (Wolinsky,1994). A lesão cariosa é caracterizada por uma desmineralização da porção inorgânica e desorganização da parte orgânica, resultando na desnaturação do colágeno (Garone et al., 2003).

2- JUSTIFICATIVA

A cavidade oral poderá refletir alterações que comprometem a saúde geral do paciente com FC. Em contrapartida, essa doença pode provocar alterações fisiológico-funcionais importantes na cavidade oral e secreção salivar.

Partindo da premissa de que tanto o suor como a saliva possuem o mesmo mecanismo de produção da secreção. Se útil, a coleta e uso da saliva para diagnóstico da FC, quando comparado com o teste do suor pode minimizar o desconforto do paciente, além de ser mais rápido e de baixo custo.

O conhecimento das condições da saúde oral e da microbiologia da saliva nessa população fibrocística, permitirá avaliar os possíveis fatores de risco a ela relacionados e quando possível elaborar estratégias para a sua prevenção.

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar alguns parâmetros da saúde bucal (índice de placa e gengival, os dentes cariados, perdidos e obturados), íons da saliva de pacientes com FC e a associação com a gravidade da doença. Avaliar ainda a possibilidade do uso da saliva como método diagnóstico.

3.2 Objetivos específicos

A) Descrever o número de dentes cariados, perdidos e obturados nos pacientes com FC;

B) Avaliar o índice de placa (IP) e índice gengival (IG) e verificar a correlação com o escore de Shwachman e uso crônico de antimicrobianos (orais e inalatórios) e de Dornase alfa®;

C) Comparar o volume, pH e os níveis de cloro, sódio, potássio, bicarbonato, lactato e glicose na saliva entre pacientes com FC e indivíduos saudáveis;

D) Verificar a correlação da gravidade da doença (escore de Shwachman) com as concentrações de cloro e sódio na saliva de pacientes com FC;

E) Comparar os achados da microbiota bucal com do material de origem pulmonar.

4- CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Desenhos do estudo

Estudo descritivo em relação ao estudo da saúde bucal e da microbiologia oral e comparativo e descritivo no estudo dos parâmetros bioquímicos da saliva.

4.2 Populações do estudo

No período de Outubro de 2010 à Maio de 2013 de foram incluídos e analisados 95 pacientes com FC, atendidos regularmente pelo Ambulatório Pediátrico de FC –Hospital de Clínicas – UNICAMP. Desses pacientes, 50,5% era do gênero feminino e 49,5% masculino, com média de idade 12,69 anos. O grupo controle foi composto por 84 indivíduos saudáveis da Escola Estadual Sophia Velter Salgado.

4.2.1 Critérios de inclusão

4.2.1.1 Pacientes com FC

Foram incluídos no estudo pacientes de 04 a 32 anos, atendidos no Ambulatório de FC do Hospital de Clínicas da UNICAMP e durante o período do estudo, com diagnóstico de FC comprovado através da identificação de duas mutações para o gene da FC, pelo estudo genético e/ou, com, no mínimo, dois testes de cloro no suor positivo. Pacientes e /ou responsáveis que concordaram e assinaram o TCLE (anexo II).

4.2.1.2 Grupo controle

Somente para a comparação dos parâmetros bioquímicos foram coletadas amostras de saliva de indivíduos saudáveis da mesma faixa etária do grupo de pacientes com fibrose cística, recrutados em de escola pública do ensino fundamental da cidade de Campinas - SP. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi previamente encaminhado aos

pais para informações sobre a saúde da criança e assinatura, para inclusão de indivíduos aparentemente saudáveis (anexo III).

4.2.2 Critérios de exclusão

4.2.2.1 Pacientes com FC

- Pacientes que não consentiram participar do estudo.
- Menores de dois anos, pela dificuldade de exame clínico odontológico.
- Pacientes que apresentaram estudo genético e/ou teste do suor incompleto ou inconclusivo.

4.2.2.2 Grupo controle

Foram excluídos indivíduos que faziam uso contínuo de medicação e indivíduos que não consentiram para a realização do estudo.

4.2.3 Critérios de não inclusão

Pacientes (FC), indivíduos saudáveis (GC) ou responsáveis pelos mesmos (para menores de 18 anos) que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.3 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi encaminhado para o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e somente após a aprovação foi iniciado a pesquisa de acordo com a Resolução nº 196/96. Parecer registrado sob o número 157/2010. Foram respeitadas as condições éticas pertinentes ao protocolo e seguidos rigorosamente os princípios enunciados na Declaração de Helsink II de 20/08/1947 e da Resolução 196/96 da CONEP.

Os sujeitos foram incluídos somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por escrito (Anexo II e III) por um dos pais ou responsável legal, mantendo o anonimato dos mesmos bem como dos dados colhidos.

4.4 Métodos

4.4.1 Diagnóstico da FC

4.4.1.1 Iontoforese (Teste do Suor)

O Teste do Suor (TS) foi realizado pela análise iônica quantitativa do suor estimulado pela pilocarpina (Gibson & Cooke, 1959). O método consiste na estimulação da produção de suor pela pilocarpina, que é colocada sobre a pele ou diretamente nas glândulas sudoríparas usando um gradiente de potencial (iontoforese) e análise da concentração dos íons sódio e cloro. O resultado é positivo quando a concentração de cloro é maior do que 60 mEq/L. Os valores são normais até 45 mEq/L. Em adolescentes e adultos jovens, os valores podem ser mais elevados, sendo assim, valores entre 45 – 60 mEq/L são considerados duvidosos (Ribeiro et al., 2002). São necessários, no mínimo, dois testes positivos para que o diagnóstico seja confirmado.

4.4.1.2 Estudo genético

A presença de mutações do gene CFTR foi determinada no laboratório de genética molecular da instituição por meio do método RFLP (G542X, R1162X, R553X, G551D e N1303K). Algumas mutações foram obtidas por sequenciamento ou multiplex ligation-dependent probe amplification: S4X, 2183A>G, 1717-G>A e I618T. Para ambos os métodos, usamos o sequenciador de DNA MegaBace1000 (GE Healthcare Biosciences). Foi usado, o método do fenol/clorofórmio para a extração do DNA, e, em todas as análises genéticas, a concentração do DNA foi de 50 ng/mL, determinada por um espectrofotômetro (NanoVueT; GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, EUA). A presença da mutação F508del foi determinada pelo PCR com um par de iniciadores - senso (5'-GGC ACC ATT AAA GAA AAT ATC-3') e antissenso (5'-TGG CAT GCT TTG ATG ACG C-3') -

resultando em um fragmento de 74 pb (homozigose para F508del), um fragmento de 77 pb (ausência de F508del) ou presença de ambos os fragmentos (heterozigose para F508del). O procedimento de ciclagem térmica consistiu em desnaturação inicial a 94°C durante 5 min., seguida de desnaturação a 94°C durante 1 min., anelamento a 53,5°C durante 1 min. e extensão a 72°C durante 1 min., repetidos durante 35 ciclos e seguidos de uma extensão final a 72°C durante 10 min. A PCR continha 25 µL de uma solução com 50 ng de DNA, 1 µM de cada iniciador, 200 µM de dNTP, 1,0 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4 a 25°C) e 1,5 U de Taq DNA polimerase. Após a adição de 5 µL de tampão de carga à base de glicerol, 10 µL do produto da reação foram aplicados sobre gel de acrilamida (Bonadia, 2011; Marson et al., 2013).

4.4.2 Avaliação clínica e fatores de gravidade na FC

Para a avaliação clínica e fatores de gravidade na FC foi utilizado o escore de Shwachman & Kulczycki (Shwachman & Kulczycki, 1958)

4.4.3 Exame clínico odontológico

Todo procedimento odontológico seguiu normas rigorosas para prevenir a transmissão entre pacientes de microrganismos potencialmente patogênicos de interesse da fibrose cística, como *c.B. cepacia* e outros, bem como de condutas padrão de proteção do dentista e do paciente, como o uso de luvas, máscara e óculos com proteção lateral, material esterilizado e/ou descartável e outras barreiras de proteção de uso individual. Como conduta padrão, os pacientes colonizados por *cB.cepacia* foram atendidos por último ou quando possível em dia exclusivo.

Em todos os pacientes fibrocísticos que fizeram parte desse estudo foram realizados os seguintes procedimentos:

- 1) inspeção geral da cavidade bucal;

2) 1ª coleta de saliva;

3) os dentes foram corados com solução evidenciadora com corante eritrosina para revelar a placa

4) profilaxia dental com escova dental e pasta profilática, e secagem da superfície dental com a seringa tríplice;

5) exame clínico (com o auxílio de espelho clínico, sonda e refletor) através do qual foi realizado o diagnóstico.

Foram avaliados, na cavidade bucal:

A. Placa bacteriana

Os dentes foram corados com solução evidenciadora com corante eritrosina para revelar acúmulos placa. Foi atribuído um escore ordinal de 0 a 3 quantificando o acúmulo da placa bacteriana (IP):

0 = Nenhuma placa na área gengival.

1 = Nenhuma película, inflamação leve, pequena alteração na cor, pouco edema; nenhum sangramento a palpação.

2 = Inflamação moderada, rubor, edema; nenhum sangramento à palpação

3 = Inflamação grave, rubor intenso e edema, ulcerações; tendência a sangramento espontâneo.

B. Gengivite

Foi aplicado um escore ordinal para descrição quantitativa de gengivite:

0 = Gengiva normal

1 = inflamação leve, pequena alteração na cor, pouco edema; nenhum sangramento a palpação.

2 = inflamação moderada, rubor, edema; nenhum sangramento à palpação.

3 = inflamação grave, rubor intenso e edema, ulcerações; tendência a sangramento espontâneo.

C. Cárie dental

Foram realizados exames clínicos para o diagnóstico preciso dos arcos dentais de lesões incipientes e ativas (exame clínico com sonda exploradora e espelho bucal) de acordo com Lõesche (1993) nos quatro quadrantes da boca (superiores e inferiores).

4.4.4 Saliva

Local de coleta de saliva e profissionais envolvidos

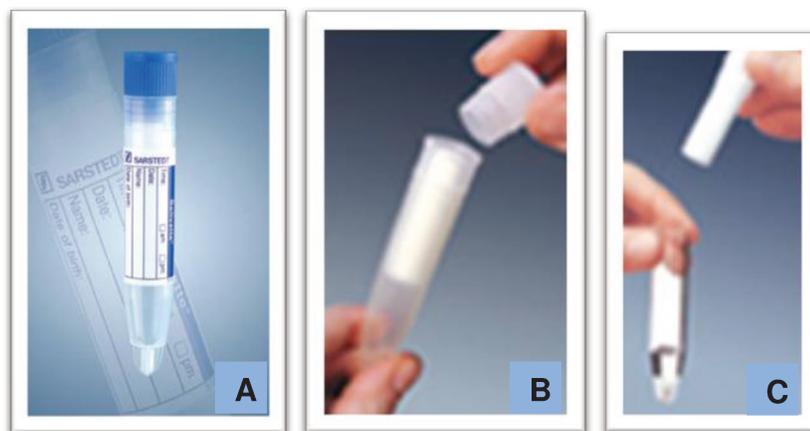
As amostras de saliva foram coletadas no Ambulatório Pediátrico de Fibrose Cística, do HC – UNICAMP, pela pesquisadora responsável.

Número de amostra e técnica de coleta

Após bochecho vigoroso com água e antes da coleta do escarro, foi coletada 01 (uma) amostra de saliva de cada paciente com o Salivette® (Alemanha). A coleta foi realizada sem nenhum contato manual e sempre no mesmo período, para ambos os grupos, para evitar interferências do ciclo circadiano.

Depois de retirar a tampa do Eppendorf, foi inserido na boca do paciente um rolete de algodão, com o qual permaneceu durante 1 (um) minuto. Em seguida o rolete de algodão foi colocado novamente no Eppendorf e tampado (Figura 5).

Figura 5. Estrutura do Salivette®



A: Salivette®; **B e C:** o rolete de algodão fica dentro de um suporte de dentro do Salivette®, para quando o tubete contendo a amostra de saliva for centrifugado a saliva se separe do rolete de algodão, ficando abaixo do suporte do rolete de algodão. **Fonte:** <http://www.sarstedt.com/product-pics/133/3.jpg>

Conservação e transporte

A amostra de saliva coletada foi conservada em refrigeração até o momento da centrifugação.

Processamento das amostras

No laboratório de Gasometria da Divisão de Patologia Clínica do HC UNICAMP, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm, logo após foi aferido o volume de saliva na própria parede do Salivette®.

Imediatamente após a centrifugação, foram aferidos sódio, cloro, pH, bicarbonato, glicose e lactato da saliva pela técnica de eletrodo íon seletivo (gasometria) no equipamento ABL Radiometer® (Dinamarca) modelo 835, para detecção desses parâmetros em amostras

de líquido. A quantidade de saliva necessária para que o aparelho fizesse a dosagem das concentrações iônicas da saliva foi de 2 microlitros.

4.4.5 Análise Microbiológica

Saliva

Após coleta padronizada, as amostras foram transferidas com a alça calibrada (10µl) para semeadura em meio de Ágar Sangue, Ágar Chocolate, Ágar McConkey, Ágar Burkholderia Seletive Ágar (BCSA), Ágar Manitol Sal e Ágar Sabourauda análise microbiológica que foi realizada no Laboratório de Microbiologia do HC da UNICAMP.

Após semeadas, as amostras foram incubadas a 37°C sendo o Ágar Chocolate incubado em 5% de CO₂, em estufa apropriada. Diariamente, até 7 dias, as mesmas foram examinadas e colônias diferentes reisoladas, examinadas pela coloração de Gram e identificadas por métodos manuais ou automatizados (Vitek II BioMerieux®), conforme a rotina do Laboratório de Microbiologia do HC UNICAMP.

Escarro

Conforme padronizado pelo Ambulatório Pediátrico de FC do HC UNICAMP, após a coleta de saliva, coletamos uma amostra de escarro espontâneo. As amostras foram mantidas em caixa com gelo até o processamento no Laboratório de Microbiologia do HC UNICAMP.

Semeadura

A rotina do Laboratório de Microbiologia do HC UNICAMP foi seguida e apresentada resumidamente a seguir.

Com o auxílio de uma alça calibrada, foi semeada uma alçada (10 µl), por método semi-quantitativo (técnica do esgotamento), nos meios de cultura Ágar Sangue (AS), Ágar Chocolate (ACHOC), Ágar McConkey (MC), *Burkholderia Cepacia Selective Agar* (BCSA) e Ágar Manitol Sal (MAN).

As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, com CO₂ (AS e ACHOC) e sem CO₂ (MC, MAN e BCSA), por um período de 24 – 72 horas, com avaliação do crescimento microbiano a cada 24 horas. Quando não houve crescimento bacteriano neste período, as placas de BCSA e MC foram mantidas em estufa bacteriológica por até 7 dias.

Isolamento e Identificação fenotípica dos Microrganismos Isolados

Após a cultura e isolamento, os microrganismos foram identificados fenotipicamente através de provas bioquímicas manuais, conforme descrito anteriormente (Coenye et al., 2001; Koneman et al., 2006; Gilligan et al., 2006, Versalovic et al., 2011;) e pelo sistema automatizado *Vitek®* (BioMerieux Vitek Inc., St. Louis, MO), conforme recomendações descritas pelo fabricante segundo a rotina do Laboratório de Microbiologia do HC UNICAMP.

As bactérias de interesse em FC são: *S. aureus*, *H. influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* mucóide e não mucóide, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter spp*, *Ralstonia spp*, *Pandoraea spp*, *Cupriavidus spp*, *Burkholderia gladioli* e complexo *B. cepacia*, *Aspergillus spp* e outros fungos oportunistas e micobacterias que venham a ser isolados nos meios de cultura para bactérias.

Bactérias que não puderam ser devidamente identificadas foram congeladas em BHI com glicerol 15% no banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do HC UNICAMP para posterior análise molecular por PCR e ou sequenciamento.

4.6 Análise estatística

Os dados foram processados e armazenados no banco de dados criado pelo *software* Statistical Package for Social Sciences® (SPSS) for Windows versão 17 (SPSS, 2011). O nível de significância do estudo de 5% foi submetido à análise descritiva para obtenção das frequências absoluta e correlação das variáveis analisadas.

O teste de Mann Whitney foi usado para avaliar as diferenças entre os resultados dos parâmetros bioquímicos da saliva obtido no grupo de pacientes com FC e indivíduos saudáveis, com nível de significância de 5%. Para o cálculo do tamanho da amostra foi aplicado o programa GPower®, versão 3.1.2. (Faul et al., 2007), usando o Teste de Mann-Whitney indicou que seriam necessários 67 indivíduos para cada grupo considerando o poder da amostra de 80% e significância de 0,05. O poder da amostra foi previamente calculado pelo setor de estatística da FCM-UNICAMP.

Para a análise comparativa dos parâmetros bioquímicos da saliva o nível de significância (α) foi ajustado, utilizando o método de correção de Bonferroni (α corrigida= 0.05/número de testes) para evitar dados não genuínos causados pelo desempenho de múltiplos testes (Drăghici, 2003). A curva ROC foi realizada para medir a sensibilidade, especificidade e determinar o ponto de corte (Cut-off) dos íons cloro e sódio da saliva.

5- RESULTADOS

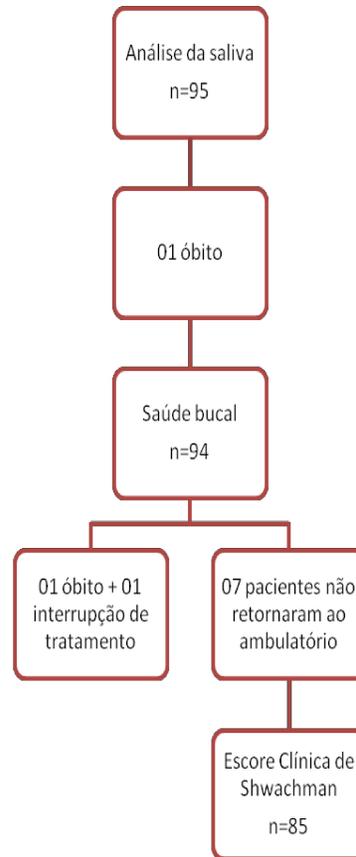
A caracterização genética e a distribuição das mutações detectadas podem ser vistas no quadro 1.

Quadro1. Mutações genéticas dos pacientes dessa casuística

Mutações	N	Porcentagem(%)
F508del/F508del	26	27,3
F508del/ MNI •	28	29,5
F508del/ G542X	12	12,6
G542X/ R1162X	2	2,1
G542X/ MNI•	3	3,1
R1162X/ MNI•	1	1
R1162X/ R1162X	1	1
F508del/R553X	1	1
NMI*	21	22,1
Total	95	100

*MNI- mutação não identificada; NMI- nenhuma mutação identificada

Todos os pacientes foram submetidos à análise da saliva e avaliação da microbiota. A avaliação da saúde bucal foi realizada em momento posterior, sendo que 1 paciente foi a óbito antes deste ser possível realizar este procedimento; em relação ao escore de Shwachman, foram avaliados 85 pacientes, dados que podem ser visualizados no fluxograma abaixo.



Fluxograma 1. Número de pacientes que participaram das diferentes etapas do estudo: coleta de saliva e estudo microbiológico, avaliação da saúde bucal e escore de Shwachman.

5.1 Escores de Shwachman

Foi avaliado o escore de Shwachman de 85 dos 95 pacientes, nestes observou-se que a categoria “boa” foi a que apresentou maior grupo de pacientes (32), seguida do “leve” (29). As categorias nas pontas extremas do escore (grave e excelente) apresentaram igualmente 6 (seis) pacientes em cada uma delas. A distribuição quanto à gravidade clínica da doença pode ser vista no Quadro 2.

Quadro 2. Distribuição do Escore clínico de Shwachman

Escore Clínico de Shwachman-Kulczycki	N	Porcentagem (%)
EXCELENTE (86-100)	6	7,05
BOM (71-85)	32	36,7
LEVE (56-70)	29	34,1
MODERADO (41-55)	12	14,1
GRAVE (≤ 40)	6	7,05
Total	85	100

5.2 Parâmetros bioquímicos da saliva, pH e volume salivar

Para comparação dos parâmetros bioquímicos da saliva, pH e volume salivar, dos 95 pacientes com FC foi necessário um grupo controle não pareado, o qual foi composto por 84 indivíduos saudáveis (feminino= 57,1% e masculino= 42,9%) de escola pública do ensino fundamental da cidade de Campinas - SP. A idade média do grupo controle foi de 13,56 anos. A comparação dos parâmetros bioquímicos da saliva entre os pacientes com FC e indivíduos saudáveis (grupo controle), foi realizada pelo Teste de Mann Whitney. Não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto à idade ($p= 0,271$).

Em relação aos parâmetros salivares, observou-se diferença estatisticamente significativa quanto ao sódio, cloro, potássio, pH e volume da saliva. No grupo FC os níveis de sódio, cloro, potássio e o pH encontravam-se aumentados. O volume de saliva no grupo FC foi menor que o observado no grupo controle. Os demais itens analisados não apresentaram diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação do volume, pH e parâmetros bioquímicos da saliva entre pacientes com Fibrose Cística (FC) e Grupo Controle.

Parâmetros	Pacientes FC (n=95)		Grupo Controle (n=84)		Valor p •	Correção Teste Bonferroni
	Média±DP (95%IC)	Mediana	Média±DP (95%IC)	Mediana		
Cálcio*	2.03± 0.99 (0.30 – 4.65)	1.85	2.15 ± 2.79 (0.71 – 23)	1.61	0.114	1
Glicose*	13.02 ± 18.69 (3 – 147)	8	9.25± 3.56 (3 – 20)	9.5	0.932	1
Lactato*	0.91 ± 0,89 (0.2 – 5.6)	0.7	0.81± 0.74 (0.1 – 4.3)	0.6	0.463	1
Cloro*	27.82 ± 13.47 (12 – 89)	26	18.04 ± 8.3 (8 – 43)	16	<0.001	<0,009
Volume**	0.63 ± 0.3 (0.1– 1.5)	0.6	0.8 ± 0.5 (0 – 2)	1	<0.001	<0,009
pH	6.86 ± 0.45 (6.27 – 7.8)	6.83	7.17 ± 0,44 (6.3 – 7.85)	7.2	<0.001	<0,009
Potássio*	19.66± 3.25 (10.8 – 24.8)	19.55	16.82 ± 3.22 (6.5 -24)	17.20	<0.001	<0,009
Sódio*	19.9 ± 9.3 (8 – 48)	17.5	12.26 ± 4.31 (7 – 29)	11	<0.001	<0,009
Bicarbonato*	5.53 ± 3.98 (0 – 22)	3	3.58 ± 3.98 (0 -16)	1.95	0.051	0, 459

IC - intervalo de confiança, n - número de indivíduos, DP - Desvio Padrão. * mmol/L; ** N para volume é 68 pacientes com FC e 84 indivíduos saudáveis, diferente dos outros parâmetros.

O valor-p positivo está em negrito.

A aplicação da curva ROC determinou os seguintes valores:

- para o sódio - cut-off: 13,5 mmol/L; Sensibilidade:73,4%; Especificidade:70,6%;
- para o cloreto - cut-off: 20 mmol/L; Sensibilidade:68,1%; Especificidade: 72,9%.

Gráfico 1. Curva ROC das concentrações de cloro e sódio na saliva de pacientes com FC (n=95) e Grupo controle (n=84).

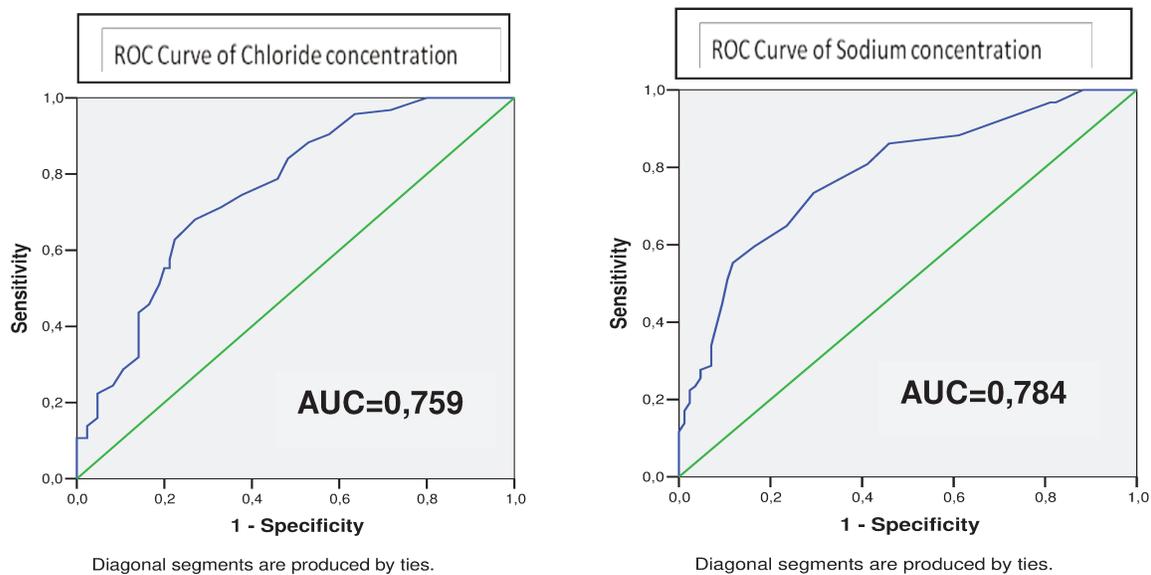
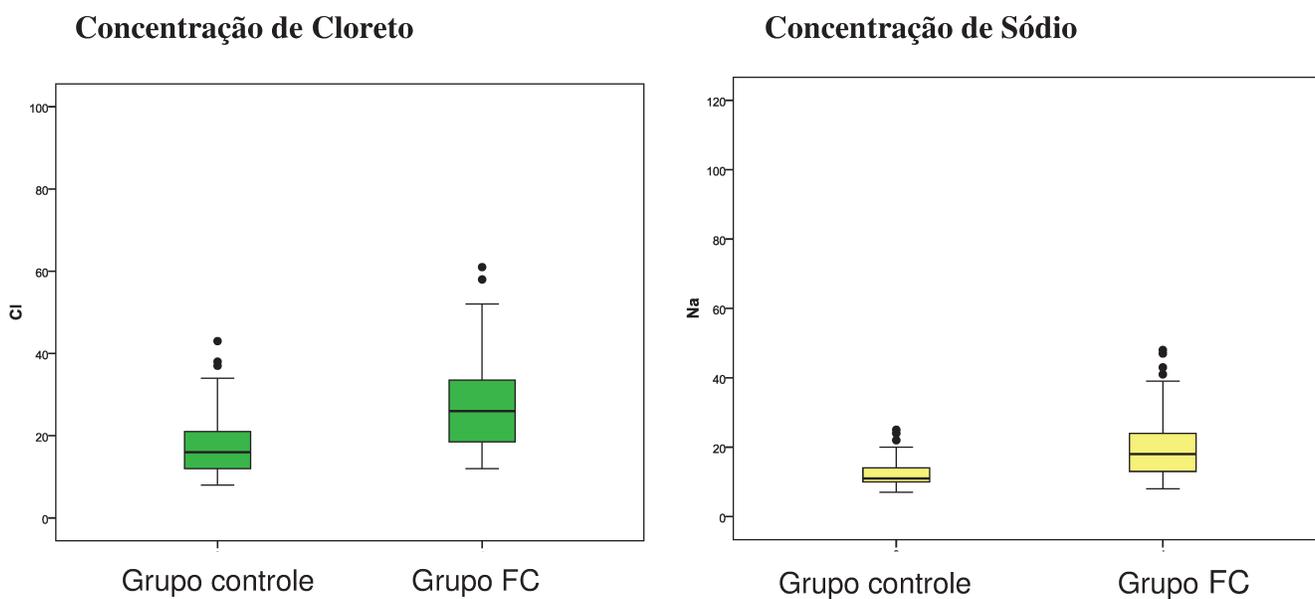


Gráfico 2. Box Plots - Diferenças das concentrações dos íons cloro e sódio na saliva, entre os grupos fibrose cística e grupo controle.



As tabelas 3 e 4 apresentam a distribuição da concentração de cloro e sódio na saliva, de acordo com o escore de Shwachman.

Tabela 3. Distribuição da concentração de cloro na saliva de pacientes com FC, segundo o escore de Shwachman-Kulczycki *.

Escore de Shwachman \ Concentração	Excelente	Bom	Leve	Moderado	Grave
Abaixo de 20 mmol/L	2	8	10	4	3
20 – 30,5 mmol/L	1	11	11	3	3
30,6 – 40,5 mmol/L	2	9	4	3	0
40,6 – 50,5 mmol/L	1	2	2	1	0
50,6 – 60,5 mmol/L	0	0	1	1	0
60,6 – 70,5 mmol/L	0	1	0	0	0
70,6 – 80,5 mmol/L	0	0	1	0	0
80,6 – 90,5 mmol/L	0	1	0	0	0

* Foram avaliados 85 pacientes, pois 2 pacientes foram a óbito, 1 interrompeu o tratamento e 7 não retornaram ao ambulatório até o final deste estudo. Cut-off do cloro:20 mmol/L

Tabela 4. Distribuição da concentração de sódio na saliva de pacientes com FC, segundo o escore de Shwachman-Kulczycki *.

Concentração \ Escore de Shwachman	Excelente	Bom	Leve	Moderado	Grave
Abaixo de 13,5 mmol/L	4	7	8	1	1
13,5 – 23,5 mmol/L	1	15	15	8	4
23,6 – 33,5 mmol/L	0	6	3	3	1
33,6 – 43,5 mmol/L	0	2	3	0	0
43,6 – 53,5 mmol/L	1	1	0	0	0
53,6 – 63,5mmol/L	0	0	0	0	0
63,6 – 73,5mmol/L	0	0	0	0	0
73,6 – 83,5 mmol/L	0	0	0	0	0
83,6 – 93,5 mmol/L	0	0	0	0	0
Acima de 93,5 mmol/L**	0	1	0	0	0

* Foram avaliados 85 pacientes, pois 2 pacientes foram a óbito, 1 interrompeu o tratamento e 7 não retornaram ao ambulatório até o final deste estudo.

** paciente apresentou concentração de 105 mmol/L

Cut-off do sódio:13,5 mmol/L

Considerando o valor mínimo para o cloro 20,5mmol/L e 13,5mmol/L para o sódio para diagnóstico da FC, podemos dizer que não houve correlação entre o escore de Shwachman e as concentrações de cloro e sódio na saliva (Tabelas 3,4 e 5).

Tabela 5. Correlação entre a gravidade da doença e as concentrações de cloro e sódio na saliva de pacientes com FC

	Spearman's	Cl	Na
SHWACHMAN	Coefficiente de Correlação	,093	,006
	P valor	,402	,960
	N	84	84

5. 2 Avaliação da Saúde Bucal

5.2.1 Avaliação dos dentes com lesões de cárie, perdidos e obturados

Foram avaliados 94 pacientes em relação às lesões de cáries, dentes perdidos e/ou obturados, índice de placa e índice gengival. A média de idade observada foi de 12,74 anos, variando entre 03 anos a 33 anos de idade. Em relação ao gênero, 45 (47,87%) pacientes pertenciam ao gênero masculino e 49 (52,12%), ao feminino. Cinquenta e sete pacientes apresentavam predomínio de dentes permanentes, sendo que nos dentes permanentes, foram diagnosticadas 28 lesões de cárie (média: 0,50 lesão por paciente), 57 dentes obturados (média 1 por paciente) e apenas 01 dente perdido.

Nos 37 pacientes onde predominou a dentição decídua, foram diagnosticadas 22 lesões de cárie (média: 0,59), 29 dentes esfoliados (média: 0,78) e 20 obturados (0,54).

Observou-se que 20 (21,27%) apresentavam lesões hipoplásicas do esmalte dental e 09 (9,57%) tinham regiões de descalcificação do esmalte dental.



Figura 6 - Lesões de hipoplasia do esmalte dental em paciente com FC.

5.2.2 Índice de placa, índice gengival e escore de Shwachman

Em relação ao índice de placa e índice gengival, observou-se que a maior prevalência foi de índices que refletiam inflamações leves. Isso pode ser verificado pelos valores tanto de IP 1, quanto de IG 1, que concentraram maior número de pacientes, sendo

respectivamente IP 1= 38 pacientes e IG 1=40 pacientes (Tabela 6). Não foi analisada a distribuição por faixa etária do índice CPOD pela limitação da casuística.

Tabela 6. Distribuição do índice de placa e índice gengival nos pacientes com FC.

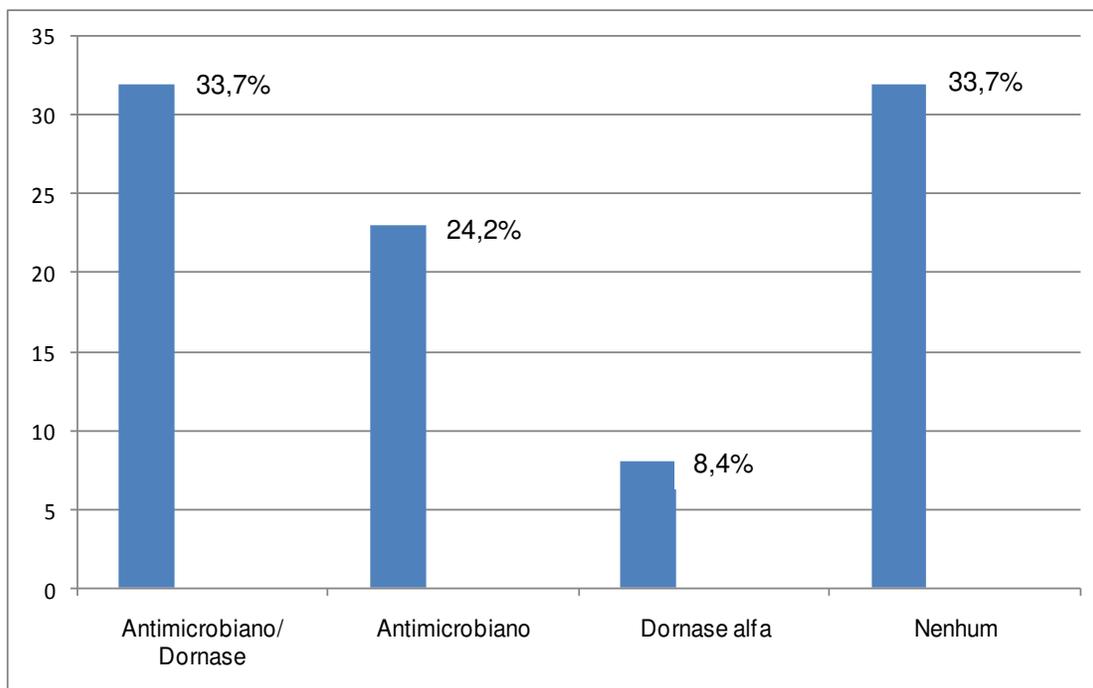
Escore IP/IG	Frequencia IP		Frequencia IG	
	N	%	N	%
0	24	25,53	31	32,98
1	38	40,42	40	42,55
2	26	27,66	18	19,15
3	06	6,39	05	5,32
Total	94	100	94	100

A Tabela 7 apresenta a distribuição do IG e IP, segundo o escore de Shwachman-Kulczycki.

Tabela 7. Distribuição dos pacientes com FC, segundo o escore de Shwachman-Kulczycki.

Escore de Shwachman	Excelente (100-86)	Bom (85-71)	Leve (70-56)	Moderado (55-41)	Grave (≤ 40)	Total
<u>Índice gengival</u>						
0	4	11	14	2	3	
1	1	15	6	5	1	
2	1	4	8	4	1	
3	1	1	1	1	1	
Total	7	31	29	12	6	85
<u>Índice de placa</u>						
0	4	9	7	3	2	
1	4	9	14	3	1	
2	0	8	6	6	2	
3	0	3	3	0	1	
Total	8	29	30	12	6	85

Grafico 3. Porcentagem de pacientes com fibrose cística (n=95) que fazem uso de antimicrobianos e dornase alfa.



Não foi observada correlação entre o IP e o uso de antimicrobianos e/ou Dornase alfa®, conforme Tabela 8.

Tabela 8. Teste de correlação do Índice de Placa e Índice Gengival com o uso crônico de Dornase alfa®, antimicrobianos e Escore de Shwachman-Kulczycki.

Spearman's		IP	IG
Dornase alfa®	Coefficiente de Correlação	,058	,180
	p valor	,577	,080
	N	94	94
Antimicrobianos	Coefficiente de Correlação	,132	,086
	p valor	,202	,408
	N	94	94
Escore de Shwachman	Coefficiente de Correlação	-,141	-,117
	p valor	,200	,288
	N	85	85

Também não foi observada correlação entre o índice de placa e o escore de Shwachman ou entre o índice de inflamação gengival e o escore de Shwachman.

5.3 Achados da microbiota bucal do material do trato respiratório.

Ao comparar os achados microbiológicos da saliva (S) dos 95 pacientes com do material colhido supostamente do trato respiratório (TR), foram identificadas, em ambas as secreções, 24 amostras com *S. aureus*, 05 com *P. aeruginosa* mucóide (PAM), 04 com *P. aeruginosa* não mucóide (PANM) e 1 paciente com identificação positiva para complexo *Burkholderia cepacia* (Tabela 9). No entanto, em 15 amostras a PAM foi isolada apenas na amostra respiratória, o mesmo acontecendo com 17 amostras com isolamento de *P. aeruginosa* não mucóide e 6 amostras com isolamento de *c B. cepacia*. O inverso (isolamento apenas na amostra de saliva), ocorreu apenas para 7 amostras de *S. aureus* e 2 de *Candida sp.*

Tabela 9. Microrganismos encontrados nas amostras de saliva e da secreção do trato respiratório dos pacientes com FC.

<i>Pacientes</i>				
Microrganismos	S+ / TR+	S- / TR+	S+ / TR-	S- / TR-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide	5	15	0	75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> não mucóide	4	17	0	74
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	30	7	34
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	1	6	0	88
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	4	0	91
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0	1	0	94
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	1	0	94
<i>Aspergillus spp</i>	0	5	0	90
<i>Candida albicans</i>	0	1	2	92

S+: presente na saliva; S-: ausente na saliva; TR+: presente no trato respiratório; TR-: ausente no trato respiratório.

6- DISCUSSÃO

Em relação ao número de dentes cariados, perdidos e obturados nos pacientes com FC, destacamos que o CPO-D(dentes cariados, perdidos e obturados) é um índice utilizado em levantamentos epidemiológicos de saúde bucal para medir o impacto da doença cárie sobre a dentição. É um índice recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para medir e comparar a experiência de cárie dentária em populações, seu valor expressa a média de dentes cariados, perdidos e obturados em um grupo de indivíduos (Cypriano et al., 2005). Segundo o último CPO-D realizado em 2003, na idade-índice de 12 anos, idade considerada estratégica pela OMS (WHO, 1997), o índice CPO-D foi classificado como 2,8 (moderada), sendo que em 1980 e 1986, os níveis de cárie foram classificados, como “altos” (valores de CPO-D superiores a 4,4) (WHO, 2003).

A correta utilização do índice de CPO-D deve levar em conta os limites de idade pré-definidos, que variam de 12 a 18 anos. Antes dos 12 anos, ocorre o predomínio da dentição decídua, sendo indicada a utilização do CEO-D (dentes cariados, esfoliados e obturados) e após os 18 anos, fatores como desgaste dentário, hormonais e nutricionais interferem na aferição do CPO-D.

Em nossa casuística, tanto na faixa etária abaixo dos 12 anos quanto nas idades entre 12 e 18 anos, não houve número suficiente de pacientes para aplicação dos referidos índices.

Embora não tenhamos aplicado os índices CPO-D e CEO-D, ao observar a média de lesões de cárie na população de pacientes com FC deste estudo verifica-se baixa prevalência de cárie. Os dentes obturados também apresentaram baixa prevalência na população estudada. Esses resultados estão em acordo com Narang et al. (2003), que identificaram menor prevalência de cárie em crianças com FC quando comparadas com indivíduos do grupo controle.

Jagels & Sweeney (1975) avaliaram 63 pacientes com FC que faziam uso contínuo de antibióticos e observaram prevalência de cárie reduzida em comparação com 56 de seus irmãos. Primosch e colaboradores (1978, 1980) avaliaram 86 pacientes com FC e

relataram menor prevalência de cárie nestes pacientes quando comparados com sujeitos do grupo controle, pareados por idade e sexo.

Kinirons e colaboradores (1989) avaliaram 131 pacientes com FC e compararam a prevalência de cárie com um grupo controle com as mesmas características de idade. Observou-se que embora os pacientes com FC apresentassem menor percentual de dentes cariados, essa diferença só era significativa para a dentição decídua.

Embora alguns estudos demonstrem menor prevalência de cárie em pacientes com FC, Martens e colaboradores (2001) não observaram diferença estatisticamente significativa em relação ao número de cárie ao examinar 37 pacientes, de 6 a 38 anos, com FC e um grupo controle pareado por idade e sexo.

Para os estudos que apresentaram menor prevalência de lesões de cárie em pacientes com FC, uma das possíveis explicações é que o uso contínuo de antimicrobianos neste perfil de pacientes interfere no desenvolvimento de cáries (Narang et al., 2003). De acordo com essa linha de raciocínio, os antimicrobianos utilizados pelos pacientes com FC, teriam ação também sobre alguns microorganismos presentes na cavidade oral e relacionados com a patogênese da cárie. Além disso, segundo os autores, pacientes com FC e seus familiares tendem a ser mais motivados e mais conscientes da necessidade de manutenção da saúde como um todo, embora essas evidências sejam limitadas.

Sweeney & Shaw (1965) afirmaram que enzimas pancreáticas de substituição reduzem o risco de desenvolver lesões de cárie. No entanto, como a etiologia da cárie dentária é multifatorial, outros aspectos devem ser considerados. Alterações salivares, incluindo o pH e capacidade de tamponamento, têm sido associados à alteração experiência de cárie e alguns estudos de pacientes com fibrose cística têm equiparado a redução da prevalência de cárie observada a variações anatômicas dos dentes, que podem predispor-los a um risco menor (Primosch & Brearley, 1978; Kinirons, 1983).

Outro aspecto a ser considerado sobre a condição dentária é a presença de defeitos do esmalte. Historicamente, indivíduos com FC apresentam alta prevalência de descoloração

dos dentes e hipoplasia do esmalte associados com a terapia com tetraciclina em função das infecções respiratórias (Arquitt et al., 2002).

Narang et al. (2003) e Azevedo et al. (2006) observaram que defeitos de esmalte e opacidades do esmalte dental são mais comuns em pacientes com FC, quando comparados com um grupo controle. Os autores concluíram que a opacidade do esmalte teve maior prevalência no grupo FC do que os defeitos do esmalte dental quando comparados com grupo controle.

Apesar de nosso estudo ter demonstrado uma baixa frequência de defeitos e opacidades do esmalte dental, a ausência de um grupo controle composto por indivíduos saudáveis não nos permite de fazer comparações em relação à população sem a doença.

Em relação à avaliação da correlação do IP e IG com o escore de Shwachman e o uso crônico de antimicrobianos e Dornase alfa, salientamos que Dornase alfa é uma enzima que cliva seletivamente o DNA, proveniente da lise de neutrófilos que é responsável pelo espessamento das secreções. A Dornase alfa hidrolisa o DNA presente na expectoração/ muco de doentes de fibrose cística reduzindo a viscosidade do muco nos pulmões. Esta enzima não age somente nos pulmões e após a inalação oral da medicação, 98% dos nossos pacientes não fazem a higienização bucal (escova os dentes e língua), de modo que os resíduos da medicação ficam na língua. Isso nos conduz a hipótese de que a Dornase alfa torne a gengiva vulnerável à inflamação gengival. Em esse estudo não houve correlação do IP e IG com o uso de Dornase alfa, antimicrobianos ou Escore de Shwachman. Na literatura consultada não foi encontrado nenhum artigo que avaliasse a associação entre IP e IG com o escore de Shwachman, uso crônico de antimicrobianos e Dornase alfa que permitisse a comparação de nossos resultados.

Também não foram encontrados estudos que avaliassem especificamente o IP e IG em pacientes com FC. Alguns autores (Jagels & Sweeney, 1964; Wotman et al., 1973; Blachard, 1977) avaliaram a condição periodontal nesta população, no entanto o enfoque foi principalmente, a presença de cálculo dental, variável que não foi analisada no presente estudo.

Assim como o uso contínuo de antimicrobianos causa a diminuição da incidência de lesões de cárie em pacientes com FC (Narang et al., 2003), supomos que o uso contínuo desses medicamentos cause um desequilíbrio na microbiota oral, provocando alterações na condição gengival. No entanto, não é possível comprovar tal afirmação, pois não foram avaliados neste estudo microrganismos específicos da gengiva e sulco gengival.

Na FC as concentrações de íons sódio e cloreto no suor e saliva são alteradas, sendo o teste do suor um “gold standard” para o diagnóstico de FC, mas existem diversos problemas associados com esta análise, tais como: (i) falta de equipamento, (ii) alto custo, (iii) falta de profissionais especialistas, (iv) dificuldade de coleta, (v) as dosagens de cloreto e de sódio no suor não são realizadas com o mesmo método e ao mesmo tempo. Neste contexto, existe a necessidade de um recurso alternativo para diagnóstico da FC, que possam superar pelo menos algumas dessas dificuldades.

Segundo Pfaffe e colaboradores (2011), a revisão de estudos anteriores sobre a composição salivar, particularmente, das concentrações de sódio e cloreto, sugere que esta abordagem pode ser utilizada como um método para o diagnóstico da FC. Os resultados relatados na literatura são de difícil comparação, pelas seguintes razões: (i) diferem os métodos utilizados para a coleta de saliva e determinação da concentração de iônica, (ii) diferentes critérios são aplicados para inclusão de pacientes, e (iii) são pequenas as populações estudadas.

Estudos anteriores (Anexo V) sobre a avaliação do perfil salivar, especialmente em relação às concentrações de sódio e cloro, em pacientes com FC, nos permitiram levantar a hipótese de que esse método poderia ser utilizado como uma ferramenta para o diagnóstico da FC.

O presente estudo compreendeu uma população maior, em comparação com os anteriores e a pela utilização inédita do equipamento de gasometria para avaliar parâmetros bioquímicos da saliva pela técnica de eletrodo íon seletivo.

Em três estudos, foi utilizada espectrometria de absorção atômica para medir os parâmetros bioquímicos. Jimenez-Reyes & Sanchez-Aguirre (1996), avaliaram os níveis de

cloro e sódio na saliva de nove pacientes com FC e 09 indivíduos saudáveis e encontraram diferenças entre os grupos, com um aumento na concentração de sódio no grupo FC, como observado em nosso estudo. Blomfield et al. (1973), também utilizou espectrometria de absorção atômica para a avaliação de saliva. Depois de utilizar 10% de ácido cítrico para estimular produção de saliva em 63 indivíduos (35 com FC), os autores observaram diferenças estatisticamente significativas para o cloreto e o sódio, como também aqui relatados.

Além disso, de acordo com as nossas observações, em estudos realizados por Marmar et al. (1966) e Blomfield et al. (1973), a concentração de cloreto na saliva foi mais elevada nos pacientes com FC, em comparação com indivíduos saudáveis.

Chernick et al. (1961), avaliaram a saliva de 24 indivíduos divididos em dois grupos: FC pacientes (n = 12) e indivíduos saudáveis (n = 12). Os níveis de sódio e de potássio foram analisados pela da técnica de fotometria de chama, e a concentração de cloreto de titulação. Os pacientes com FC tinham níveis mais baixos de sódio e cloro, em contraste com os resultados obtidos em nosso estudo. No entanto, o nível de potássio no grupo FC foi maior do que no grupo controle, dessa forma concordando com os nossos resultados.

É importante ressaltar que no presente estudo não foi utilizado estímulo químico para o fluxo de saliva, em contraste com maioria dos estudos sobre os parâmetros salivares em pacientes com FC. O uso de estímulo químico pode alterar o volume, o pH, e os parâmetros bioquímicos da saliva.

De acordo com Catalán et al. (2010), estudos realizados para avaliar o efeito da FC no funcionamento das glândulas salivares produziram resultados conflitantes.

Blomfield et al. (1973 e 1976) demonstraram que a FC não teve nenhuma influência sobre o fluxo salivar dos pacientes.

Marmar et al. (1966), na avaliação de 12 pacientes com FC e 13 crianças saudáveis, verificou que o volume de saliva foi maior em pacientes com FC em todos os tempos depois da estimulação salivar.

Kollberg e seus colaboradores, em 1982, avaliaram nove pacientes com FC e 11 indivíduos controle e observaram a redução do fluxo salivar em pacientes com FC.

Ceder et al. (1985), avaliaram 12 pacientes, idade 8-16 anos, antes e após estimulação com 2% ácido cítrico. Os autores observaram uma redução no salivar fluxo de pacientes com FC, quando comparado com o controle grupo, tanto antes como após a estimulação salivar. Nestes estudos, os autores concluíram que os resultados sugerem um defeito primário relacionada com a doença devido à destruição do parênquima glandular.

Pedersen e seus colaboradores em 2002, em uma revisão da literatura sobre as funções salivares, relacionaram a hipossalivação com várias causas incluindo medicamentos, doença auto-imune, doenças endócrinas, doenças genéticas (incluindo FC), desnutrição e infecção.

Embora os estudos anteriores sobre fluxo salivar na FC tenham mostrado alguns resultados contraditórios, deve-se considerar que nestes estudos, o número de indivíduos foi muito pequeno para tirar conclusões decisivas sobre o assunto. Nossos resultados apresentam a maior casuística entre todos os trabalhos sobre o tema e sugerem a hipossalivação, concordante com os resultados de dois entre quatro estudos (Kollberg et al., 1982, Ceder et al., 1985).

Em nosso estudo, a média do pH salivar de pacientes com FC foi mais baixa do que o de indivíduos saudáveis, mas não foi possível encontrar na literatura outro estudo considerando o pH da saliva de pacientes com FC.

A partir de 1996 não foram mais realizados estudos sobre a saliva em busca de uma ferramenta diagnóstica alternativa de FC.

Quanto às limitações deste estudo, existe a princípio, dificuldade para a obtenção de saliva de crianças menores de 07 anos de idade. No entanto, como mencionado anteriormente, enfatizamos que a coleta de saliva é uma forma segura em relação a riscos ao paciente, um método não-invasivo, não requerendo punção, podendo ser coletada repetidamente sem causar grande desconforto, sendo uma técnica simples e de baixo custo (Mandel, 1990). Alguns parâmetros bioquímicos da saliva, tais como potássio, cloreto, sódio,

pH e volume parecem ser influenciadas pela FC. Como o teste do suor para ser considerado padrão de referência teve seu método padronizado, serão necessários mais estudos para confirmar a real utilidade da avaliação dos parâmetros salivares como método complementar para o diagnóstico desta doença. Embora os resultados obtidos sugiram que a composição da saliva seja um possível recurso para diagnóstico da FC, estudos adicionais devem ser realizados para avaliar esta hipótese, com casuística significativa tanto de casos como de controles, padronização de coleta, método de dosagem de parâmetros bioquímicos padronizados e validados para saliva, entre outros.

De acordo com nossos resultados não houve correlação entre a gravidade da doença (escore de Shwachman- Kulczycki) e as concentrações de Cl^- e Na^+ na saliva de pacientes com FC.

A participação do CFTR e do canal de sódio nos ductos das glândulas salivares foi demonstrada em camundongos homozigóticos para a mutação F508del (Catalán et al., 2010) e, portanto é provável que esses canais possuam um papel semelhante na absorção iônica nos ductos das glândulas salivares, como aquele observado nas glândulas sudoríparas.

No suor de pacientes com FC, a concentração de Cl^- é a medida que pode estar diretamente relacionada com a função do CFTR (Rommens et al., 1989; Riordan et al., 1989). Quando a concentração dos íons Cl^- e Na^+ no suor são comparadas entre populações com FC e indivíduos saudáveis o cloreto mostra consistentemente concentrações maiores em relação ao sódio (Green et al., 1985; Kirk et al., 1992; Green et al., 2006), o oposto dos resultados observados em nosso estudo para a saliva.

A variabilidade da gravidade da FC está associada principalmente a fatores genéticos, tais como genes modificadores e classes de mutações do gene *CFTR*, bem como a fatores ambientais (Collaco et al., 2010; Drumm et al., 2012). A mutação F508del é uma mutação classe II (que resulta em proteínas CFTR dobradas/processadas incorretamente) e está associada à maior gravidade clínica da FC (Drumm et al., 2012).

Quando verificamos se a gravidade da FC (expressa neste estudo pelo escore de Shwachman) influenciou nas concentrações de Cl^- e Na^+ na saliva, observamos que em nossa

casuística as concentrações de Cl^- e Na^+ na saliva com o escore clínico de shwachman, avaliada pelo teste de correlação pelo coeficiente de Spearman não evidenciou correlação.

Na literatura consultada não encontramos nenhum estudo fazendo essa associação, o que não nos permite comparações.

Na avaliação da microbiota da saliva com o material do trato respiratório, devemos considerar que as bactérias que colonizam cronicamente os pulmões, tanto de pacientes com FC como outras doenças pulmonares crônicas, podem retornar ao TRS pela tosse e expectoração, sendo, em geral transitórias na orofaringe e, portanto na saliva. Nas sinusopatias agudas e crônicas, que também são frequentes nos pacientes com FC, agentes infecciosos responsáveis por estes processos podem estar presentes na orofaringe e saliva. É esperado que os patógenos pulmonares possam ser mais facilmente detectados em amostras respiratórias que na saliva, em consequência do escarro ser mais concentrado nestes agentes. Nossos achados mostraram que a microbiota da saliva, avaliada pela técnica que se utiliza a amostra de 10 microlitros, não apresenta boa relação com a presença de patógenos pulmonares crônicos e relevantes como a *P. aeruginosa* e *c. B. cepacia* e não deve ser utilizada para este fim. As amostras onde o *S. aureus* e a *Candida sp* foram isolados apenas na amostra de saliva, uma possível explicação seria a existência destes microrganismos apenas em orofaringe e não na amostra respiratória e/ou que tenham sido inibidos ou diluídos frente à presença de outros patógenos como a *P. aeruginosa*. Na literatura consultada não encontramos nenhum estudo sobre microbiota da saliva associado com o material de origem pulmonar.

7- CONCLUSÕES

Quantificação de dentes com lesões de cárie, perdidos e obturados em pacientes com FC.

Observou-se incidência de lesões de cárie em pacientes com FC e quantidade significativa de defeitos de esmalte.

Avaliação do IP e IG e a associação com o escore de Shwachman, uso crônico de antimicrobianos e Dornase alfa® em pacientes com FC.

Não houve correlação entre IP e IG e escore de Shwachman e entre e IP e IG e uso de Dornase Alfa e uso crônico de antimicrobianos.

Correlação da gravidade da doença com as concentrações de Cl^- e Na^+ na saliva de pacientes com FC.

Não houve correlação entre as concentrações de Cl^- e Na^+ na saliva com o Escore Clínico de Shwachman.

Comparação do o volume, pH e os níveis de cloreto, sódio, potássio, bicarbonato, glicose, lactato e cálcio da saliva de indivíduos com FC com a de indivíduos saudáveis.

No grupo FC os níveis de sódio, cloro, potássio e o pH encontraram-se aumentados. O volume de saliva no grupo FC foi menor que o observado no grupo controle. Para os demais parâmetros avaliados, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Avaliação da microbiota da saliva com o material do trato respiratório de pacientes com FC,

A saliva não apresenta relação com a presença de patógenos pulmonares crônicos e relevantes como a *P. aeruginosa* e *c. B. cepacia* e não deve ser utilizada para este fim.

8- REFERÊNCIAS

Alves C, Andion J, Brandão M, Menezes R. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao Diabetes Melito. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2007 51 (7): 1050-105.

Aps JKM, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Science International* 2005 (150) 119–131.

Aps JKM, Delanghe J, Martens LC. Salivary electrolyte concentrations are associated with cystic fibrosis transmembrane regulator genotypes, *Clin Chem Lab Med* 2002 (40) 345–350.

Arquitt CK, Boyd C, Wright JT. Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Gene (CFTR) is associated with abnormal enamel formation. *J Dent Res* 2002; 81 (7): 4924-96.

Arrow P. Risk factors in the occurrence of enamel defects of the first permanent molars among schoolchildren in Western Australia. *Community Dent Oral Epidemiol* 2009; 37: 405-15.

Ashlock MA, Olson ER. Therapeutics development for cystic fibrosis: a successful model for a multisystem genetic disease. *Annu Rev Med* 2011; 62:107-25.

Azevedo TDPL, Feijó GCS, Bezerra ACB. Presence of developmental defects of enamel in cystic fibrosis patients. *Journal of dentistry for children* 2006; 73 (3):159-163.

Barth LR. Perfil microbiológico e indicadores de gravidade em pacientes com fibrose cística. [thesis]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Batista LRV, Moreira EAM, Corso ACT. Alimentação, estado nutricional e condição bucal da criança. *Rev Nutr* 2007; 20:191-6.

Beikler T, Flemmig TF. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. *Periodontology* 2011; 55(1): 87-103.

Blacharsh C. Dental aspects of patients with cystic fibrosis: a preliminary study. *J Am Dent Assoc* 1977; 95:106–10.

Blinkhorn AS. Fatores que afetam a adesão dos doentes com esquemas de prevenção odontológica. *Int. Dent J* 1993; 43(1): 294-298.

Blomfield J, Warton KL, Brown JM: Flow rate and inorganic components of submandibular saliva in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1973; 48(4):267-274.

Blomfield J, Rush AR, Allars HM, Brown JM: Parotid gland function in children with cystic fibrosis and child control subjects. *Pediatr Res* 1976; 10 (6):574-578.

Bonadia LC. Correlação entre aspectos clínicos, moleculares e fisiológicos de pacientes adultos com hipótese diagnóstica de fibrose cística de um centro de referência no Brasil [thesis]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2011.

Boucher RC, MJ Stutts, Knowles MR, Cantley L, Gatzky JT. Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest* 1986; 78(5):1245–1252.

Brandão IMG. Avaliação do conhecimento e de atitudes relacionadas à saúde bucal: gestantes dos Centros Municipais de Saúde de Araraquara - SP. 1998. [Dissertação]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara; 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003. Resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

Catalán MA, Nakamoto T, Gonzalez-Begne M, Camden JM, Wall SM, Clarke LL, Melvin JE. Cftr and ENaC ion channels mediate NaCl absorption in the mouse submandibular gland. *J Physiol* 2010; 588 (4):713-24.

Ceder O, van Dijken J, Ericson T, Kollberg H. Ribonuclease in different types of saliva from cystic fibrosis patients. *Acta Paediatr Scand* 1985; 74(1):102-6.

Chernick WS, Barbero GJ, Parkins FM: Studies on submaxillary saliva in cystic fibrosis. *J Pediatr* 1961; 59(6): 890–898.

Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, de Palo RF. Saliva specimen: new laboratory for tool diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 2007; 383 (1-21): 30-40.

Collaco JM, Blackman SM, McGready J, Naughton KM, Cutting GR. Quantification of the relative contribution of environmental and genetic factors to variation in cystic fibrosis lung function. *J Pediatr* 2010; 157(5): 802-7.

Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. Minireview. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39 (10): 3427–3436.

Coenye T. Infecções novas e emergentes no trato respiratório de pessoas com fibrose cística. [acesso em 2013 Set]; Disponível em: <http://www.cfww.org/pub/portuguese/cfwnl/>. Publicado em: 2003.

Cypriano S, Sousa MDAL, Wada RS. Avaliação de índices CPOD simplificados em levantamentos epidemiológicos de caries dentária. *Rev Saúde Pública* 2005; 39(2): 285-92.

Davies A; Blakeley AGH, Kidd C. *Fisiologia humana*. Ed.Artmed, 2002. p.814.

Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(5):475-82.

Di Sant'Agnesse PA, Darling RC, Perara GA, Shea E: Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Am J Dis Child* 1953; 86(5):618–619.

Donaldson SH, Boucher R. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9:486–491.

Domejean-Orliaguet S, Gansky SA, Featherstone JD. Caries risk assessment in an educational environment. *Journal of Dental Education* 2006; 70 (12): 1346–1354.

Doring G, Conway SP, Heijennan HGM, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 2000; 16 (4): 749-767.

Drăghici S: Data analysis tools for DNA microarrays. New York: Chapman & Hall/CRC; 2003.

Drumm ML, Ziady AG, Davis PB. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2012; 7:267-82.

Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J* 1992; 172: 305-312.

Faul F, Erdfelde E, Lang AG, Buchner A: G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007; 39:175–191.

Fejerskov O, Manji F, Baelum V, Moller I.J. Fluorose dentária: um manual para profissionais da saúde. São Paulo: Santos; 1994.

Fejerskov O & Kidd E. Cárie Dentária – A doença e seu Tratamento Clínico. São Paulo: Livraria Editora Santos Ltda; 2005.

Figueiroa-Gordon M & Acevedo AM. Microbiología de la Dentina Cariada en Humanos. Acta Odontol Venez 2008; 46(2): 234-239.

Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J Am Dent Assoc 1960; 61: 9-19.

Ford D, Seow WK, Kazoullis S, Holcombe T, Newman B. A controlled study of risk factors for enamel hypoplasia in the permanent dentition. Pediatr Dent 2009; 31: 382-8.

Fritz ME, Caplan DB, Leever D, Levitt J: Composition of parotid saliva on different days in patients with cystic fibrosis. Am J Dis Child 1972; 123(2):116–117.

Garone Netto N et al. Introdução à dentística restauradora. 1^a ed. São Paulo: Artes Médicas; 2003.

Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. Pediatrics 1959; 23:545-9.

Gilligan, PH. Microbiology of Airway Disease in Patients with Cystic Fibrosis. Clin Microbiol Rev 1991; 1(4): 35-51.

Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD. Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Laboratory (Cumitech), Cystic Fibrosis Microbiology. Washington: American Society for Microbiology; 2006.

Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, Totan C, Miricescu D, Radulescu R. Saliva-a diagnostic window to the body, both in health and in disease. J Med Life 2009; 2(2):124-32.

Green A, Dodds P, Pennock C. A study of sweat sodium and chloride, criteria for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem* 1985; 22:171-6.

Green A, Fahie-Wilson MN, Kirk JM, Wallis CE, Weller P. Guidelines for the Performance of the Sweat Test for the Investigation of Cystic Fibrosis in the UK; 2006.

Guergolette RP, Dezam CC, Frossard WTG, Ferreira FBA, Cerci Neto A, Fernandes KBP. Prevalência de defeitos do desenvolvimento do esmalte dentário em crianças e adolescentes com asma. *J Bras Pneumol* 2009; 35: 295-300.

Gutmann JL et al. Identify and define all diagnostic terms for periapical periradicular health and disease States. *Journal of Endodontics* 2009; 35 (12):1658–1674.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

Hanser-Ducatti C, Puppim-Rontani RM, Bastos HD, Carvalho LR. Relação entre estado nutricional e alterações do esmalte dental em escolares de Botucatu – SP. *Cienc Odontol Bras* 2004; 7: 84-92.

Herring ME, Shah SK. Periodontal disease and control of diabetes mellitus. *J Am Osteopath Assoc* 2006; 106:416-21.

Hoffmann RHS, Sousa MLR, Cypriano S. Prevalence of enamel defects and the relationship to dental caries in deciduous and permanent dentition in Indaiatuba, São Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2007; 23(2):435-444.

Jagels A, Sweeney EA. Oral health of patients with cystic fibrosis and their siblings. *J Dent Res* 1975; 55:991–5.

Jälevik B, Norén JG, Klingberg G, Barregård L. Etiologic factors influencing the prevalence of demarcated opacities in permanent first molars in a group of Swedish children. *Eur J Oral Sci* 2001; 109: 230-4.

Jimenez-Reyes M, Sanchez-Aguirre JF. Sodium and chloride concentrations in mixed saliva. *Appl Radiat Isot* 1996; 47(3): 273-77.

Johnson LR. *Gastrointestinal physiology. Capitulo 7- Salivary secretion. 5^a ed.USA Elsevier, 1997, 59-67.*

Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis – a review. *J Clin Periodontol* 2000; 27 (7): 453-65.

Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. “Gum bug leave my heart alone”- Epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res* 2010; 89:879–902.

Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch. Oral Biol* 1960; (1): 304-320.

Keyes PH. Recent advances in dental research: bacteriology. *Int Dent J* 1962; 12(4):443-464.

Kinirons MJ. Increased salivary buffering in association with a low caries experience in children suffering from cystic fibrosis. *J Dent Res* 1983; 62:815–17.

Kinirons MJ. Dental health of patients suffering from cystic fibrosis in Northern Ireland. *Community Dent Health* 1989; 6:113–20.

Kirk JM, Keston M, McIntosh I, Al Essa S. Variation of sweat sodium and chloride with age in cystic fibrosis and normal populations: further investigations in equivocal cases. *Ann Clin Biochem* 1992; 29:145-52.

Kiska DL, Riddell SW. Practical laboratory aspects of Cystic Fibrosis microbiology: an Update Part I. Clin Microbiol Newslett 2012; 34(5):35-41.

Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzky JT, Boucher RC. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. Science 1983; 221(4615):1067-70.

Kollberg H, Danielsson A, Glitterstam K, Henriksson R, Marklund S: Studies on parotid saliva in cystic fibrosis. Acta Paediatr Scand 1982; 71(2):321–322.

Koneman EW, Alen SD, Janda WM, Schrenkenberger PC, Winn Jr WC. Nonfermentative gram-negative bacili, chapter 5. In: Diagnostic Microbiology - Color atlas and textbook. 6th ed. Lippincott, 2006.

Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: Noninvasive diagnostic of disease and monitoring of general Health. J Can Dent Assoc 2002; 68 (3): 170-74.

Lawson D, Saggars BA, Chapman MJ: Screening for Cystic Fibrosis by measurement of Unstimulated Parotid Saliva Sodium Levels. Arch Dis Childh 1967; 42(226):689–690.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica. 4ª ed. São Paulo: Sarvier; 2006.

Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol, 2010; 23:299-323.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clinical Microbiology Reviews 2002; 15(2): 194-222.

Löesche WJ. Cárie dental. Uma infecção tratável. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993.

López ME, Colloca ME, Paez RG, Schallmach JN, Koss MA, Chervonagura A. Salivary characteristics of diabetic children. *Braz Dent J* 2003; 14(1):26-31.

Lutz L, Paris F, Vieira MI, Marques E, Barth L. Bacteriologia da fibrose cística. *Rev HCPA* 2011; 31(2):168-184.

Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. *J Oral Pathol Med* 1990; 19 (3): 119-25.

Mantovani RP, Yano T, Levy CE. A heat-stable cytotoxic factor produced by *Achromobacter xylosoxidans* isolated from Brazilian patients with CF is associated with in vitro increased proinflammatory cytokines. *Journal of Cystic Fibrosis* 2012; 4 (11): 305-311.

Maringoni RL et al. A secreção eletrolítica da saliva. *Rev Paul Med* 1991; 109(6): 278-83.

Marmar J, Barbero GJ, Sibinga MS: The pattern of parotid gland secretion in cystic fibrosis of the pancreas. *Gastroenterology* 1966; 50(4):551–556.

Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro MAGO, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol.* 2013; 39(3):306-316.

Martens LC, Aps JKM, Van Maele GOG. Is oral health at risk in people with cystic fibrosis? *Eur J Paediatr Dent* 2001; 2:21–7.

Martins-Gomes AM et al. A study some parameters in stimulated saliva from adolescents with dental fluorosis. *J Oral Sci* 2001; 43(4): 225-31.

Miller MB, Gilligan PH. Laboratory aspects of management chronic pulmonary infections in patient with Cystic Fibrosis. *J clinical Microbiol* 2003; 41(9): 4009-4015.

Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev* 2005; 26:135-153.

Mishra A, Greaves R, Massie J. The limitations of sweat electrolyte reference intervals for the diagnosis of cystic fibrosis: a systematic review. *Clin Biochem Rev* 2007; 28:60-76.

Moura SAB, Medeiros AMC, Costa FRH, Moraes PH, Oliveira Filho AS. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2007; 7 (2): 187-94.

Narang A, Maguire A, Nunn J H, Bush A. Oral health and related factors in cystic fibrosis and other chronic respiratory disorders. *Archives of Disease in Childhood* 2003; 88:702-707.

Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis* 2002; 8(3):117-29.

Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C: Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin Chem* 2011; 57(5): 675–687.

Primosch RE, Brearley L. Dental caries experience in patients with cystic fibrosis. *J Dent Res* 1978; 57:150.

Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 1983; 301(5899):421-2.

Reddy MM, Quinton PM. Cytosolic potassium controls CFTR deactivation in human sweat duct. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291: C122–C129.

Ren CL et al. Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. *Pediatr Pulmonology*, 2007. (45): 513-518

Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 701-726.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning & characterisation of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066-73.

Ribeiro JD, Ribeiro MAGO, Ribeiro AF. Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. *J Pediatr* 2002, 78 (2): S171-S86.

Ribeiro AF, Ribeiro JD. Fibrose cística (224). In: Lopes AC. *Tratado de Clínica Médica*. Volume II. Rio de Janeiro: Editora ROCA, 2005.

Ribeiro AF, Ribeiro JD, Ribeiro MAGO. Fibrose cística. In: LOPES, AC. *Tratado de clínica médica* 2 Ed. São Paulo: Roca, 2009.

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245:1059-65.

Ross MH. *Histologia: texto e atlas*. 2ª ed São Paulo: Panamericana; 1993.

Rugg-Gun AJ, Al-Mohammadi SM, Butler TJ. Malnutrition and developmental defects of enamel in 2-to-6-year-old Saudi boys. *Caries Res* 1998; 32: 181-192.

Santos PA, Rodrigues JA, Garcia PPNS. Avaliação do conhecimento dos professores do ensino fundamental de escolas particulares sobre saúde bucal. *Rev Odonto UNESP* 2002; 31 (2):205-214.

Santos CIS, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Hessel G. Análise crítica dos escores de avaliação de gravidade da fibrose cística: Estado da arte. *J Brasileiro Pneumologia* 2004; 30(3):286-298.

Schwartz SS, Zhu WX, Sreebny LM. Sodium Dodecil sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of Human whole saliva. Arch Oral Biol 1995; 40(10): 949-58.

Schosield D, Cotran RS. Doenças perinatais da infância. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins Pathologic Basis of Disease. 5^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 1996. 381-413.

Scully, C. Salivary glands and saliva. Oral Disease 2003; 9: 165-176.

Seow KW. Clinical diagnosis of enamel defects: pitfalls and practical guidelines. Int Dent J 1997; 47:173-82.

Shwachmann H, Kulczychi LL. Long term study of one hundred five patients with cystic fibrosis. Am J Dis Child 1958; 96: 06-15.

Sólis MSN, Torres JFM, Martínez IM, Sellés FP. Lung transplantation and the development of diabetes mellitus in adult patients with cystic fibrosis. [acesso em 2009 Apr]; 43(2):86-91. Disponível em: <http://www.archbronconeumol.org/cgi-bin/>

SPSS 17.0 for Windows (computer program). Statistical Package for Social Science (SPSS). Release Version 17.0.1. Chicago (IL): SPSS. Incorporation; 2011. Available from: [http:// www.spss.com](http://www.spss.com)

Steven M, Rowe MD, Stanley MBS , Sorscher MD. Cystic Fibrosis – Mechanism of Diseases. The New England Journal of Medicine 2005; 352: 1992 – 2001.

Sweeney EA, Shaw JA. The effect of dietary pancreatic supplements on dental caries and the composition of saliva in caries susceptible rats. J Dent Res 1965; 44:973–6.

Thylstrup, A. & Fejerskov, O. Cariologia clínica. 2^aed. São Paulo: Ed. Santos; 2001.

Thylstrup, A. Tratado de cariologia: Cultura médica. Rio de Janeiro: Cultura médica; 1988.

Wiesmann UN, Boat TF, di Sant'Agnesse PA: Sodium concentration in unstimulated parotid saliva and on oral mucosa in normal subjects and in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1970; 76 (3): 444–448.

Wolinsky LE. Cárie dental. In: Nisengard R J. *Microbiologia oral e imunologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

World Health Organization. *Oral health surveys: basic methods*. 4th Ed. Geneva: World Health Organization; 1997.

World Health Organization. *The World Oral Health Report 2003. Continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme*. Geneva: WHO; 2003.

Wotman S, Mercadante J, Mandel I, et al. The occurrence of calculus in normal children with cystic fibrosis and children with asthma. *J Periodontol* 1973; 44:278–80.

Yarat A, Tunali T, Pisiriciler R, Akyuz S, Ipbuker A, Emekli N. Salivary thromboplastic activity in diabetics and healthy controls. *Clin Oral Investig* 2004; 8(1): 36-39.

Zambon JJ, Nisengard RJ. Pseudomonadaceae. In: Nisengard R J. *Microbiologia oral e imunologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. 166-168.

Zielenski J. Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Respiration* 2000; 67: 117-133.

8- ANEXOS

ANEXO 1

Escore Clínico de Shwachman & Kulczycki

Pontuação	Atividade Geral	Pontuação	Achados Radiológicos
25	Atividade normal plena: joga bola; vai à escola normalmente.	25	Campos Pulmonares limpos.
20	Falta Resistência e cansa ao final do dia; boa frequência escolar	20	Mínimas Marcas de acentuação broncovascular; enfisema primário.
15	Descansa voluntariamente durante o dia; cansa facilmente após o exercício.	15	Enfisema leve; sinais de atelectasias; marcas de aumento broncovascular.
10	Repousa muito; dispnéia depois de caminhada curta.	10	Enfisema moderado; áreas de atelectasias difusas com áreas de infecção sobrepostas.
5	Ortopnéia; confinado à cama ou cadeira.	5	Extensivas alterações com fenômeno pulmonar obstrutivo e infecção; atelectasias lobares e bronquiectasias.
25	Mantém peso e altura próximo do percentil 25; bom tônus e massa muscular; fezes bem formadas (quase normais).	25	Normal: sem tosse; FC e FR normais; pulmões limpos; boa postura.
20	Peso e altura aproximadamente no percentil de 15 a 20; fezes levemente anormais; tônus e massa muscular satisfatórios.	20	Tosse rara ou "pigarro"; FC e FR normais no repouso; mínimo enfisema; pulmões limpos; sem baqueteamento.
15	peso e altura acima do percentil 3; fezes usualmente anormais, volumosas e pobremente formadas; tônus pobre e massa muscular reduzida; pouca distensão abdominal (se tiver).	15	Tosse ocasional (ao levantar pela manhã); FR levemente elevada; enfisema suave; MV rude; roncocalizados raramente; baqueteamento precoce.
10	Peso e Altura abaixo do percentil 3; fezes pouco formadas, volumosas, ofensivamente gordurosas, músculo fraco e massa reduzida, distensão abdominal suave ou moderada.	10	Tosse frequente, usualmente produtiva; retração torácica; enfisema moderado; deformidade torácica; roncocal usualmente presentes; baqueteamento 2/3.
5	Marcada má-nutrição, protuberância abdominal abundante, fezes frequentes, volumosas, mau cheiro e gordurosas; prolapso retal frequente.	5	Tosse grave paroxística; taquipnéia e taquicardia; alteração pulmonar extensa; sinais de falência cardíaca direita; 3/4 baqueteamento.

Classificação	Pontos
Grave	≤ 40
Moderado	55 – 41
Leve	70 – 56
Bom	85 – 71
Excelente	100 – 86

Fonte: Artigo original de Schwachman & Kulczycki, 1958.

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA – PÓS - GRADUAÇÃO

**Pesquisa – DIAGNÓSTICO DA SAÚDE BUCAL DOS PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA,
ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DO HC DA UNICAMP.**

Pesquisador Responsável – Aline Cristina Gonçalves

Orientador- Prof. Dr. Carlos Emílio Levy

Senhores pais ou responsáveis,

Estamos realizando uma pesquisa com o objetivo de conhecer o estado da saúde bucal dos nossos pacientes com diagnóstico de fibrose cística e para isso o paciente passará por consulta odontológica e fará os seguintes procedimentos:

1- Coleta de saliva – o paciente irá mastigar uma esponjinha e colocá-la dentro de um tubinho;

2- Exame clínico odontológico (exame da boca) – a pesquisadora responsável irá avaliar a saúde bucal do paciente, orientá-lo sobre a higiene bucal e encaminhá-lo para tratamento odontológico quando necessário;

O segundo objetivo dessa pesquisa é conhecer a saúde dos ossos desses pacientes e todos os exames serão realizados no Hospital de Clínicas da UNICAMP, conforme rotina do Ambulatório de Fibrose Cística do HC UNICAMP.

Além disso, pretendemos fazer algumas perguntas ao paciente ou responsável, através de um questionário. Os pacientes serão beneficiados com esse estudo porque se forem detectadas alterações nos dentes ou gengiva que possam ser corrigidas ou diminuição na massa do osso, o que aumenta o risco de quebrá-lo, ele (a) receberá orientação e ou tratamento adequados. O paciente poderá desistir de participar do estudo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a ele ou à família dele. A avaliação será feita gratuitamente e todas as informações fornecidas serão de uso confidencial. Os procedimentos propostos não oferecem risco à saúde ou dor.

Se houver qualquer dúvida, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Aline Cristina Gonçalves, no telefone (19) 96451474, ou com o Comitê de Ética e Pesquisa da UNICAMP, no telefone (19) 3788-8936.

AUTORIZO

NÃO AUTORIZO

Declaro ter lido e entendido todas as informações acima relacionadas, não havendo nenhuma dúvida quanto ao que será realizado nessa pesquisa. Portanto, concordo em participar desse estudo.

Campinas, ____ de _____ de 201__.

Nome completo do paciente e assinatura do mesmo

Nome do responsável legal da criança ou do adolescente e assinatura do mesmo

Telefone para contato: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Anexo III

TERMO DE CONSENTIMENTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA – PÓS - GRADUAÇÃO

Pesquisa – USO DA SALIVA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA E AVALIAÇÃO DA SAÚDE BUCAL DOS PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA, ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DO HC DA UNICAMP.

(Indivíduos saudáveis)

Pesquisador Responsável – Aline Cristina Gonçalves

Orientador- Prof. Dr. Carlos Emílio Levy

Senhores pais ou responsáveis,

Meu nome é Aline Cristina Gonçalves, sou cirurgiã dentista (CRO-SP:93273) e faço pós-graduação na Faculdade de Medicina da Unicamp (RA:107351). Estamos realizando uma pesquisa com o objetivo de conhecer o estado da saúde bucal dos pacientes do ambulatório de pediatria do Hospital das Clínicas da Unicamp, com diagnóstico de Fibrose Cística (doença genética que causa problemas pulmonares e pancreáticos).

Para isso precisamos comparar os resultados dos pacientes com os resultados de crianças e adolescentes saudáveis. Sendo assim, solicito a colaboração de vocês, pais e/ou responsáveis de alunos da E E Sophia Velter Salgado, para participação do(s) seu(s) filho(s) nessa pesquisa. Para coletar a saliva seu (a) filho (a) só terá que mastigar um roletinho de algodão estéril por 1 minuto e depois colocar o roletinho de algodão novamente dentro de um tubinho. O procedimento proposto não oferece risco à saúde ou dor.



Após coleta da saliva iremos medir o pH, cloro, sódio, potássio, glicose, lactato e bicarbonato da saliva. Caso haja qualquer alteração significativa entrarei em contato com vocês.

Se você concordar com a participação do (a) seu (a) filho (a) nesse projeto, por favor, responda essas perguntas:

Seu (a) filho (a) tem: Asma(); Bronquite(); Diabetes(); Rinite alérgica (); Hipertensão()

Toma algum remédio todos os dias? Sim () Não ()

Se sim, qual remédio? _____

Se houver alguma dúvida, você poderá entrar em contato comigo (Aline Cristina Gonçalves), no telefone (19) 96451474, ou com o Comitê de Ética e Pesquisa da FCM-UNICAMP, no telefone (19) 3788-8936.

AUTORIZO

NÃO AUTORIZO

Declaro ter lido e entendido todas as informações acima relacionadas, não havendo nenhuma dúvida quanto ao que será realizado nessa pesquisa. Portanto, concordo a participação de

_____ nessa pesquisa.

Campinas, ____ de _____ de 2011.

Nome e assinatura do responsável legal pelo menor

Telefone para contato: _____

ANEXO IV
FICHA CLÍNICA

Início: __/__/201__.

IDENTIFICAÇÃO

Nome do paciente: _____

Data Nascimento: / / Idade: _____ Óbito: _____ Naturalidade: _____

Endereço : _____ Fone: _____

Nome do responsável: _____ RG _____

Local da confirmação do diagnóstico de FC: _____ Data: / /

PARÂMETROS GENÉTICOS

Gênero: Feminino() Masculino() Estudo Genético: _____

Consanguinidade: _____

Ascendência: ITALIANO-1 ; PORTUGUÊS- 2; ESPANHOL- 3; ALEMÃO- 4; AFRICANO- 5; JAPONÊS- 6; OUTROS- 7; DESCONHECE-8

Avó paterna: _____ Avô paterno: _____

Avó materna: _____ Avô materno: _____

PARÂMETROS CLÍNICOS

História Familiar de FC: 0=SEM; 1=IRMÃOS; 2=TIOS; 3=PRIMOS; AVÓS; 5=OUTROS; 6=SEM INFORMAÇÃO

Manifestações iniciais (1°, 2°):

() ÍLEO; () DIARRÉIA; () ↓CRESCIMENTO; () EDEMA; () DIST. ABDOMINAL;
() ICTERÍCIA; () TOSSE CRÔNICA; () SIBILÂNCIA; () PN REPETIÇÃO.

Doença: Pancreática () ; Hepática () ; Pulmonar () ; Intestino () ; Fígado () .

-Faz uso de enzimas digestivas? () Sim Quantidade/ dia _____ () Não

-Faz uso de suplemento vitamínico? () Sim () Não

-Especificar _____

-Faz uso de suplemento alimentar? () Sim () Não

-Especificar _____

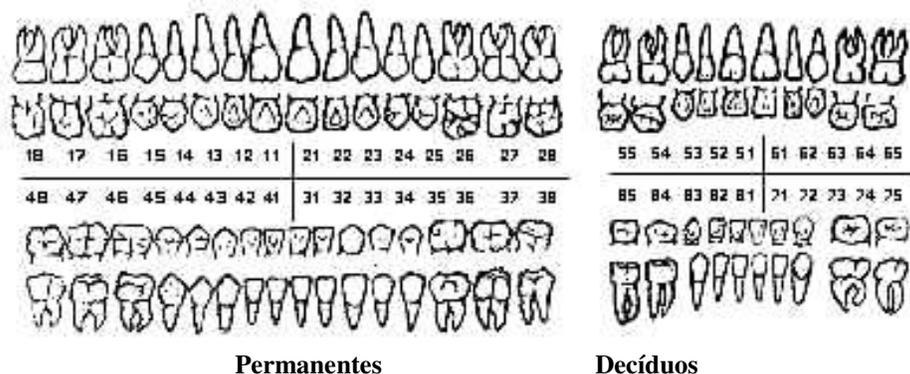
Presença de patógenos pulmonares

() Colonização _____ () S/ Colonização

EXAMES ODONTOLÓGICOS

REGIÕES DA CAVIDADE ORAL	CONDIÇÕES
Língua	
Lábios	
Gengiva	
Dentes (opacidade, descalcificação, hipoplasia)	
ATM	Dor() Estalidos()
Aperta os dentes ou tem bruxismo	
Respirador bucal	Sim() Não()
Chupeta ou mamadeira	Sim() _____ Não()

ODONTOGRAMA



Legenda: A Dente restaurado A Canal a ser tratado
A Canal tratado A Lesão de cárie A Dente ausente

Índice CPOD/ Índice CEO

CLASSIFICAÇÃO	DENTES	FACES
Cariados		
Perdidos		
Obturados		
Esfoliado		

PLACA BACTERIANA

Dente/Região	Valores
	0 = Nenhuma placa na área gengival
	1 = Nenhuma película, inflamação leve, pequena alteração na cor, pouco edema; nenhum sangramento a palpação
	2= Inflamação moderada, rubor, edema; nenhum sangramento à palpação
	3= Inflamação grave, rubor intenso e edema, ulcerações; tendência a sangramento espontâneo

GENGIVITE

Dente/Região	Valores
	0 = Gengiva normal
	1 = 1 = inflamação leve, pequena alteração na cor, pouco edema; nenhum sangramento a palpação
	2 = inflamação moderada, rubor, edema; nenhum sangramento à palpação
	3 = inflamação grave, rubor intenso e edema, ulcerações; tendência a sangramento espontâneo

Anexo V

Quadro 3. Estudos sobre as concentrações de cloro e sódio na saliva de pacientes com fibrose cística

Pesquisadores	Ano	GFC ^o	GC*	Métodos	Resultados
Chernick, Barbero & Parkins	1961	12	12	Fotometria de chama/ Titulação	Alto nível de K ⁺ e baixo nível de Na ⁺ e Cl ⁻ em pacientes com FC
Marmar et al	1966	12	13	Fotometria de chama/ Titulação	Alto nível de Na ⁺ e Cl ⁻ em pacientes com FC
Lawson et al.	1967	5	50	Eletrodo seletivo	Alto nível de Na ⁺ em pacientes com FC
Wiesmann et al	1970	23	12	Espectrometria de absorção Atômica	Não houve diferença significativa para o Cl ⁻
Fritz et al.	1972	11	0	Não foi citado	Alto nível de Na ⁺ e Cl ⁻ em pacientes com FC
Blomfield et al.	1973	35	28	Espectrometria de absorção Atômica	Alto nível de Na ⁺ e Cl ⁻ em pacientes com FC
Kolberg et al.	1982	9	11	Fotometria de chama	Alto nível de Na ⁺ em pacientes com FC
Jimenez-Reyes & Sanches-Aguirre	1995	9	9	Espectrometria de absorção Atômica	Alto nível de Na ⁺ em pacientes com FC

^oGFC: Grupo fibrose cística; *GC: Grupo indivíduos saudáveis

9- APÊNDICES



Histórico Escolar

Nome	Registro Acadêmico
Aline Cristina Gonçalves	107351

Prazo para Integralização	Coefficiente de Rendimento (0 a 4)
07/2017	Indefinido
Orientador (es)	
Prof Doutor Carlos Emilio Levy	

Disciplinas Cursadas

Observações

Nas disciplinas com situação 'Aprovado', o aluno obteve frequência igual ou superior a 75% da Carga Horária.

Este documento contém todas as disciplinas cursadas pelo aluno.

- Disciplinas cursadas na condição de Estudante Especial - aproveitadas na integralização do curso.

* - Carga Horária segundo catálogo seguido pelo aluno. (Informação CCPG Nº 4/2008)

! - Disciplinas cursadas como Estudante Especial / não válidas para o programa.

1º Semestre de 2010 - 01/03/2010 até 30/06/2010					
Código	Nome da Disciplina	Conc.	CH	Crd	Situação
MP645	#Metodologias de Pesquisas Aplicadas à Saúde da Criança e do Adolescente	A	45	3	Aprovado por Conceito e Frequência
MP646	#Pedagogia Médica e Didática Especial em Saúde da Criança e do Adolescente	A	45	3	Aprovado por Conceito e Frequência

2º Semestre de 2010 - 01/08/2010 até 31/12/2010					
Código	Nome da Disciplina	Conc.	CH	Crd	Situação
MP681	#Crescimento e Desenvolvimento	B	45	3	Aprovado por Conceito e Frequência

2º Semestre de 2011 - 01/08/2011 até 31/12/2011					
Código	Nome da Disciplina	Conc.	CH	Crd	Situação
AA001	Dissertação de Mestrado	P	--	-	Tese em Andamento
MP639	Introdução à Análise Estatística Biomédica	A	45	3	Aprovado por Conceito e Frequência

1º Semestre de 2012 - 01/03/2012 até 30/06/2012					
Código	Nome da Disciplina	Conc.	CH	Crd	Situação
AA001	Dissertação de Mestrado	P	--	-	Tese em Andamento
CD003	Estágio de Capacitação Docente - PED C	S	30	2	Aprovado por Conceito e Frequência
PA818	Tópicos em Patologia de Cabeça e Pescoço	A	60	4	Aprovado por Conceito e Frequência

CÓDIGO DE AUTENTICIDADE

Verifique a autenticidade deste documento na página <http://www.daonline.unicamp.br/ActionConsultaDiploma.asp>
Código: 4efcb0469f17c9256b025404d109b281da90362f

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
DAC – Diretoria Acadêmica
Diretoria de Registro e Gerenciamento Acadêmico
Rua Sérgio Buarque de Holanda, 251 - Cidade Universitária - Barão Geraldo - Campinas/SP - 13083-970
www.dac.unicamp.br



Histórico Escolar

Nome	Registro Acadêmico
Aline Cristina Gonçalves	107351

2º Semestre de 2012 - 01/08/2012 até 31/12/2012					
Código	Nome da Disciplina	Conc.	CH	Crd	Situação
AA001	Dissertação de Mestrado	P	--	-	Tese em Andamento
CD003	Estágio de Capacitação Docente - PED C	S	30	2	Aprovado por Conceito e Frequência

1º Semestre de 2013 - 01/03/2013 até 30/06/2013					
Código	Nome da Disciplina	Conc.	CH	Crd	Situação
MP650	Redação Científica	A	45	3	Aprovado por Conceito e Frequência

Carga Horária			
Total da Carga Horária Completada	Total da Carga Horária Supervisionada	Total de Créditos	
345	210	23	

CÓDIGO DE AUTENTICIDADE

Verifique a autenticidade deste documento na página <http://www.daconline.unicamp.br/ActionConsultaDiploma.asp>
Código: 4efcb0469f17c9256b025404d109b281da90362f

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
DAC – Diretoria Acadêmica
Diretoria de Registro e Gerenciamento Acadêmico
Rua Sérgio Buarque de Holanda, 251 – Cidade Universitária – Barão Geraldo – Campinas/SP – 13083-970
www.dac.unicamp.br

RESEARCH

Open Access

Saliva as a potential tool for cystic fibrosis diagnosis

Aline Cristina Gonçalves^{1,2,4*}, Fernando Augusto de Lima Marson^{1,2}, Regina Maria de Holanda Mendonça¹, José Dircceu Ribeiro¹, Antonio Fernando Ribeiro¹, Ilma Aparecida Paschoal² and Carlos Emilio Levy¹

Abstract

Background: Saliva and sweat are modified by cystic fibrosis (CF). In both cases the chloride and sodium ion concentrations for healthy subjects and CF patients differ, this representing a possible alternative tool for CF diagnosis. In this context, the aim of this study was to compare the concentrations of these ions in saliva samples taken from CF patients and healthy subjects.

Methods: A case-control study was carried out at a university CF center, in which the saliva samples were analyzed on an ABL 835 Radiometer[®] to determine the ion concentration.

Results: For the CF patients (n = 80) the values for the biochemical parameters of chloride, potassium and sodium ion concentration were higher (p < 0.009) and the volume and pH of the saliva were lower than in the case of healthy subjects (p < 0.009). For the healthy subjects group (n = 84) versus CF patients, according to the ROC curve, the values for sodium were: cutoff: 13.5 mmol/L, sensitivity: 73.4%, specificity: 70.6%; and for chloride: cutoff: 20 mmol/L, sensitivity: 68.1%, specificity: 72.9%.

Conclusions: The chloride and sodium concentrations in the saliva samples were higher for CF patients in comparison with healthy subjects. Thus, saliva as a tool for CF diagnosis can be considered a new challenge, and a population study including patients in all age classes needs to be performed, in different countries over the world, to extend the database to include a broad spectrum of information in order to identify normal ion concentration ranges for CF patients according to age, genotype and environment.

Virtual Slides: The virtual slide(s) for this article can be found here <http://www.diagnosticpathology.diagnomx.eu/vs/2514233148750145>

Keywords: Saliva, Ion concentration, Cystic fibrosis, Lung disease, CFTR

Background

Cystic fibrosis (CF), the most common genetic disease in Caucasians, is a hereditary exocoelopathy with a wide range of clinical and genetic variants [1].

Paul di Sant'Agnesse et al. [2] investigated the ionic composition of sweat in CF patients and found higher concentrations of chloride, sodium and potassium in comparison to healthy subjects. To decrease the difficulties associated with obtaining sufficient quantities of sweat to determine the concentration of electrolytes,

Gibson and Cooli [3] proposed using the cholinergic stimulation technique on a small area of skin via pilo-carpine iontophoresis. The quantitative analysis of sweat chloride levels is currently applied as a discriminatory test for CF diagnosis [4].

The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein forms a channel which allows chloride ions to cross the cell membrane of epithelial cells in both directions depending on the electrochemical gradient, this being important in the production of airway surface liquid, exocrine pancreatic secretion and sweat [5].

Sweat in healthy subjects is hypotonic in relation to the extracellular fluid to ensure an effective heat loss which is essential to maintaining the proper body temperature. In

* Correspondence: fcgoncalves@uol.com.br
 Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, P.O. Box 6111, Campinas, SP 13081-970, Brazil
 Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, P.O. Box 6111, Campinas, SP 13081-970, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article



© 2013 Gonçalves et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Gonçalves AC, Marson FA, Mendonça RM, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Paschoal IA, Levy CE. **Saliva as a potential tool for cystic fibrosis diagnosis.** *Diagn Pathol.* 2013 Mar 19;8:46. doi: 10.1186/1746-1596-8-46.

Disponível em: <http://www.diagnosticpathology.org/content/8/1/46> ou <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23510227?dopt=Abstract&holding=f1000,f1000m,isrcn>

July 30, 2013

A new study proposes that an analysis of chloride and sodium concentrations in saliva may be useful in the diagnosis of CF (Goncalves et al. *Diagn Pathol* 2013;8:46; free full text at www.diagnosticpathology.org/content/pdf/1746-1596-8-46.pdf).

The case-control study analysed saliva concentrations using an ABL 835 Radiometer to determine ion concentrations. Concentrations of chloride, sodium and potassium ions were significantly higher in CF subjects versus healthy controls. Saliva volume and pH were also significantly lower in CF patients.

Suggested cutoff values for healthy subjects versus CF patients were 13.5 mmol/L for sodium (sensitivity 73.4%, specificity 70.6%), and 20 mmol/L for chloride (sensitivity 68.1%, specificity 72.9%). The authors noted that additional data are needed to determine the range of normal ion concentrations in saliva in CF patients according to age, genotype and environment.

Comment

Dr. Mark Montgomery: The use of saliva ion concentration is appealing. There is easy availability of this body fluid; more often than not, we are trying to avoid infant saliva during our encounters. So among infants there certainly seems to be a willingness to share this fluid. A reliable test on saliva would be a boon to our families and the laboratory alike. There would be no concerns about insufficient quantity of sweat, or whether the sweat volume is adequate for analysis. However, as the authors indicated, work remains on the use of saliva for evaluation of function of cystic fibrosis transmembrane regulator function. The alteration of saliva ion concentrations with hydration status, age, impact of sampling site in the mouth, impact of fasting, etc, as well as repeatability of the results, all need further work.

Assunto: 1690780067103237 Association of CFTR mutation and ions in saliva of the cystic fibrosis patients

De: BioMed Central Editorial (researchnotes@biomedcentral.com)

Para: fernandolimamarson@hotmail.com;

Cc: fernandolimamarson@hotmail.com; licgoncalves@yahoo.com.br; fernandolimamarson@hotmail.com; reginamhm@gmail.com; carmenl@fcm.unicamp.br; ilma@mpc.com.br; anferi@uol.com.br; jdirceuribeiro@gmail.com; celevy@fcm.unicamp.br;

Data: Sexta-feira, 12 de Julho de 2013 16:48

Article title: Association of CFTR mutation and ions in saliva of the cystic fibrosis patients

MS ID : 1690780067103237

Authors : Aline C Gonçalves, Fernando AL Marson, Regina MH Mendonça, Carmen S Bertuzzo, Ilma A Paschoal, Antônio F Ribeiro, José D Ribeiro and Carlos E Levy

Journal : BMC Research Notes

Dear Mr Marson

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1690780067103237_article.pdf(100K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1285693400103238_comment.pdf

Association of *CFTR* mutation and ions in saliva of the cystic fibrosis patients

Aline Cristina Gonçalves¹, Fernando Augusto de Lima Marson^{1,2,a}, Regina Maria Holanda de Mendonça⁴, Carmen Silvia Bertuzzo², Ilma Aparecida Paschoal⁵, José Dirceu Ribeiro¹, Antônio Fernando Ribeiro¹, Carlos Emilio Levy³

¹Department of Pediatrics, School of Medical Sciences, University of Campinas, 13081-970, P.O. Box: 6111, Campinas, SP, Brazil

²Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, 13081-970, P.O. Box: 6111, Campinas, SP, Brazil

³Department of Clinical Pathologic, School of Medical Sciences, University of Campinas, 13081-970, P.O. Box: 6111, Campinas, SP, Brazil

⁴Boldrini Children's Center, Campinas, Brazil

⁵Department of Medical Clinic, School of Medical Sciences, University of Campinas, 13081-970, P.O. Box: 6111, Campinas, SP, Brazil

ACG: licgonçaves@yahoo.com.br

FALM: fernandolimamarson@hotmail.com

RMHM: reginamhm@gmail.com

CSB: bertuzzo@unicamp.br

IAP: Ilma@mpc.com.br

AFR: anferi@uol.com.br

JDR: jdirceuribeiro@gmail.com

CEL: celevy@fcm.unicamp.br

^aCorresponding author: phone - ++ 55 19 3521 8902, fax - ++ 55 19 3521 8907, e-mail -

fernandolimamarson@hotmail.com. Tessália Vieira de Camargo, 126

Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Campinas - SP - Brazil- CEP: 13083-887.

Department of Pediatrics. University of Campinas - Unicamp.

Abstract

Background: Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disease with a high clinical variability. The CF diagnosis is dependent on the amount chlorine excreted by the sweat glands, which is excreted by the CFTR protein (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator). Values above 60 mEq/mL to chloride secreted is the gold standard to CF diagnostic. Salivary glands have the CFTR protein, which is the chloride channel, as well as in the sweat glands. In this context, to verify the association *CFTR* mutations in the chloride and other ions excretion in patients' saliva is important, and can possibility the understanding about a new diagnostic method. **Method:** In the study were enrolled 84 CF patients followed in a CF university center. The dosage of ions was performed in the Laboratory of Pathology by ABL 835 Radiometer® equipment and *CFTR* mutation screening in the Laboratory of Medical Genetics. **Results:** There was no association of the value of the saliva ions (Na, K and Cl) with the *CFTR* genotype. All patients had values above normal for the chloride and sodium ions, and this data was associated with the CF diagnostic. When the values of ions between the CF patients and the control population were compared a higher value in patients was observed. Patients with two class I, II or III mutations *CFTR* determined had lower age, which is associated with greater clinical severity ($p=0.0031$). **Conclusion:** Saliva is plausible diagnostic method for CF, being chloride and sodium values greater in this fluid when compared with the control population.

Key words: sodium, chloride, *CFTR* mutation, diagnostic

Background

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease, caused by *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) mutations, that is responsible to encode a protein with same name [1]. *CFTR* is a chloride channel with complex structure, responsible for the transport of ions and other molecules, having influence on water balance, defense mechanisms and action on potassium, bicarbonate and sodium channels [2].

The CF is characterized by defect in ion transport by the apical membrane of epithelial cells of the respiratory tract, pancreas, salivary and sweat glands, intestine and reproductive tract, resulting in thick and viscous mucous secretion, that causes obstruction resulting in malabsorption, electrolyte loss in sweat and alteration of pulmonary secretions, with mucociliary clearance reduction [3,4].

Nearly than 2,000 *CFTR* mutations were identified. The F508del, a deletion of three base pairs, which leads to loss of the phenylalanine at amino acid position 508 of *CFTR* protein, is most frequent mutation [5-7]. Mutations can be grouped into classes that reflect the biosynthesis protein or functional changes in *CFTR* protein [6-9].

The *CFTR* class mutations are: (i) no *CFTR* protein at the apical membrane - defective protein synthesis; (ii) no *CFTR* protein at the apical membrane - abnormal processing and trafficking; (iii) normal amount of non-functional *CFTR* protein at the apical membrane - defective regulation; (iv) normal amount of *CFTR* protein with some residual function at the apical membrane - decreased conductance; (v) reduced amounts of functional *CFTR* protein - reduced synthesis/trafficking; (vi) functional but unstable *CFTR* protein present at the apical membrane - decreased stability [6-11]. *CFTR* mutations are considered severe or mild. Analysis showed that class IV, V and VI mutations are typically associated with pancreatic sufficiency and minor severe phenotype [12].

Depending on how the functional protein is affected, chloride transport does not occur or is reduced. Generally, severe mutations result in failure of protein synthesis or RNA transcription, and minor mutations cause changes in conductance or reduced synthesis of CFTR protein. In CF patients the saliva and the sweat has sodium, calcium and chloride are elevated [13].

Certain systemic diseases like CF, can impair the functioning of the salivary glands and saliva production (quantity and quality), which can affect physical properties and chemical constituents of the saliva [14]. The use of saliva as a diagnostic tool has been supported in some diseases [15-20]. In CF, the use of the saliva as a diagnostic tool was investigated [21]. In the CF patients' saliva, the electrolytes and proteins had different concentrations when compared with healthy individuals [20]. Electrolytes in higher concentrations in saliva are Cl, Na, K and HCO₃. These electrolytes are transported to the acini and salivary ducts [22]. Catalán et al. (2010) [24] highlights that study with saliva in CF as a diagnostic tool were made prior to determining the nature of the mutations that correlate with disease severity.

Greabu et al. (2009) [25] considered that the presence of body fluids altered in CF stimulated the research on the use of saliva as a palliative diagnostic method to the sweat test, with a low cost and easy access to the public health system.

Thus, the aim of this study was to investigate the relation of biochemical parameters of saliva, age, gender and *CFTR* mutation of CF patients followed at Hospital University.

Patients and Methods

Cross-sectional study enrolled 84 CF [44 (52.4%) females] patients in CF university center in 2011.

The saliva collection was performed with the collector Salivete[®] (Sarstedt-Germany - <http://www.sarstedt.com>), after rinsing with water; the cotton was putted inside of the mouth for 1 minute to absorb the saliva. The samples were centrifuged for 15 minutes at 1800 rpm at Gasometry Laboratory, Section of Pathology. After centrifugation, was evaluated the sodium, potassium and chloride in saliva by the ABL equipment mod 835 Radiometer[®] (Denmark) using 20 μ L of saliva performed by blood analyzed (<http://www.radiometer.com>).

The *CFTR* genetic screening was performed for different mutations: F508del, G542X, N1303K, R1162X, G551D and R553X [24]. Mutations were associated with the Na, K and Cl values by different genotypic groups.

Statistical analyzes were performed by two groupings: (1) with all mutations analyzed, and (2) only for the F508del mutation. For statistical analysis, the groups were: presence of two identified mutations (G2), presence of one mutation identified (G1) and no mutation identified (G0). For F508del mutation, the groups were: homozygotes, heterozygotes or F508del absence.

A second analyze was performed with the association between G2 versus G1 + G0, and homozygous F508del mutation versus the other patients.

Statistical analysis was performed by the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.17.0 (version 17, SPSS, Inc., Chicago, IL). The value of α (alpha) was 0.05. The tests used in the statistical analyze were one-way analysis of variance (ANOVA) and T-test for independent variables. By the G*Power 3.1.2 program, the power sample obtained was above 80% for analyzes using four parameters (Na, K, Cl and age).

Results

In the study were enrolled 84 CF patients, 44 (52.4%) females. The age, K, Cl and Na characteristics are listed in **Table 1** and *CFTR* mutation in **Table 2**.

The association between *CFTR* genotype with Na, K, Cl and age were listed in **Tables 3** and **4**. The **Table 3** shows the values for *CFTR* mutation groups (G0, G1 and G2), as well as, for the F508del *CFTR* groups. In **Table 4**, the association between G2 versus G1+G0, and homozygous F508del against the remaining patients was showed. In **Table 3**, the patients' age was lower in G2 ($p=0.031$) and higher in patients without F508del *CFTR* mutation identified ($p=0.012$). In **table 4**, the patients' age was lower in the G2 ($p=0.008$) and lower in the homozygous F508del *CFTR* ($p=0.005$). The comparison of the patients' sex was performed for patients' age and markers found in blood gas analysis (**Table 5**).

Discussion

Salivary secretion is a process that involves two steps: the first step involves the acini and the second the salivary ducts. The acini produce a secretion that contains ptyalin primary and/or mucin in a solution of ions at concentrations not much different from the typical extracellular fluid. Inasmuch as the primary secretion flows through ducts, there are two major active transport processes that modify the saliva ionic composition. First, in all salivary ducts, sodium ions are actively reabsorbed, while potassium ions are secreted, also in the active mode, with sodium exchange. Therefore, the sodium concentration in saliva is low, while the concentration of potassium ions increases. During salivation maximum, ionic concentrations in saliva is altered, since the formation of primary secretion by acini can increase up to 20 times. Consequently, this secretion by acinar ducts flowing so rapidly that reabsorbing secretion in the ducts is considerably reduced. Therefore, when copious amounts of saliva are secreted, the concentration of sodium chloride raises about one-half

to two thirds of the plasma concentration, whereas the potassium concentration drops to only four times the plasma concentration [26].

The encoding CFTR chloride channels is mediated by cAMP [27] that regulates chloride transport in the apical membrane of epithelial surface of airways, pancreatic ducts and sweat ducts [12]. The channel is normally closed, but opens when phosphorylated by protein kinase A and when ATP is present. In CF, the ion channel in the cell membrane for chloride is not present or open correctly, even when stimulated by cAMP. Pancreatic acinar cells secrete has a fluid rich in sodium and chloride which provides the vehicle for the transport of digestive enzymes of the lobes into the duodenum lumen. Chloride enters the lumen acinar via chloride channels in the apical plasma membrane of the cells and acinar epithelial cells. In CF, this decreased transport of chloride impairs the transport of water and electrolytes, causing obstruction of the pancreatic duct by mucus [28].

In our sample, the level of chloride (89 mmol/L) was greater than that of potassium (25 mmol/L) and sodium (48 mmol/L); however the level of chloride showed greater variance in the data distribution. Chloride is used as marker for the CF diagnosis, which is recognized as gold standard for CF diagnostic. However, in saliva, we can also notice altered values, although no reference in the scientific literature for the values of chloride in saliva as a potential CF diagnostic method can be found.

The patients' age in our study was lower in G2 group ($p=0.031$). When the analysis included only patients without mutation F508del allele for any such modification, were older ($p=0.012$). All *CFTR* mutations identified are Classes I, II and III. In patients with severe mutations, early clinical manifestations are identified, which can be seen in the results of this study.

We found for the grouping (G0 + G1) versus (G2) in association with the patients' age, older age group is described in (G0 + G1) (mean age=14.67 years) than in group (G2) (mean age=10.73 years) ($p=0.008$). The same was observed for the F508del homozygotes (mean age 10.19 years) versus F508del/- and -/- (mean age of 13.95 years), together ($p=0.005$). Just as previously mentioned, there was no association with the values of ion concentration on patients' saliva.

In the analysis of clusters [(G0, G1 and G2) and (F508del/F508del, F508del/- and -/-)] in relation to the amount of sodium, potassium and chloride in the saliva of patients with CF there was no association. The values of the ions in the saliva evaluated are dependent on the activity of CFTR protein present in the salivary ducts plasma membrane and undergo changes in their value depending on the presence or absence of the expressed protein and/or functional gland. Knowing that, independent of this mutation in the *CFTR* gene, the CF patient will present this abnormal protein in the membrane, which will result in altered expression for the ions, concerning the weighted factor as possible patient diagnosis, also through values ions in saliva. Because this is the first study to evaluate the relationship between salivary and genetic parameters, it was not possible to compare our data with the results of other authors, which reinforces the need for development of other works in this line of research, which enable this relationship better.

In conclusion, we observed that all patients have CF saliva parameters similar. In this context, the mutation is important in clinical severity and variability, but not as a principal tool diagnostic as the sweat test. We should consider that all test performed has costs, and the genetic screening is not available, actually, to all patients, and we depend of other diagnostic methods, as sweat and saliva ion concentration dosage. The saliva has easy

access and low cost, when compared with sweat test. In our study, we observed similar values to chloride and sodium in all patients, in this context, the data provide extra information to consider the saliva analyze as a diagnostic tool. We consider that new studies should be performed, with a representative population of patients of around world; and we need to create a normal curve to CF diagnostic.

Reference

1. Sheridan MB, Hefferon TW, Wang N, Merlo C, Milla C, Borowitz D, Green ED, Mogayzel PJ Jr, Cutting GR: **CFTR transcription defects in pancreatic sufficient cystic fibrosis patients with only one mutation in the coding region of CFTR.** *J Med Genet* 2011, **48**:235-241.
2. Veja-Briceño LE, Sánchez I: **Fibrosis quística: actualización em sus aspectos básicos.** *Revista Chilena de Pediatría* 2005, **76**(Suppl 5):464-470.
3. Donaldson SH, Boucher R: **Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease.** *Curr Opin Pulm Med* 2003; **9**:486-491.
4. Davis PB: **Cystic fibrosis since 1938.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173**(5):475-482.
5. **Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium** - CFGAC. The Cystic fibrosis mutation database. Disponible em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>. Access: 07/12/2013.
6. Hodges CA, Grady BR, Mishra K, UC, Mitchell C, Drumm L: **Cystic fibrosis growth retardation is not correlated with loss of CFTR in the intestinal epithelium.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011, **301**:G528–G536.

7. Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro MAGO, Ribeiro AF, Ribeiro JD: **Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis.** *J Bras Pneumol* 2013, **39**(Suppl 3):306-316.
8. Belcher CN, Vij N: **Protein Processing and Inflammatory Signaling in Cystic Fibrosis: Challenges and Therapeutic Strategies.** *Current Molecular Medicine* 2010, **10**: 82-94.
9. Culling B, Ogle R: **Genetic Counselling Issues in Cystic Fibrosis.** *Paediatric Respiratory Reviews* 2010, **11**:75-79.
10. Slieker MG, Sanders EAM, Rijkers GT, Ruven HJT, Van Der Ent CK: **Disease modifying genes in cystic fibrosis.** *J Cyst Fibros* 2005, **4**:7-13.
11. Mishra A, Greaves R, Massie J: **The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era.** *Clin Biochem Rev* 2005, **26**:135-153.
12. Mishra A, Greaves R, Massie J: **The limitations of sweat electrolyte reference intervals for the diagnosis of cystic fibrosis: a systematic review.** *Clin Biochem Rev* 2007, **28**:60-76.
13. Johnson LR: Gastrointestinal physiology. Chapter 7- **Salivary secretion.** 5th ed; Editora Mosby, 1997:59-67.
14. Moura SAB, Medeiros AMC, Costa FRH, Moraes PH, Oliveira Filho AS: **Diagnostic value of saliva in oral and systemic diseases.** *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2007, **7**(Suppl 2):187-194.
15. Schwartz SS, Zhu WX, Sreebny LM: **Sodium Dodecil sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of Human whole saliva.** *Arch Oral Biol* 1995, **40**(Suppl 10):949-958.
16. Lawrence HP: **Salivary markers of systemic disease: Noninvasive diagnostic of disease and monitoring of general health.** *J Can Dent Assoc* 2002, **68**(Suppl 3):170-174.

17. López ME, Colloca ME, Paez RG, Schallmach JN, Koss MA, Chernonagura A: **Salivary characteristics of diabetic children.** *Braz Dent J* 2003, **14**(Suppl 1):26-31.
18. Yarat A, Tunali T, Pisiriciler R, Akyuz S, Ipbuker A, Emekli N: **Salivary thromboplastic activity in diabetics and healthy controls.** *Clin Oral Investig* 2004, **8**(Suppl 1):36-39.
19. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, de Palo RF: **Saliva especimen: new laboratory for tool diagnostic and basic investigation.** *Clin Chim Acta* 200, **383**(Suppl 1-21):30-40.
20. Pfafe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C: **Diagnostic potential of saliva: current state and future applications.** *Clin Chem* 2011; **57**(Suppl 5):675-687.
21. Gonçalves AC, Marson FAL, Mendonça RMH, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Paschoal IA, Levy CE: **Saliva as a potential tool for cystic fibrosis diagnosis.** *Diagnostic Pathology* 2013, **8**:46.
22. Mandel ID: **The diagnostic uses of saliva.** *J Oral Pathol Med* 1990, **19**:119-125.
23. Aps JKM, Martens LC: **Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva.** *Forensic Science International* 2006, **150**:119-131.
24. Catalán MA, Nakamoto T, Gonzalez-Begne M, Camden JM, Wall SM, Clarke LL, Melvin JE: **CFTR and ENaC ion channels mediate NaCl absorption in the mouse submandibular gland.** *J Physiol* 2010, **588**(Suppl 4):713-724.
25. Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, Totan C, Miricescu D, Radulescu R: **Saliva-a diagnostic window to the body, both in health and in disease.** *J Med Life* 2009, **2**(Suppl 2):124-132.
26. Guyton A C, Hall J E. *Medica Physiology Treaty*. Chapter 62: **General Principles of Gastrointestinal Motility Function, Nervous Control and Blood Circulation.** 9th Ed Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2009: 601-604.

27. Puljak L, Kilic G: **Emerging roles of chloride channels in human diseases.**

Biochimica et Biophysica Acta 2006; **1762**:404-413.

28. Wiehe M, Arndt k: **Cystic Fibrosis: A Systems Review.** *AANA Journal* 2010,

78(3):246-251.

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ACG: made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

FALM: made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

RMHM: has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

IMP: has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

JDR: has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

AFR: has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

CEL: has given final approval of the version to be published.

Acknowledgments

To the pediatric outpatient Center University - Unicamp.

Maria Ângela Ribeiro by Spirometry analyses, Luciana Cardoso Bonadia and Carmen Sílvia Bertuzzo by genetic analyzed, and w.laboratoriomultiusuario.com.br by technical contribution.

To laboratory gas analysis Division of Clinical Pathology Center Universit Unicamp, the great commitment.

Financial Support: Fapesp

Table 1. Descriptive analysis of CF patients for age and concentration of ions obtained from blood gas analysis of saliva.

Variables	N	Minimum (mmol/L)	Maximum (mmol/L)	Mean		Standard deviation	Variance
				Values (mmol/L)	Standard error		
Age	83	2	34	12.77	0.761	6.936	48.105
Na	84	8	48	19.94	1.004	9.200	84.635
K	79	11	25	19.26	0.357	3.170	10.048
Cl	84	12	89	27.80	1.453	13.317	177.344

(N) – Number of patients; (Na) - Sodium; (K) - Potassium, (Cl) - chlorite; (mmol/L) - millimole per liter.

Table 2. The *CFTR* mutation identified and patients' groups for statistical analysis.

Distribution of patients according to genotype	Frequency	Percentage (%)
-/-	15	17.9
F508del/-	24	28.6
F508del/F508del	26	31.0
F508del/G542X	10	11.9
F508del/R1162X	2	2.4
F508del/R553X	1	1.2
G542X/-	4	4.8
R1162X/-	1	1.2
R1162X/R1162X	1	1.2
Total	84	100.0
Grouping for the <i>CFTR</i> genotype	Frequency	Percentage (%)
MI/MI	40	47.6
MI/MNI	29	34.5
MNI/MNI	15	17.9
Total	84	100.0
Grouping for the F508del genotype	Frequency	Percentage (%)
F508del/ F508del	26	31.0
F508del/-	37	44.0
-/-	21	25.0
Total	84	100.0

(%) - Percentage; (MI) - mutation identified; (MNI) - unidentified mutation, (-) - no mutations identified for the *CFTR* gene.

Table 3. Age and variables from blood gas analysis of the saliva of CF patients in relation to *CFTR* genotype.

Variables	Groups	N	Mean	Standard deviation	Standard error	Confidential interval		Minimum	Maximum	F	p
						5%	95%				
Age	MNI/MNI	14	15.21	7.668	2.049	10.79	19.64	5	31	3.643	0.031
	MI/MNI	29	14.41	8.671	1.610	11.12	17.71	2	34		
	MI/MI	40	10.73	4.374	0.692	9.33	12.12	3	21		
	Total	83	12.77	6.936	0.761	11.26	14.29	2	34		
Na	MNI/MNI	15	19.40	8.879	2.292	14.48	24.32	8	41	0.607	0.547
	MI/MNI	29	18.66	10.321	1.917	14.73	22.58	8	47		
	MI/MI	40	21.08	8.526	1.348	18.35	23.80	10	48		
	Total	84	19.94	9.200	1.004	17.94	21.94	8	48		
K	MNI/MNI	15	19.79	2.581	0.666	18.36	21.22	15	24	0.315	0.731
	MI/MNI	26	19.30	3.447	0.676	17.91	20.70	11	25		
	MI/MI	38	19.02	3.234	0.525	17.96	20.09	13	25		
	Total	79	19.26	3.170	0.357	18.55	19.97	11	25		
Cl	MNI/MNI	15	23.53	8.847	2.284	18.63	28.43	12	42	1.766	0.177
	MI/MNI	29	31.10	18.561	3.447	24.04	38.16	12	89		
	MI/MI	40	27.00	9.285	1.468	24.03	29.97	13	52		
	Total	84	27.80	13.317	1.453	24.91	30.69	12	89		
Age	-/-	20	16.25	8.233	1.841	12.40	20.10	4	31	4.705	0.012
	F508del/-	37	12.70	7.098	1.167	10.34	15.07	2	34		
	F508del/F508del	26	10.19	4.138	0.811	8.52	11.86	3	20		
	Total	83	12.77	6.936	0.761	11.26	14.29	2	34		
Na	-/-	21	20.05	9.474	2.067	15.74	24.36	8	41	0.662	0.519
	F508del/-	37	18.78	9.363	1.539	15.66	21.91	8	47		
	F508del/F508del	26	21.50	8.856	1.737	17.92	25.08	10	48		
	Total	84	19.94	9.200	1.004	17.94	21.94	8	48		
K	-/-	21	19.83	3.133	0.684	18.40	21.25	14	25	0.512	0.601
	F508del/-	34	19.18	2.993	0.513	18.14	20.22	11	24		
	F508del/F508del	24	18.88	3.498	0.714	17.41	20.36	13	25		
	Total	79	19.26	3.170	0.357	18.55	19.97	11	25		
Cl	-/-	21	24.86	10.641	2.322	20.01	29.70	12	52	0.761	0.470
	F508del/-	37	29.35	17.160	2.821	23.63	35.07	12	89		
	F508del/F508del	26	27.96	7.957	1.561	24.75	31.18	16	46		
	Total	84	27.80	13.317	1.453	24.91	30.69	12	89		

(N) – Number of patients, (Na) - Sodium, (K) - Potassium, (Cl) - Chlorite; (MI) - mutation identified; (MNI) - unidentified mutation, (-) - no mutations identified to *CFTR* gene.

Table 4. Age and data from blood gas analysis of the saliva of CF patients in relation to *CFTR* genotype.

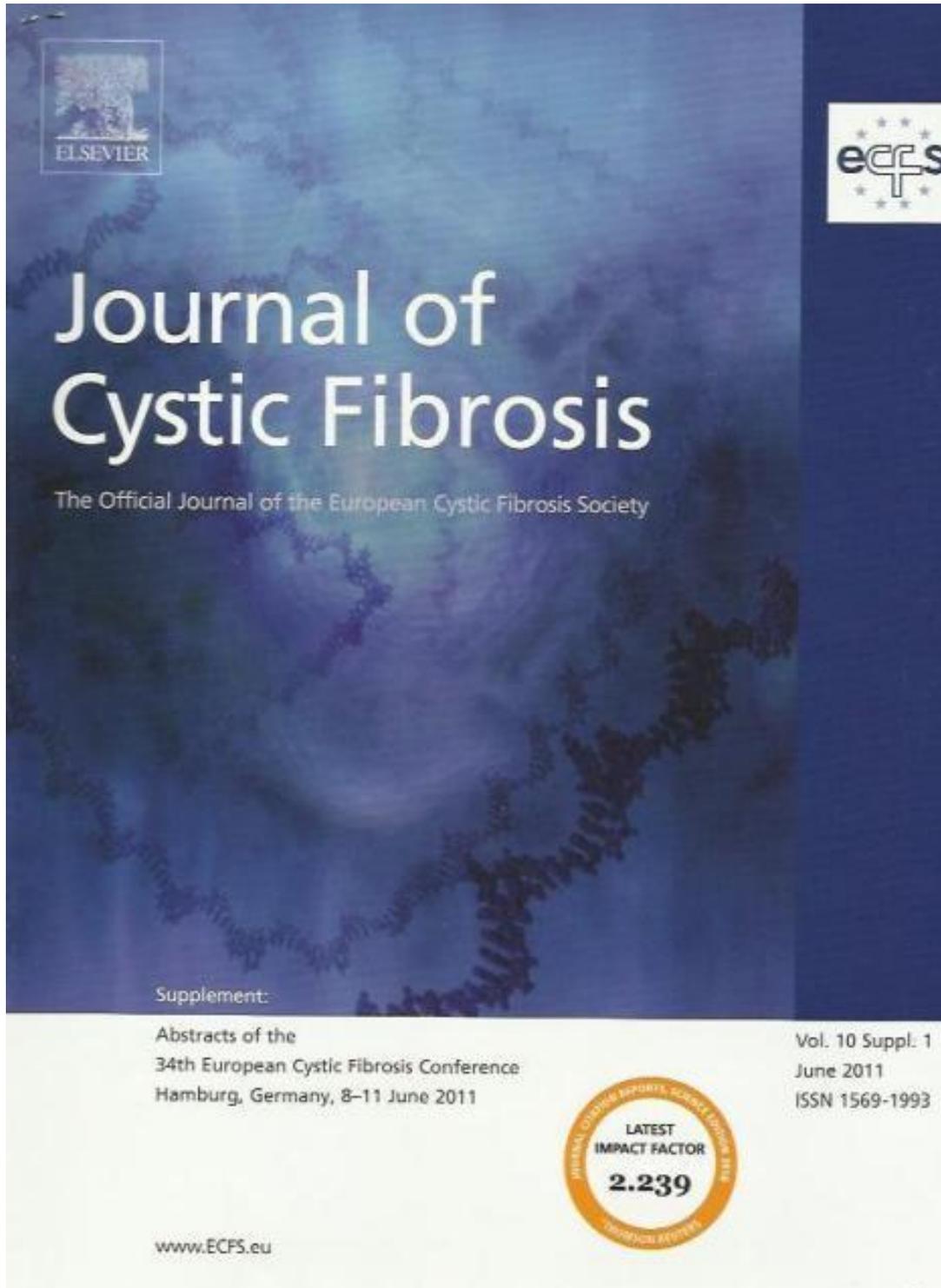
Variables	Groups	N	Mean	Standard deviation	Confidential interval		T	p
					5%	95%		
Age	MNI/MNI e MI/MNI	43	14.67	8.274	1.076	6.823	2.745	0.008
	MI/MI	40	10.73	4.374				
Na	MNI/MNI e MI/MNI	44	18.91	9.755	-6.160	1.828	-1.079	0.284
	MI/MI	40	21.08	8.526				
K	MNI/MNI e MI/MNI	41	19.48	3.133	-.967	1.886	.641	0.523
	MI/MI	38	19.02	3.234				
Cl	MNI/MNI e MI/MNI	44	28.52	16.217	-4.165	7.211	0.534	0.595
	MI/MI	40	27.00	9.285				
Age	delF508/- e -/-	57	13.95	7.635	1.174	6.336	2.896	0.005
	delF508/delF508	26	10.19	4.138				
Na	delF508/- e -/-	58	19.24	9.340	-6.576	2.059	-1.062	0.293
	delF508/delF508	26	21.50	8.856				
K	delF508/- e -/-	55	19.43	3.035	-1.005	2.093	0.661	0.513
	delF508/delF508	24	18.88	3.498				
Cl	delF508/- e -/-	58	27.72	15.181	-5.275	4.801	-.075	0.940
	delF508/delF508	26	27.96	7.957				

(N) - sample size, (Na) - Sodium, (K) - Potassium, (Cl) - Chloride; (MI) - mutation identified; (MNI) - unidentified mutation, (-) - no mutations identified to *CFTR* gene.

Table 5. Age and data obtained from blood gas analysis of the saliva of CF patients.

Variables	Sex	N	Mean	Standard deviation	Confidential interval		T	p
					5%	95%		
Age	F	44	12.11	6.406	-4.437	1.639	-0.916	0.362
	M	39	13.51	7.504				
Na	F	44	18.66	8.726	-6.670	1.288	-1.345	0.182
	M	40	21.35	9.606				
K	F	43	19.27	3.258	-1.413	1.457	0.031	.976
	M	36	19.25	3.107				
Cl	F	44	26.57	12.698	-8.377	3.213	-	0.378
	M	40	29.15	14.003				

Publicações de abstracts/resumos em anais de congressos



1378 Saliva sodium and chloride levels: a useful tool for cystic fibrosis (CF) diagnosis?

M.L. Gonçalves¹, R.M.H. Mendonça², J.D. Ribeiro³, A.F. Ribeiro⁴, M.A. Ribeiro⁵, L.A. Pauchard⁶, C.A. Lamy⁷. ¹University of Campinas UNICAMP Brazil, Clinical Pathology, Campinas, Brazil; ²Centro Infantil Habitica (Otorrinolaringologia), Campinas, Brazil; ³University of Campinas UNICAMP Brazil, Pediatrics, Campinas, Brazil; ⁴University of Campinas UNICAMP Brazil, Clinical Medicine, Campinas, Brazil; ⁵University of Campinas UNICAMP Brazil, Clinical Medicine, Campinas, Brazil

Objective: To compare biochemical parameters of saliva from CF patients and healthy individuals.

Method: A cross-sectional study including saliva samples of 43 CF patients from the Pediatric CF Reference Center of University Hospital of Campinas SP Brazil (UNICAMP) and 20 healthy individuals as controls. Saliva was collected with saline² (Merck-Germany) cotton roll, cleaned for a minute. The amount of saliva was measured and pH and concentrations of bicarbonate, sodium, chloride, potassium, glucose, calcium and lactate, were determined by ABIL and 817 Radiometer[®] (Denmark). Student's T and Mann-Whitney tests were used for statistical analysis. The project was approved by the Research Ethics Committee.

Results: the mean age of samples was 15.03 years (± 6.92 years). Among individuals with CF the mean age was 12.3 years (± 7.82 years) and in the controls, 18.2 (+5.24 years). Statistically significant differences between the two groups was observed for the variables bicarbonate ($p < 0.001$), sodium ($p = 0.000$), chloride ($p = 0.001$) and volume ($p = 0.000$). Averages of these variables in CF and control group, respectively, were bicarbonate (4.72 mmol/L; 1.40 mmol/L), sodium (20.77 mmol/L; 18.99 mmol/L), chloride (26.41 mmol/L; 23.03 mmol/L) and volume (0.22 mL; 0.44 mL). No statistically significant difference was observed between the groups for pH, potassium, calcium, lactate and glucose.

Conclusion: New biochemical salivary parameters seem to be influenced by CF. Other studies are necessary to confirm the usefulness of saliva as complementary, fast and inexpensive tool for CF diagnosis.

1380 Cystic fibrosis in Libya: the experience of an international collaboration project

T. Maguoli¹, G. Mergel², S. Zuffi³, N. Ughartani⁴, A. Litava⁵. ¹Meyer Children Hospital, Pediatric, Florence, Italy; ²Bleuler Children Hospital, Florence, Italy; ³Zahra Hospital, Zahra, Lebanon Arab Republic; ⁴Zahra Hospital, Zahra, Lebanon Arab Republic

Background: There are as yet no data about cystic fibrosis (CF) in Libya as a CF center did not exist in this country until 2008. In 2008 a CF Center started in accordance with an international collaboration between the CF Center of the Meyer Hospital and the Zahra Hospital (ZH).

Methods: According the agreement, ZH acquired facilities in performing sweat test, pulmonary and pulmonary function tests and microbiological culture. Diets and physiotherapy were learned and started a management plan. Patients were regularly followed up; pharmacological and medical treatments were assessed by Libyan physicians.

Results: From July 2008 to December 2010, 31 patients were diagnosed of CF. Nineteen percent were the product of consanguineous marriage 40% had other family members who also had CF (siblings) and in one family, more than ten. 19 to now 11 CF patients (14 females, 17 males) are regularly followed up at the Zahra Hospital. The mean age of patients was 5.9 (range 1-30 yr, median 7 yr) (range), 15 was diagnosed outside of Libya, requiring the family to go abroad. The most commonly visited foreign country was Tunisia followed by Germany and Italy. Symptoms at presentation were respiratory and gastrointestinal in 70%. Dehydration was the first symptom in 20% and was severe enough to require multiple hospitalizations in the first years of life in 25% patients.

Between July 2008 and February 2010, the mean number of follow-up visits/patient was 6.5.

Discussion: Our short experience in the CFH shows that families demonstrated great compliance, coming regularly for check-ups and thus avoiding having to go to a foreign country for diagnosis and follow-up.

1379 Utilization and healthcare charges in an insured US cystic fibrosis (CF) patient population

M.C. Bowler¹, K.Z. Noss², T. Cheng³, K.J. Vige⁴. ¹Northwestern for Health Analysis Research, LLC, Beverly Hills, United States; ²University of Michigan Health System, Ann Arbor, United States; ³Cleveland, Massachusetts, Health Outcomes & Policy Support, US Medical Affairs, South San Francisco, United States

Objective: To describe insurance use, charges and medication adherence in US CF patients.

Methods: This retrospective analysis used a US insurance claims data set. CF patients were assigned an index date based on their first claim for disease after diagnosis (Pulmozyme) between 2006-2008. Included patients had ≥1 ICD claim and were continuously enrolled in the health insurance plan ≥2 years. They were excluded if they had no claims for CF or had age < 6. Patient characteristics over the 1 year period prior and subsequent to ICD in the 1-year period prior were examined.

Results: The final study included 934 patients. Mean age was 19.6 years (SD 11.6) and 40.0% were female. The specialties seen most frequently were pulmonary (57.7%) and primary care (29.4%). The cohort had a mean of 3.5 comorbid chronic conditions (SD 1.2), the most common were pancreatic insufficiency (80.0%), *P. aeruginosa* (71.0%), chronic sinusitis (24.0%), and diabetes (17.2%). Properly used medications were inhaled antibiotics (58.0%), related steroids (54.4%), and hypertonic saline (21.1%). 173 patients (18.7%) were hospitalized for respiratory exacerbations; mean length of stay was 13.0 days. Mean per-patient annual healthcare charges were \$71,122 (SD 28,340) and charges related to respiratory exacerbations were \$16,291 (SD 33,343). The mean adherence (medication possession ratio) to ICD in the post-index period was 0.59 (SD 0.16, median 0.78).

Conclusion: Insurance use and healthcare charges are high in patients with CF, and adherence to disease pills is low. Future analysis will examine the relationship between medication adherence and subsequent health and economic outcomes.

1381 Registration of clinical trials in cystic fibrosis

M.R. Elliott^{1,2}, R.L. Davies^{1,2}, P.L. Sta^{1,2}. ¹Royal Prince Alfred Hospital, Respiratory Medicine, Sydney, Australia; ²University of Sydney, Sydney Medical School, Sydney, Australia

Background: Our supposed benefits of prospective registration of clinical trials is that it should discourage selective or delayed reporting of trials. We aimed to determine the proportion of registered clinical trials involving participants with cystic fibrosis that are published and how soon after study completion publication occurs.

Methods: In Jan 2011, we searched the register ClinicalTrials.gov for clinical trials involving participants with cystic fibrosis that were registered in January 2000 or later and that were completed by December 2008. For each trial identified, we searched Google Scholar using the names of the investigators and key terms for the study population and intervention to determine whether the trial had been published by the end of 2010.

Results: 240 trials involving participants with cystic fibrosis had been registered since 1990. Of these, 189 trials were reported on the register as having been completed by December 2008. Of the 189 completed trials, 64 had been published by December 2010. Of the remainder, 3 had been published as abstracts only and 2 had published secondary reports only, while 113 appeared unpublished. Among the 64 published trials, the mean period between completion and publication was 28 months (SD 21). The number of trials that were published within 7 years of their completion was 12.

Conclusion: Despite judgement on a public register, many clinical trials in cystic fibrosis remain unpublished long after completion of the study. Half of those that are published are not published within 7 years of study completion.



ISSN 1806-3713

Jornal Brasileiro de
Pneumologia

J Bras Pneumol. v.38, Suplemento 1B, p. R1-R64 Maio 2012

PUBLICAÇÃO OFICIAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA

**IV Congresso Brasileiro
de Fibrose Cística**

02 a 05 de Maio de 2012
Costão do Santinho Resort
Florianópolis - SC

RESUMO DOS TEMAS LIVRES

www.jornaldepneumologia.com.br

HC- FMB UNESP entre o período de Abril de 2010 a Outubro de 2011 por suspeita de FC em virtude de IRT maior que 20ng/ml. Todos os pacientes foram examinados clinicamente e realizaram dois exames de closo no suor para confirmação diagnóstica. Foram analisados: o número de atendimentos no período; o cumprimento do protocolo de TNN-FC; a procedência dos pacientes; a idade ao encaminhamento; número de casos diagnosticados e os sintomas, por ocasião da 1ª consulta, dos pacientes diagnosticados portadores de FC. Para a análise estatística os dados coletados foram submetidos à análise descritiva das variáveis por meio de frequência, com o programa SPSS e Epi-Info 2004. Resultados: Foram atendidos 115 pacientes, sendo 62 do sexo masculino. Em 24 pacientes foram colhidas duas amostras de IRT, nos demais apenas uma. A mediana de idade da primeira consulta foi de 92 dias, com média de 122 dias. A idade de diagnóstico era de 117 dias (mediana), com média de 144 dias. Deix pacientes, 7 meses, foram diagnosticados como portadores de FC, estimando-se a incidência de FC, em 2010, de 1:7500 nascidos vivos/ano na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo. Em relação aos sintomas clínicos para o diagnóstico, 8 pacientes apresentavam sintomatologia e dois eram assintomáticos. As manifestações clínicas mais frequentes foram: ileomeconial (7), déficit de crescimento (3), esteatorréia ou evidência fecal de má absorção (2), sintomas respiratórios persistentes (1), edema e anemia (2) e distúrbio metabólico (2). A procedência dos pacientes variava, sendo que 65 pacientes moravam distantes de até 200km e 50 pacientes moravam em cidades mais afastadas (até 473km). Conclusões: A incidência de FC na região, para o ano de 2010, foi acima da estimada para o Brasil. Observou-se neste início de TNN-FC que a idade do encaminhamento foi mais tardia que o recomendado. Também houve coleta não adequada de IRT com número de amostras não suficientes, isso reflete a falta de informação dos Municípios da região sobre a importância da TNN-FC e o diagnóstico precoce de FC. Os sintomas clínicos de FC estavam presentes na maioria das crianças nos primeiros meses de vida, permitindo uma suspeita diagnóstica precocemente.

11.104 A SALIVA COMO RECURSO DIAGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA

ALINE COSTA FERREIRA (UNICAMP) - BRASIL
 REGINA MARIA SOARES DE MENDONÇA (COP) - BRASIL
 ROSE BRUCE HEBERT (UNICAMP) - BRASIL
 ANTÔNIO FERNANDO HEBERT (UNICAMP) - BRASIL
 FERNANDO AUGUSTO DE LIMA MARIANI (UNICAMP) - BRASIL
 KIMA APARECIDA PACHECO (UNICAMP) - BRASIL
 CARLOS BRUNO LEVI (UNICAMP) - BRASIL

PALAVRAS-CHAVE: SALIVA, DIAGNÓSTICO, FIBROSE CÍSTICA

Introdução: A Fibrose Cística(FC) é caracterizada pelo defeito no transporte iônico através da membrana

apical das células epiteliais das vias respiratórias, pâncreas, glândulas salivares e sudoríparas, intestino e aparelho reprodutor, resultando em secreção mucosa espessa e viscosa, que causa obstrução ao nível de ductos e canalículos glandulares, acarretando na má absorção, perda de eletrólitos no suor e alteração das secreções pulmonares, com diminuição do clearance mucociliar. Na saliva de pacientes com FC, assim como na secreção brônquica, suor pancreático e suor, o sódio, cálcio e proteínas são elevados. O valor diagnóstico da saliva vem sendo corroborado por uma série de estudos que utilizam esse fluido corporal para analisar substâncias específicas importantes na elucidação diagnóstica de doenças. Os eletrólitos em maior concentração na saliva são Cl, Na, K e HCO₃. Esses eletrólitos se originam do suor, a partir do qual são transportados para os ácinos e ductos salivares. Estudos anteriores revelam variabilidade nos achados, mas a maioria desses estudos foram realizados antes de se determinar a natureza das mutações que se relacionam com a gravidade da doença. **Objetivo:** Comparar o Cl e Na da saliva de pacientes com FC com um grupo de indivíduos hígidos. **Característica e Métodos:** Estudo transversal, incluindo 94 pacientes com FC atendidos no Ambulatório de Pediatria do Hospital de Clínicas da UNICAMP desde 2010 a 2011 e 85 indivíduos hígidos. A coleta de saliva foi realizada com o coletor Saliveta® (Sordest, Alemanha), após bochecho com água, o algodão foi movigado durante 1 minuto. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1800rpm, no Laboratório de Gasometria da Divisão de Patologia Clínica do HC da UNICAMP. Imediatamente após a centrifugação, foi avaliado o sódio e cloro presentes na saliva, determinados pelo equipamento ABL mod 835 Radiometer® (Dinamarca). **Resultados:** Para análise estatística usamos o programa SPSS11 e aplicamos o Teste T para ambos os parâmetros. Encontramos nos pacientes com FC níveis de Cloro e Sódio maior quando comparado ao grupo controle, com diferença estatisticamente significativa para ambos os parâmetros. Sódio com média (12,49±4,70) no grupo controle e (20,64±12,65) no grupo FC, para o Cloro (18,21±8,42) no grupo controle e (28,04±13,48) no grupo FC. Não houve diferença estatisticamente significativa para a idade entre os grupos (13,45±6,05) no grupo controle e (12,7±6,8) na FC. **Discussão:** A análise da saliva com finalidade diagnóstica se fundamenta na possível correlação de parâmetros bioquímicos entre os constituintes salivares e plasmáticos. Os valores dos ions da saliva avaliados são dependentes da atuação da proteína CFTR, presente na membrana plasmática dos ductos salivares e sofre alteração em seu valor dependendo da presença ou ausência da proteína expressa e/ou funcional nessa glândula. **Conclusão:** Apesar dos resultados obtidos até o presente momento apontarem a saliva como um potencial recurso ao diagnóstico da FC, ainda serão necessários mais estudos que respaldem essa hipótese.

18105 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL, AO NASCIMENTO, DE CRIANÇAS FIBROCÍSTICAS DIAGNOSTICADAS PELA IMAGEM NEONATAL

ANA REGINA LOPES DEL CASTRO (UNICAMP) – BRASL

ANDRA SARAIVA (UNICAMP) – BRASL

LUIS ANDRÉ DEL CASTRO (UNICAMP) – BRASL

MARIS REZ MACHADO FERNANDES (UNICAMP) – BRASL

CAROLINA OLIVEIRA FERREZ (UNICAMP) – BRASL

Palavras-Chave: Fibrose Cística; Termão neonatal; Estado nutricional.

Introdução: O estado nutricional dos portadores de Fibrose Cística é importante por diversos aspectos em todas as faixas etárias e mantém-se adequado desde os primeiros anos de vida é de extrema importância, principalmente para otimizar o desenvolvimento pulmonar e prover estímulo de reservas energéticas necessárias no decorrer da doença. A avaliação do estado nutricional auxilia a tomada de decisões terapêuticas individualizadas, portanto, interpretá-lo desde o nascimento é de suma importância. Alguns estudos revelam que crianças fibrocísticas podem ser pequenas já ao nascimento e o motivo encontra-se em investigação. **Objetivo:** Descrever o estado nutricional ao nascimento, das crianças fibrocísticas diagnosticadas pela triagem neonatal. **Métodos:** Estudo descritivo. Levantamento de prontuários dos 17 pacientes diagnosticados pela triagem neonatal em centro de referência a partir de 2006. As variáveis estudadas foram: sexo, idade gestacional (a termo ≥ 37 semanas, pré-termo < 37 semanas), peso ao nascer (kg), comprimento ao nascer (cm), todos conferidos nos cartões com os dados de nascimento das crianças. Utilizou-se o programa Anthro (UNICEF). Os índices antropométricos analisados foram WHZ, HAZ, WAZ, e BAZ e os seguintes pontos de corte considerados: alteração do estado nutricional (score ≤ -2 ou score $\geq +2$) e risco nutricional ($-1,5 >$ score $\geq +2$). **Resultados:** 17 crianças, 54,7% (11/17) M, 100% a termo. A média do peso ao nascer (kg) foi igual a 3,0; DP 0,42 (mediana 2,9; min 2,3 e máx 3,7). A média de estatura (cm) ao nascer foi igual a 47,5; DP 3,85 (mediana 49; min 43 e máx 50). Os indicadores antropométricos apontaram as seguintes médias e percentuais, respectivamente: WHZ = -0,58 (DP = 1,1); 7,1% (score $\geq +2$), HAZ = -1,02 (DP = 1,55); 29,4% (score ≤ -2) ou 17,6% (score ≤ -3), WAZ = -0,67 (DP = 0,97); 11,8% (score ≤ -2), BAZ = -0,19 (DP = 1,05); 0% (score ≤ -2) e 11,8% (1 Le score ≤ -2). **Conclusões:** A menor média foi a de HAZ (-1,02), já considerada risco nutricional com elevada distribuição percentual (29,4%) abaixo de score ≤ -2 . WAZ, WHZ e BAZ seriam as ordens decrescentes das demais médias. Entusa estes três últimos indicadores se encontrassem em níveis de normalidade, suas médias foram negativas e WAZ quase atingiu níveis de risco nutricional. As crianças dessa amostra nasceram pequenas, porém sem comprometimento expressivo do peso que pudesse alterar os outros indicadores nutricionais além de HAZ.

18106 MUTAÇÕES NO GENE CFTR E SUA ASSOCIAÇÃO COM PRESENÇA DE IONS NA SALIVA DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

ALINE FERREIRA CONCEIÇÃO (UNICAMP) – BRASL

FERNANDO AUGUSTO DE LIMA MARIN (UNICAMP) – BRASL

ANDRA MARIA DELAGUA DE MENDONÇA (UNICAMP) – BRASL

JOSÉ TORRES MORENO (UNICAMP) – BRASL

ANTONIO FERNANDO RIBEIRO (UNICAMP) – BRASL

ELSA APARECIDA MARTINS (UNICAMP) – BRASL

CRISTINA SIBRELL LEVY (UNICAMP) – BRASL

Palavras-Chave: Diagnóstico; Saliva.

Introdução: Mutações no gene CFTR podem ser agrupadas em seis classes que refletem a biossíntese proteica ou alterações funcionais na proteína, podendo ser consideradas graves ou leves. Mutações de classes IV, V e VI são associadas com suficiente pancreatita e fenótipo de menor gravidade. Na saliva de pacientes com fibrose cística (FC), assim como, na secreção brônquica, suco pancreático e suor, o sódio, cálcio e proteínas são elevados. Algumas doenças sistêmicas como a FC podem comprometer o funcionamento das glândulas salivares e consequentemente a produção de saliva, influenciando na quantidade e na qualidade deste fluido, uma vez que, pode afetar os constituintes químicos e propriedades físicas. O valor diagnóstico da saliva vem sendo corroborado por estudos que utilizam esse fluido para analisar substâncias importantes na elucidação diagnóstica, contudo pouco se sabe sobre a real associação dos íons na saliva e sua associação com as mutações no gene CFTR. **Objetivo:** Investigar a relação dos parâmetros bioquímicos da saliva com o sexo, idade e estado genético ($\Delta F508$, G542X, N1307K, R1162X, G551D e R553X). **Método:** Estudo transversal, incluiu 84 pacientes atendidos no setor de FC do Hospital de Clínicas/UNICAMP no ano de 2010, 44 (52,4%) sexo feminino. A coleta de saliva foi realizada com coletor apropriado, amostras foram centrifugadas, e foi avaliado o sódio, cálcio e potássio da saliva. Estudo genético realizado no laboratório de genética molecular. As mutações foram comparadas com os valores do Na, Cl e K. Análises estatísticas realizadas por dois agrupamentos: (1) todas as mutações analisadas: presença de duas mutações identificadas (MI/MI), presença de uma mutação identificada (MI/MNI) e nenhuma (MNI/MNI) e (2) apenas para mutação $\Delta F508$ - $\Delta F508$ homocigotos, heterocigotos ou com dois alelos negativos. Segundo teste foi realizado, sendo a comparação dos pacientes com duas mutações determinadas versus demais pacientes, e pacientes homocigotos $\Delta F508$ versus demais pacientes. **Resultados:** Os dados dos pacientes de acordo com o agrupamento para as mutações no gene CFTR e para a mutação $\Delta F508$ foram associados com os valores para a concentração dos íons sódio, cálcio e potássio. Porém não observamos em nenhum agrupamento associação dos valores obtidos nas dosagens dos íons com a presença de mutações identificadas, com a mutação $\Delta F508$ ou para os agrupamentos realizados para as análises estatísticas. Os valores dos íons cálcio e potássio são alterados na FC e no presente estudo, avaliados



Help

Select a website below to get this article.

Saliva - a possible method for diagnosis of cystic fibrosis?
Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology,
Volume 114, Issue 4, Page e76

You can get the full-text article here...

...if you are:



- healthcare practitioner
- interested in pay-per-view article purchase
- researcher or librarian
- student or faculty member
- visitor or subscriber to the website



- visitor or subscriber to the journal website

Learn which websites I use (cookies required)

Update your website selections

[About Article Locator](#) | [Feedback](#) | [Terms & Conditions](#) | [Privacy Policy](#)
Copyright © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

16th International Congress of Oral Pathology and Medicine na 20th Brazilian Congress Of Oral Medicine and Pathology 2012. Abstract disponível e publicado em: *Cirurgia Oral, Medicina Oral, Patologia Bucal e Radiologia Oral* (Vol. 114, n^o 4, outubro de 2012).

SUPPLEMENT 35, 2012



PEDIATRIC PULMONOLOGY



The 26th Annual North American Cystic Fibrosis Conference
Orange County Convention Center, Orlando, Florida, October 11–13, 2012

 WILEY-BLACKWELL

ISSN 8755-6863

ONLINE SUBMISSION AND PEER REVIEW
<http://mc.manuscriptcentral.com/ppul>

206

ASSESSMENT OF F/IN-PSEUDOTYPED LENTIVIRUS IN A CLINICALLY RELEVANT VECTOR FOR LUNG GENE THERAPY

Griesenbach, U.^{1,2,3,7}; Inoue, M.²; Meng, C.^{1,2}; Parley, R.^{1,2}; Chan, M.^{1,2}; Newman, N.K.^{1,2}; Brum, A.^{1,2}; Kerton, A.¹; Shookmark, A.¹; Boyd, C.A.^{2,7}; Davies, J.C.^{2,7}; Higgins, T.E.^{1,2}; Gill, D.R.^{2,7}; Hyde, S.C.^{2,7}; Innes, A.J.^{2,7}; Forrester, D.J.^{2,7}; Hasegawa, M.²; Alton, E.W.^{1,2} 1. Department of Gene Therapy, Imperial College London, London, United Kingdom; 2. DNAVEC Corporation, DNAVEC Corporation, Tsukuba, Japan; 3. Central Biomedical Services, Imperial College London, London, United Kingdom; 4. Paediatric Department, Royal Brompton Hospital, London, United Kingdom; 5. Medical Genetics Section, Centre for Molecular Medicine, Edinburgh, United Kingdom; 6. Gene Medicine Group, Nuffield Dept of Clinical Laboratory Sciences, Oxford, United Kingdom; 7. The UK CF Gene Therapy Consortium, The UK CF Gene Therapy Consortium, London, United Kingdom

Our ongoing efforts to improve pulmonary gene transfer for the treatment of lung diseases such as cystic fibrosis (CF) have led to the development of a lentiviral vector (LV) pseudotyped with the Sendai virus envelope proteins F and HN (Gotoyoshi, J Virol, Minn. Mol Therapy 2010). Moving novel therapies to the clinic requires that relevant evidence for both safety and efficacy is gathered in appropriate models. Here, we begin to place this vector onto a translational pathway to the clinic and provide a body of supportive evidence for F/IN-pseudotyped LV as a potential gene transfer agent for CF. These include: (1) a single dose produces long expression for the lifetime of the mouse (approximately 2 years), (2) only brief contact time (seconds) is needed to achieve transduction, (3) repeated daily administration leads to a dose related increase in gene expression, (4) repeated monthly administration in murine lower airways is feasible without loss of gene expression, (5) no evidence of chronic toxicity during a 2 year study period, (6) F/IN-LV transduction generates persistent gene expression in human differentiated airway cultures, and human lung slices, and *in vivo* freshly obtained primary human airway epithelial cells. The data support F/IN-LV as a promising vector for pulmonary gene therapy for a number of diseases including CF and we are now undertaking the necessary refinements to progress this vector into clinical trials.

207

A STUDY TO ESTABLISH THE AMOUNT OF ALPHA-1-PROTEINASE INHIBITOR DEPOSITED IN THE LUNGS OF HEALTHY SUBJECTS AND CYSTIC FIBROSIS PATIENTS IN TWO INHALATION MODES (TIM, TRM)

Hackausermann, S.¹; Kappeler, D.¹; Hoepich, C.¹; Klotz, C.¹; Sommerer, K.¹; Edelmann, J.M.² 1. Inamed GmbH, Götting, Germany; 2. CSL Behring, King of Prussia, PA, USA

Rationale: For efficient cystic fibrosis (CF) treatment with alpha-1-antitrypsin (A1-PIH), a concentration 20 µM is needed in the lung epithelial lining fluid to suppress neutrophil elastase and restore anti-neutrophil elastase capacity (1). Grise et al. reported that 20-80 mg of A1-PIH is needed in the lung to achieve that (2).

This study was designed to assess lung deposition of inhaled A1-PIH administered intranasally, delivered by the INeb® Adaptive Aerosol Delivery System.

Methods: In total 21 subjects (6 healthy and 15 CF subjects) inhaled a single dose of A1-PIH (77 mg/1.1 ml) using Target Inhalation Mode (TIM) and Total Breathing Mode (TBM) randomly applied. FEV₁ was measured pre- and post-dose.

Lung deposition (LD) was measured by gamma scintigraphy of the radiolabelled drug using A1-PIH plus 1% Vericald. 99mTc and expressed as percentage of filling dose and weight equivalent. Central/peripheral ratio (C/P) was determined based as shown in the Figure. Respiratory profiles including inhalation time (IT) were recorded.

Results: Two subjects dropped out for technical issues. No drop out occurred due to safety issues or study procedure. The mean results for both inhalation modes are shown in Table 1. Pre- and post-inhalation spirometry

was not different. Lung deposition and inhalation time did not vary appreciably with FEV₁.

Conclusions: Both inhalation modes had a lung deposition up to 50%; high enough to reach the desired concentration. Inhalation was short enough to be convenient for CF patients. C/P ratio indicated that about 43% of drug was deposited in the lung periphery, the site of CF disease activity. The drug was safe and all subjects could follow both inhalation modes. Treatment time is shorter for TIM than for TBM and is not impacted by reduced FEV₁.

1. McElvenny, N.G., et al. Aerosol alpha 1-antitrypsin treatment for cystic fibrosis. *Lancet*, 1991, 337: p. 392-394.
2. Grise, M., et al. Inhibition of airway proteases in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*, 2008, 32(5): p. 785-91.

Table 1. Demographic data (age, FEV₁/height), results of bronchopulmonary assessment of lung deposition (LD), inhalation time (IT) and central/peripheral ratio (C/P) obtained after inhalation in Target Inhalation Mode (TIM) or Total Breathing Mode (TBM) in healthy subjects and CF subjects

Inhalation Mo.	Age (years)	FEV ₁ (L)	TIM			TBM			
			LD (%)	IT (min)	C/P	LD (%)	IT (min)	C/P	
Healthy (n=6)	20.0	85.1 (9)	68.8	21.7	12.3	1.18	68.0	21.7	1.18
CF (n=15)	41.0	50.1 (14)	48.0	24.0	11.0	1.22	47.0	24.0	1.18

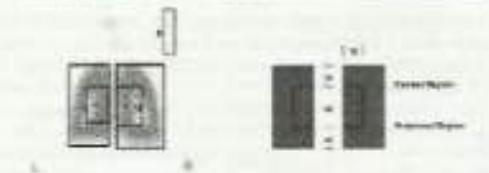


Figure 1. Schematic illustration used for determination of radiolabelled peripheral regions and its inhalation.

208

DETECTION OF SODIUM AND CHLORIDE IN THE SALIVA OF PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS BY THE TECHNIQUE OF BLOOD GAS ANALYSIS AND ITS ASSOCIATION WITH PANCREATIC DISEASE

Camargo, A.C.¹; Mesquita, R.H.²; Pascheu, L.A.³; Ribeiro, J.D.⁴; Ribeiro, A.F.⁵; Hortêncio, T.D.⁶; Levy, C.L.⁷ 1. Cívica Patology, UNICAMP, Campinas, Brazil; 2. Odontology, Centro Infantil Boldrin, Campinas, Brazil; 3. Pediatrics, Unicamp, Campinas, Brazil; 4. Clinical Medicine, Unicamp, Campinas, Brazil

In cystic fibrosis (CF), the lower output of chloride results in greater sodium reabsorption to maintain the chloride/sodium balance within the cell. The malfunctioning CFTR channel results in deficiency in the absorption of chloride and also in poor absorption of sodium, since the duct of the mucosal CFTR excretory gland stimulates the sodium channel. The mechanism of production of saliva in the salivary glands has similarities with the production of sweat.

Objectives: (1) Compare the levels of sodium and chloride in the saliva of CF patients and individuals without the disease; (2) Check for an association between pancreatic disease in CF with the levels of sodium and chloride in saliva; (3) Evaluate the sensitivity and specificity of the analysis of ions of sodium chloride in the saliva of patients with CF by the method of blood gas analysis.

Patients and Methods: Cross-sectional study, in which saliva samples were collected from 94 CF patients of the Hospital de Clínicas UNICAMP and 83 healthy subjects. All CF patients in this study had a sweat test with chloride levels > 60mmol/L and/or 2 CFTR mutations. The saliva samples were collected with Salivette (Sarstedt-Germany) and kept refrigerated until they were centrifuged at 1800 rpm for 15 minutes. Immediately after centrifugation the volume of the saliva was measured and biochemical analysis was performed. Statistical analysis was performed by Mann Whitney test, with significance level of 5%. All patients with CF who require enzyme replacement were considered to have pancreatic insufficiency. The concentrations of sodium and chloride were determined by the equipment AHI, model 835 Radiometer (Denmark).