

UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN NA DOSAGEM QUANTITATIVA DOS ELETRÓLITOS NO TESTE DO SUOR DOS FIBROCÍSTICOS

Damião do Nascimento¹, Marcos Tadeu T. Pacheco², Wellington Ribeiro³

1- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba-Av. Shishima Hifumi,2911 – Urbanova 12244-000 – São José dos Campos – SP -BrasilRua: Leôncio Duvoisin, 685, Pirabeiraba CEP 89239-310 – vidamansagenteboa@bol.com.br

2- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba-Av. Shishima Hifumi,2911 – Urbanova 12244-000 – São José dos Campos – SP –Brasil – mtadeu@univap.br

3- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba-Av. Shishima Hifumi,2911 – Urbanova 12244-000 – São José dos Campos – SP –Brasil – gton@univap.br

Resumo Nos últimos 70 anos, a fibrose cística (FC) emergiu da obscuridade para o reconhecimento como a mais importante doença hereditária, potencialmente letal, incidente na raça branca. Nos últimos 15 anos, estudos com biologia molecular em genética, transporte iônico e imunologia, culminaram com a identificação, clonagem e seqüenciamento do gene da FC, favorecendo o conhecimento dos mecanismos bioquímicos responsáveis pela fisiopatogenia da doença, abrindo novos horizontes para o aconselhamento genético e o tratamento de suas complicações (Lyczak et al., 2002). A utilização do emprego da Espectroscopia Raman na dosagem quantitativa dos eletrólitos do Na e Cl no teste do suor dos fibrocísticos (> 50mEq/L) sinaliza quanto à possibilidade desta técnica em atender as exigências de um protocolo de avaliação através de um método analítico em conformidade com as cGLP (Boas Práticas de Laboratório Vigentes) e, portanto vir a constituir - se em um novo instrumento alternativo no diagnóstico da FC.

Palavras-chaves: Fibrose cística ou Mucoviscidose; RTFC; Teste do suor; Espectroscopia Raman

Área do conhecimento: II – Ciências Biológicas

Introdução

A Fibrose Cística (FC) é uma doença hereditária autossômica recessiva. Quando cada um dos pais tem um gene para a FC, em cada gestação, o risco de nascer um filho com a doença é de 25% e de 75% sem a doença. A probabilidade de nascer um filho saudável, mas com um gene para FC, é de 50%. O gene da FC localiza-se no braço longo do cromossomo sete, no locus q31, são formados por 250 quilobases de DNA, com 27 *exons*, e tem a propriedade de codificar um RNAm de 6,5 quilobases, que transcreve uma proteína transmembrana, reguladora de transporte iônico, composta por 1.480 aminoácidos, conhecida como a CFTR é essencial para o transporte de íons através da membrana celular, estando envolvida na regulação do fluxo de Na, Cl e água (Ribeiro JD et alii, 2002).

O Raman é uma técnica que se utiliza do espalhamento em lugar da absorção, ela oferece uma ampla variedade de medições quantitativas e qualitativas e de grande flexibilidade para as análises (SZOSTAK; MAZUREK, 2002) para

pneumologista Folescu, o teste do suor continua sendo o exame “padrão-ouro” para o diagnóstico da doença, por meio dele é possível medir a quantidade de sódio e cloro no suor, já que é características dos portadores da fibrose cística apresentam; altos níveis de cloreto (sal) no suor. “Em pacientes com FC, quanto mais precocemente se estabelece o diagnóstico e o tratamento, melhora o prognóstico” (FOLESCU, 2005).

www.fiocruz.br/ccs/media/pioneirismo_valioso.pdf

O teste do suor é um procedimento não invasivo, de fácil realização, porém ainda desconhecido por muitos profissionais da área de saúde

(<http://www.hse.rj.saude.gov.br/profissional/revista/36c/post2.asp>).

Segundo SALA, (1995) entre as técnicas que permitem obter informações sobre a estrutura molecular, níveis de energia e de ligações químicas podem ser citados na Espectroscopia Raman (ER) e a espectroscopia no Infravermelho (IV). O efeito Raman é um processo fundamental, no qual a energia é trocada entre a luz e a matéria, quando a luz incide sobre uma

substância, ela pode ser espalhada ou absorvida (HANLON et al., 2000). O objetivo da pesquisa é validar a quantificação dos níveis de eletrólitos (Na e Cl) através do emprego da espectroscopia Raman no diagnóstico da Fibrose Cística, de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Vigentes (cGLP). Podendo a constituir - se em uma nova técnica analítica não invasiva.

Materiais e Métodos

Antes do início oficial do projeto em 2007, já havia um contato anterior com alguns pais pertencentes à Associação Catarinense de Assistência ao Mucoviscidótico (ACAM) de Santa Catarina, atualmente congregam cerca de 160 casais que pelo menos possuem um indivíduo afetado. No início do ano de 2001, foram realizadas as primeiras entrevistas semi-estruturadas com a participação de quatro integrantes da família os pais e dois filhos jovens adultos, o mais velho é portador do gene da (FC) e outro é afetado todos participam regularmente das reuniões mensais da ACAM. Para compreensão doença e do método empregado nas amostras serão realizadas visitas aos laboratórios de Análises Clínicas KG e Joinlab de Joinville, ambos responsáveis diretos pelo teste do suor.

Ocorrerá o processo de forma pragmática de esclarecimentos sobre a natureza do trabalho, donde originarão termos de consentimento entre as partes de forma voluntariosa. Serão formados dois grupos A e B: o primeiro com pacientes previamente diagnosticados com a (FC) o segundo grupo passará por triagem, aconselhamento genético, tendo como base à presença de uma ou mais características fenotípicas. Fatores excludentes: idade, gênero e cor. O material a ser analisado "o suor", prospectiva coleta durante o período de setembro a novembro 2007, os pacientes se submeteram à coleta do suor com técnicos de análises clínicas especializados no diagnóstico da doença. A princípio os pacientes com a (FC), ainda se submeterão a captação de suor do pelo o método usual da estimulação local através da iontoforese com nitrato de pilocarpina, método descrito por Gibson & Cooke (1959). No grupo B, a captação do suor se efetuará preferencialmente no braço, utilizando-se seringa descartável. Quanto ao armazenamento será utilizado recipiente de metal banhado em níquel-cromo, as quais serão mantidas na temperatura de 36° Celsius, eliminando desta forma qual quer contacto com as amostras e evaporação. "Posteriormente os materiais serão transportados, transferidos e submetidos à Espctroscopia Raman para análises qualitativa e quantitativa em tempo real".

Resultados

Espera-se que os valores das amostras do suor, analisados pela técnica da Espectroscopia Raman estejam em conformidades ou acima dos valores esperados >60mEq/l em fibrocísticos, a técnica óptica viabiliza e caracteriza as moléculas de acordo com as vibrações moleculares dos biocomponentes presentes nos materiais, é uma das ferramentas de escolha para análise da bioquímica dos tecidos de alta velocidade analítica e alta resolução gráfica, método não-destrutivo, multi-elementar e simultâneo de precisão, caracterização ou monitoriza das patologias, fornecem um diagnostico mais preciso com resultados em tempo real. Portanto, tendo vista as vantagens da espectroscopia Raman é importante que esta técnica futuramente seja usada em larga escala em clínicas médicas.

Discussão

Segundo o médico geneticista Salmo Raskin (2001), a sua descoberta de que a fibrose cística era pouco diagnosticada no Brasil, tendo sido encontrada inclusive em afro-brasileiros, onde a doença é considerada raríssima. Apesar de a doença ser muito rara em africanos e seus descendentes, Raskin detectou 40 casos da doença inclusive entre afro-brasileiros, por causa da mistura das raças no Brasil. Nesse caso, foram os imigrantes europeus que trouxeram o gene da fibrose cística para dentro da população afro-brasileira. É, portanto, no Brasil, uma doença que atinge todos os grupos étnicos de todos os Estados. Esse resultado confirma que cerca de 70% dos casos no Brasil não são diagnosticados. Em média, um em cada 43 brasileiros do Sul e Sudeste do Brasil tem propensão hereditária a terem filhos com fibrose cística. Em cada 1.849 casais, um tem chance de 25% de ter um filho com essa grave doença.

(www.novomilenio.inf.br/ano01/0102b015.htm).

A presença de dois alelos com mutações; no gene da FC provoca ausência de atividade, ou funcionamento parcial da CFTR, causando redução na excreção do cloro e aumento, do eletro negatividade intracelular, resultando em maior fluxo de Na para preservar o equilíbrio eletroquímico e, secundariamente, de água para a célula por ação osmótica. Ocorre então, desidratação das secreções mucosas e aumento da viscosidade, favorecendo a obstrução dos ductos, que se acompanha de reação inflamatória e posterior processo de fibrose KNOWLES, (1986).

O diagnóstico da FC é sugerido pelas manifestações clínicas e confirmado pela demonstração de níveis elevados de cloro no suor

(cloro igual ou maior que 60mEq/l); a história familiar, aproximadamente 90% dos pacientes tem insuficiência pancreática exócrina e azoospermia obstrutiva está presente na maioria dos homens WESLSH, et al. (1995). Segundo Tânia Folescu o teste do suor laboratorial iontoforese com pilocarpina em FC proposto por Gibson & Cooke, (1959), continua sendo o exame "padrão-ouro" para o diagnóstico da doença, quanto mais precocemente se estabelece o diagnóstico e o tratamento, melhor o prognóstico. O teste do suor é um procedimento não invasivo, de complexidade técnica, ainda desconhecida por multiprofissionais é realizado somente em poucos laboratórios.

www.hse.rj.saude.gov.br/profissional/revista/36c/post2.asp

Apesar de não existir cura para essa doença, nova abordagem sobre a etiologia e a fisiopatologia, adquiridos nas duas últimas décadas, novos tratamentos decorrentes dos conhecimentos de pesquisas recentes, têm sido a chave para o aumento da sobrevida e a melhora da qualidade de vida dos pacientes com fibrose cística Collins.

(www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021).

Tabela 1-

| Estado | Incidência da (FC) | Pessoas portadoras do Gene (FC) |
|--------|--------------------|---------------------------------|
| RS | 1 em 1.587. | 1 em 20 |
| SC | 1 em 12.048 | 1 em 56 |
| PR | 1 em 6.803 | 1 em 42 |
| SP | 1 em 32.258 | 1 em 90 |
| MG | 1 em 20.408 | 1 em 72 |
| TOTAL | 1 em 7.358 | 1 em 43 |

Fonte: Laboratório Genetika

Considerações finais

Em média, um em cada 43 brasileiros do Sul e Sudeste do Brasil tem propensão hereditária a ter filhos com fibrose cística. Em cada 1.849 casais, um tem chance de 25% de ter um filho com essa grave doença. Existe uma estimativa de

que menos de 10% do total anual de casos são diagnosticados. O diagnóstico da FC é sugerido pelas manifestações clínicas e confirmado pela demonstração de níveis elevados de cloro no suor (cloro igual ou maior que 60mEq/l) é a grande quantidade de cloro e sódio encontrada no suor dos pacientes, se detectado mais precocemente se estabelece o diagnóstico reduzindo-se a velocidade de evolução da doença. Portanto precisa-se de um novo método rápido e eficaz, capaz de simplificar o teste de suor, minimizar eventuais desconfortos aos pacientes durante o teste e eliminar as preocupações sobre amostras perdidas ou comprometidas durante as fases de coleta e análise. Com o advento da nova técnica Espectroscópica Raman em tempo real o diagnóstico poderá ser feito precocemente na infância para que a doença seja "controlada", mantida com o tratamento adequado, as crianças podaram ter uma vida muito parecida com as outras crianças. Contudo sem o diagnóstico e o tratamento, as perspectivas de vida para as crianças serão muito pequenas, infelizmente.

Agradecimentos

A Secretaria de Educação Ensino e Tecnologia; ao Laboratório de Análises Clínicas KG de Joinville – SC. "Á ACAM e aos fibrocísticos",

Referências:

-GIBSON, L.E. & COOKE, R.E.—A test for concentration of electrolyte in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine iontophoresis. *Pediatrics* 23: 545 1959.

-HALON, EB. et al. **Prospects for in vivo Raman spectroscopy.** *Phys. Med. Biol.* v. 45, R1-R59, 2000.

-Hospital dos Servidores do Estado – Rev. Médica Vol. 36, Permitindo o diagnóstico de fibrose cística em pacientes. Disponível em: <http://www.hse.rj.saude.gov.br/profissional/revista/36c/post2.asp> - Acesso em: 02 Jul 2007

-LYCZAK JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2): 194-222. **[PDF]** [Pioneirismo valioso](#)

-RASKIN, Salmo. Fibrose cística tem seqüenciamento genético. Disponível em: <http://www.novomilenio.inf.br/ano01/0102b015.htm> . Acesso em 02, Jul de 2007.

-RIBEIRO JD et alii Controvérsias na fibrose cística. **Jornal de Pediatria S186** Vol. 78, Supl. 2,

2002 by Sociedade Brasileira de Pediatria 0021-7557/02/78-Supl.2/S171. Disponível em : <http://www.scielo.br/pdf/jped/v78s2/v78n8a08.pdf> Acesso em 02, Jun de 2007.

-SALA, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no infravermelho. São Paulo: UNESP, 1995.

-SZOSTAK, R.; MAZUREK, S. Quantitative determination of Acetylsalicylic Acid and acetaminophen in tables by FT- Ram Spectroscopy. *Analyst*. v. 127, n, p. 144 –148, 2002.

-Unidade materno-infantil da **Fiocruz**. Trata-se da medida da diferença de potencial nasal (DPN), **exame... IFF implanta novo exame para doença genética...** Disponível em: http://www.fiocruz.br/ccs/media/pioneirismoalios_o.pdf Acesso em 02, de Jun de 2007.

- WESLSH MJ, TSUI LC, BEAT TF, BEAUDET AL, Sly WC. **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995. p.3799-879.