

JOAQUIM CARLOS RODRIGUES

**Análise do efeito agudo do brometo de tiotrópio
na função pulmonar de crianças e adolescentes
com fibrose cística**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Professor Livre-Docente junto ao
Departamento de Pediatria (Disciplina
Pediatria Clínica)

**SÃO PAULO
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Joaquim Carlos

Análise do efeito agudo do brometo de tiotrópio na função pulmonar de crianças e adolescentes com fibrose cística / Joaquim Carlos Rodrigues. -- São Paulo, 2008.

Tese(livre-docência)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Pediatria, Disciplina de Pediatria Clínica.

Descritores: 1.Fibrose cística/terapia 2.Broncodilatadores 3.Antagonistas colinérgicos 4.Testes de função respiratória 5.Espirometria 6.Pletismografia 7.Medidas de volume pulmonar 8.Resistência das vias respiratórias

USP/FM/SBD-286/08

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa Rosana pelo apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos de elaboração desta tese.

Aos meus filhos amáveis e maravilhosos: Daniella e Rafael.

À minha dócil mãe Encarnação.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Sandra Grisi e à Profa. Magda Maria de Sales Carneiro, Professoras Titulares do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade, pelo apoio e incentivo constante para a realização do meu concurso para Professor Livre Docente.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho da Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança do HCFMUSP: Fabiola Villac Adde, Luiz Vicente Ferreira da Silva Filho, Claudine Sarmento da Veiga, Daniella Wickbold, Joselina M. de Andrade Cardieri, Cleyde Miriam A Nakaie e Marina Buarque de Almeida pela contribuição que tiveram na realização desta pesquisa e pela compreensão durante a preparação desta tese.

Ao meu amigo Prof. Dr. Cláudio Leone pelos ensinamentos estatísticos e pelo seu auxílio inestimável na realização e interpretação da análise estatística.

À Sra. Maria Inês Lopes e Srta. Vanessa de Araújo Lopes, técnicas do Laboratório de Provas de Função Pulmonar do Instituto da Criança do HCFMUSP, pela eficiência, paciência e dedicação com que realizaram todos os testes de espirometria e de pletismografia.

À Elaine Maria Segato Izzo pela formatação das tabelas e padronização dos desenhos gráficos.

À Maria Helena Vargas e Priscila Vargas Gois meu carinho e gratidão especial pelo empenho e pela realização de todo o projeto gráfico de elaboração desta tese.

À Mariza Kazue U. Yoshikawa, bibliotecária do Instituto da Criança do HC-FMUSP pelo auxílio na busca das referências bibliográficas.

Aos meus queridos pacientes com fibrose cística e seus familiares que docilmente e com sacrifício participaram deste estudo. São elas as razões, a minha motivação e a minha vontade de continuar a fazer pesquisas.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	001
1.1	Genética da Fibrose Cística	003
1.2	A Patogênese da Doença Pulmonar	008
1.3	Conseqüências da Infecção e Inflamação das Vias Aéreas na Função Pulmonar de Pacientes com FC	013
1.4	O Manejo da Doença Pulmonar	015
1.5	O Uso de Broncodilatadores em Fibrose Cística.....	016
1.6	Anticolinérgicos Inalados	019
1.7	Brometo de Tiotrópio	021
1.7.1	Farmacologia e ação.....	021
1.7.2	Eficácia clínica	022
1.7.2.1	Efeito broncodilatador e estudos de dose resposta	022
1.7.2.2	Estudos de dose-resposta	023
1.7.2.3	Estudos de longo prazo em pacientes com DPOC.....	025
1.7.2.4	Efeito nos volumes estáticos pulmonares e outros efeitos fisiológicos	027
1.7.2.5	Evolução de sintomas.....	029
1.7.2.6	Qualidade de vida.....	029
1.7.2.7	Exacerbações da DPOC	030
1.7.3	Segurança e efeitos adversos	031
1.8	Justificativa	033
1.9	Hipóteses.....	034
2	OBJETIVO.....	035
3	MÉTODOS	037
3.1	Casuística.....	038
3.2	Métodos	038
3.2.1	Crítérios de inclusão e exclusão	038
3.2.2	Delineamento do estudo	039
3.2.3	Avaliação da gravidade da doença	040
3.2.4	Provas de função pulmonar	041
3.2.5	Análise estatística.....	041
4	RESULTADOS.....	044

5	DISCUSSÃO.....	068
5.1	O Papel do Sistema Colinérgico na Fisiopatologia da Doença Pulmonar da FC	073
5.2	A Análise do Efeito do Tiotrópio Sobre os Parâmetros Espirométricos.....	076
5.3	Análise do Efeito Sobre os Volumes Pulmonares	084
5.4	Considerações Sobre os Efeitos Adversos	089
5.5	Considerações Finais.....	089
6	CONCLUSÕES.....	092
7	ANEXOS.....	094
8	REFERÊNCIAS.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	- Aspergilose broncopulmonar alérgica
AC	- Acetilcolina
ATS	- American Thoracic Society
CAPpesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CI	- Capacidade inspiratória
CVF	- Capacidade vital forçada
DPOC	- Doença pulmonar obstrutiva crônica
ERS	- European Respiratory Society
FC	- Fibrose cística
FDA	- Food and Drug Administration
FEF 25-75%	- Fluxo expiratório forçado entre 25%-75% da CVF
IDT	- Índice de dispnéia transicional
IL	- Interleucinas
IMC	- Índice de massa corpórea
PFE	- Pico de fluxo expiratório
PFP	- Provas de função pulmonar
PVI	- Peptídeo vasoativo intestinal
QRSG	- Questionário Respiratório de St George
TNF alfa	- Fator de necrose tumoral
VC	- Volume corrente
VEF1	- Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VR	- Volume residual
VR/CPT	- Relação entre o volume residual e a capacidade pulmonar total
VRE	- Volume de reserva expiratório

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados demográficos e características gerais dos pacientes com fibrose cística randomizados	046
Tabela 2 -	Dados dos parâmetros espirométricos e pletismográficos basais nos momentos pré-administração do tiotrópio (Grupo A) e do placebo (Grupo B)	047
Tabela 3 -	Resultados das médias das medidas espirométricas em relação ao previsto da CVF e do VEF1 na situação basal e nos diferentes momentos de avaliação após a administração de tiotrópio e placebo. Análise estatística comparativa entre as medidas repetidas no grupo tiotrópio nos diferentes momentos e entre o grupo tiotrópio e placebo em cada momento correspondente da avaliação.....	049
Tabela 4 -	Resultados das médias das medidas espirométricas em relação ao previsto do FEF 25-75% e da relação VEF1/CVF na situação basal e nos diferentes momentos de avaliação após a administração de tiotrópio e placebo. Análise estatística comparativa entre as medidas repetidas no grupo tiotrópio nos diferentes momentos e entre o grupo tiotrópio e placebo em cada momento correspondente da avaliação.....	049
Tabela 5 -	Resultados das médias das medidas pletismográficas, em relação ao previsto, do VR, CPT e da relação VR/CPT na situação basal e nos diferentes momentos de avaliação após a administração do tiotrópio e placebo. Análise estatística comparativa entre as medidas repetidas no grupo tiotrópio nos diferentes momentos e entre o grupo tiotrópio e placebo em cada momento correspondente da avaliação	050

Tabela 6 -	Resultados das médias das medidas pletismográficas da resistência e condutância das vias aéreas e da capacidade inspiratória (CI) na situação basal e nos diferentes momentos de avaliação após administração de tiotrópio e placebo. Resultados da análise estatística comparativa entre as medidas repetidas no grupo tiotrópio nos diferentes momentos e entre o grupo tiotrópio e placebo em cada momento correspondente da avaliação	051
Tabela 7 -	Resultados das medidas da frequência cardíaca, frequência respiratória, pressões sistólica e diastólica e oximetria de pulso na situação basal e nos diferentes momentos de avaliação após a administração de tiotrópio. Análise estatística comparativa entre as médias (ANOVA) ou das medianas (teste não paramétrico de Friedman) para as medidas repetidas no grupo tiotrópio nos diferentes momentos.....	067

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da CVF (capacidade vital forçada) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18 mcg de tiotrópio. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes momentos analisados..... 053
- Gráfico 2 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas do VEF1 (volume expiratório forçado no primeiro segundo da capacidade vital forçada) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18mcg de tiotrópio. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes momentos analisados 053
- Gráfico 3 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da relação VEF1/CVF no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18mcg de tiotrópio. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes momentos analisados 054
- Gráfico 4 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas do FEF 25-75% no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18 mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos basal e no momento 24 horas..... 055
- Gráfico 5 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas do VR (volume residual) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18 mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos basal e 180 minutos e entre o basal e 24 horas 056

- Gráfico 6 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da CPT (capacidade pulmonar total) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18 mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos basal e 24 horas 056
- Gráfico 7 - Representação gráfica das médias das medidas da relação VR/CPT (relação do volume residual com a capacidade pulmonar total) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos basal e 180 minutos e entre o basal e 24 horas 057
- Gráfico 8 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da condutância das vias aéreas no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18 mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre o momento basal e todos os outros momentos analisados..... 058
- Gráfico 9 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da resistência das vias aéreas no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos basal e 180 minutos e entre o basal e 24 horas 058
- Gráfico 10 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da capacidade inspiratória (CI) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18mcg de tiotrópio. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes momentos analisados 059
- Gráfico 11 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas da CVF e da sua tendência de evolução, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação. Estão também expressas no gráfico, as comparações entre as médias dos valores, em ambos os grupos, nos percentis 15 e 85 061

Gráfico 12 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas do VEF1 e da sua tendência de evolução, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação. Estão também expressas no gráfico, as comparações entre as médias dos valores, em ambos os grupos, nos percentis 15 e 85	062
Gráfico 13 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas do FEF25-75% e da sua tendência de evolução, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação. Estão também expressas no gráfico, as comparações entre as médias dos valores, em ambos os grupos, nos percentis 15 e 85	062
Gráfico 14 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas da CPT, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação.....	063
Gráfico 15 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas do volume residual (VR), entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação	064
Gráfico 16 - Representação gráfica da comparação das medias dos valores percentuais da relação VR/CPT, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação.....	064
Gráfico 17 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas da resistência das vias aéreas, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação.....	065
Gráfico 18 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas da condutância das vias aéreas, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação.....	066
Gráfico 19 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas da capacidade inspiratória (CI), entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação.....	066

RESUMO

Rodrigues JC. *Análise do efeito agudo do brometo de tiotrópio na função pulmonar de crianças e adolescentes com fibrose cística* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Desconhece-se, até o momento, o efeito funcional de medicamentos anticolinérgicos de longa ação, em pacientes com fibrose cística (FC), apesar do seu uso habitual, com segurança e eficácia, em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). **OBJETIVO:** Este estudo teve por objetivo avaliar a resposta funcional aguda ao brometo de tiotrópio em crianças e adolescentes com fibrose cística. **MÉTODOS:** O desenho da pesquisa foi transversal, prospectivo, duplo cego, randomizado, cruzado e placebo controlado. Foram incluídos 20 pacientes, 10 do sexo masculino, com doença estável, na faixa etária dos 6 aos 20 anos (média: 12,7anos), fora de agudização pulmonar, com VEF1 acima de 40% na condição basal (média de 70,4% \pm 14,4 % do previsto), aptos para inalar medicamentos na forma de pó, randomizados através de uma tábua de randomização aleatória para receber brometo de tiotrópio (A) ou placebo(B). Foram obtidos parâmetros espirométricos e pletismográficos, seguindo as normas da American Thoracic Society: capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), relação VEF1/CVF, fluxo médio expiratório entre os 25 e 75% da CVF (FEF 25-75%), capacidade pulmonar total (CPT), volume residual (VR), relação VR/CPT, condutância e resistência das vias aéreas e capacidade inspiratória (CI). Todos os parâmetros foram medidos na condição basal e 30, 60, 180 minutos e 24h após a inalação da droga ou placebo. Após sete dias, os medicamentos foram invertidos (se o paciente recebia A recebia B e vice-versa) e foram executados e repetidos os mesmos parâmetros funcionais basais e nos mesmos momentos que os testes anteriores. Como desfecho principal foram analisadas as mudanças significativas nos parâmetros espirométricos e de pletismografia em cada tempo observado a partir dos valores basais no grupo tiotrópio e as diferenças significativas, nos diferentes momentos, em relação ao grupo placebo. A análise estatística foi realizada pelo teste de análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), teste de Tukey-Krumer e teste de T de Student. **RESULTADOS:** Com relação à comparação das médias percentuais dos valores basais em relação ao previsto com as

medidas sucessivas nos diferentes momentos da avaliação, houve aumento significativo do FEF 25-75% no momento 24h pós tiotrópio ($p = 0,0397$); não houve variação significantes nos parâmetros CVF, VEF1, relação VEF1/CVF e na CI. Houve redução significativa do VR nos momentos 180 min ($p = 0,0122$) e 24h ($p = 0,0229$), da CPT no momento 24h ($p = 0,0468$) e da relação VR/CPT nos momentos 180 min ($p = 0,0119$) e 24h ($p = 0,0395$). Houve um aumento significativo da condutância das vias aéreas em todos os momentos da avaliação ($p < 0,05$) e redução significativa da resistência nos momentos 180 min ($p = 0,0261$) e 24h ($p = 0,049$). Na comparação das médias percentuais dos valores previstos do grupo tiotrópio em relação ao placebo, nos diferentes momentos, houve aumento significativo na CVF ($p = 0,0469$); VEF1 ($p = 0,0462$) e no FEF 25-75% ($p = 0,007$); redução no VR ($p < 0,0001$), na CPT ($p = 0,0468$) e na relação VR/CPT ($p = 0,0005$); aumento da condutância das vias aéreas nos momentos 180 min ($p = 0,0495$) e 24h ($p = 0,0013$) e redução da resistência no momento 24h ($p = 0,0213$). Não houve efeitos adversos significantes pelo uso do tiotrópio. **CONCLUSÕES:** O uso do tiotrópio, nesta casuística, melhorou agudamente a obstrução de pequenas e grandes vias aéreas, aumentou a condutância e reduziu significativamente a resistência, aprisionamento aéreo e a hiperinsuflação pulmonar. São necessários novos estudos para avaliar o impacto do tiotrópio em longo prazo, na função pulmonar e na melhora da dispnéia, no consumo de oxigênio e na qualidade de vida de pacientes com fibrose cística.

Descritores: Fibrose cística. Broncodilatadores. Antagonistas colinérgicos.
Testes de função respiratória. Espirometria. Plestimografia.
Medidas de volume pulmonar. Resistência das vias respiratórias.

SUMMARY

Rodrigues JC. *Analysis of the acute effect of the tiotropium bromide in children and teenagers with cystic fibrosis* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

The functional effect of long-acting *anticholinergic* agents in patients with *cystic fibrosis* (CF) is still unknown, despite the fact that this drug is frequently used, safe and effective, in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **OBJECTIVE:** The objective of this study is to evaluate the acute functional response to tiotropium bromide in children and teenagers with cystic fibrosis. **METHODS:** The study design was transversal, prospective, double-blind, randomized, *cross-over* and placebo-controlled. Twenty CF patients were included, 10 male patients, with stable disease, age range 6 to 20 years (average: 12.7 years) without pulmonary exacerbations, with an FEV1 above 40% in the baseline condition (average of 70.4% \pm 14.4% of the predicted), able to inhale medication in powder form, randomized using a random board to receive tiotropium bromide (A) or placebo (B). The spirometric and pletismographic parameters were obtained following the American Thoracic Society recommendations: forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in the first second (FEV1), FEV1/CVF ratio, average peak expiratory flow between 25 and 75% of the FVC (FEF 25-75%), total lung capacity (TLC), residual volume (RV), RV/TLC ratio, conductance and resistance of the airways and inspiratory capacity (IC). All the parameters were measured in the basal condition and at 30, 60, 180 minute intervals and 24 hours after the inhalation of the drug or placebo. After seven days, the medications were inverted (if the patient was receiving A, they then received B, and vice-versa) and the same basal and functional parameters were performed and repeated at the same time intervals as in the previous tests. The main outcome measures were the analysis of the significant changes in the spirometric and pletismographic parameters at each time intervals observed compared to the basal values in the tiotropium group and also the significant differences, at the different time intervals, in relation to the placebo group. The statistical analysis was performed using the test of variance analysis for repeated measures (ANOVA), the Tukey-Krumer test and the T-Student test. **RESULTS:** Regarding the comparison of the percentile averages of the basal values in relation to the predicted results

with the successive measurements at the different time intervals of the evaluation, there was a significant increase of FEF 25-75% at the 24-hour time interval after the tiotropium ($p = 0.0397$); there was no significant variation in the parameters FVC, FEV1, FEV1 / FVC ratio and the IC. There was a significant reduction of RV at the time intervals: 180 min ($p = 0.0122$) and 24 hours ($p = 0.0229$), of the TLC at the 24-hour time interval ($p = 0.0468$) and of the RV/TPC ratio at 180 min ($p = 0.0119$) and 24 hours ($p = 0.0395$). There was a significant increase of the conductance of the airway in all the time intervals of the evaluation ($p < 0.05$) and a significant reduction of the resistance at 180min ($p = 0.0261$) and 24 hours ($p = 0.049$). The mean percentage's values in relation to predicted for the tiotropium compared to the placebo group, at different time intervals, showed a significant increase in the FVC ($p = 0.0469$); FEV1 ($p = 0.0462$) and in FEF 25-75% ($p = 0.007$); reduction in RV ($p < 0.0001$), in TLC ($p = 0.0468$) and in the RV/TLC ratio ($p = 0.0005$); increase of the conductance of the airways at 180min ($p = 0.0495$) and 24 hours ($p = 0.0013$) and reduction of resistance at the 24-hour time interval ($p = 0.0213$). There were no significant side-effects using tiotropium. **CONCLUSIONS:** The use of tiotropium, in this casuistic, improved the obstruction of small and large airways acutely, increased the conductance and reduced the resistance and significantly reduced the air trapping and the pulmonary hiperinsuflation. New studies are required to evaluate the impact of long-term tiotropium use in lung function and in the improvement of the dyspnea, oxygen consumption and the quality of life of patients with cystic fibrosis.

Descriptors: Cystic fibrosis. Bronchodilator agents. Cholinergic antagonists. Respiratory function tests. Spirometry. Plethysmography whole body. Lung volume measurements. Airway resistance.

1 INTRODUÇÃO

A **fibrose cística (FC)** ou **mucoviscidose** é uma doença de herança autossômica recessiva complexa, com acometimento multisistêmico, que afeta primordialmente a função dos tecidos exócrinos e evolui de forma crônica e progressiva com extensão até a idade adulta¹⁻⁴. É a doença genética letal mais comum, com uma incidência aproximada na raça branca de 1 em 2500 nascimentos, porém seu reconhecimento tem sido também importante em outras etnias⁴. É menos freqüente na raça negra e rara na oriental (respectivamente 1/17.000 e 1/90.000 nascimentos)². No Brasil, os dados obtidos a partir dos estados onde houve implantação do programa de triagem neonatal mostram uma incidência de 1/9.500 nascimentos no Paraná⁵, 1:8700 em Santa Catarina⁶ e 1:10.000 em Minas Gerais⁷. As variações geográficas possivelmente decorrem de migrações e miscigenações que ocorreram na população brasileira⁸.

Nas últimas décadas, a sobrevida dos pacientes portadores de FC vem aumentando significativamente, com mediana atual de sobrevida de cerca de 35 anos em países europeus e norte-americanos^{9,10}. Atualmente quase 40% dos pacientes com FC nos EUA são adultos^{10,11}. A mediana de sobrevida prevista para crianças afetadas nascidas no século XXI é agora mais que 50 anos¹². Este impacto na longevidade resultou da introdução de novas estratégias no manejo terapêutico da doença pulmonar, da

intervenção precoce na melhoria do estado nutricional e do aumento da implementação do teste de triagem neonatal facilitando o diagnóstico precoce dessa doença^{2,13,14}.

1.1 Genética da Fibrose Cística

O gene da FC foi identificado em 1989 por Riordan *et al.*¹⁵, situa-se no braço longo do cromossomo 7, na região 7q31.2q31.3 e é constituído por 27 exons¹⁶. Ele é denominado gene regulador do transporte transmembrana da fibrose cística (gen CFTR - cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) e codifica a produção da proteína CFTR¹⁷. A proteína CFTR é uma glicoproteína composta por 1480 aminoácidos que se expressa em muitas células epiteliais e tem varias funções nem todas elas ligadas à FC¹⁸ (Figura 2). A função primária da proteína, regulada pelo AMP cíclico, é trabalhar como um canal de cloro controlando o conteúdo líquido na superfície apical epitelial através da secreção de cloro e inibição da absorção de sódio, mantendo assim a homeostase de íons e fluido^{18,19}. Atualmente são conhecidas mais de 1.600 mutações nesse gene que levam à fibrose cística, sendo a mais comum a chamada $\Delta F508$, que ocorre por uma deleção da fenilalanina no códon 508 (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). Nos estudos realizados na América do Norte e na Europa a mutação $\Delta F508$ está presente em cerca de 70% dos pacientes com FC, com variações geográficas^{10,20}. Na população brasileira de pacientes com FC ela é menos freqüente, variando entre 30,7% a 50,8%, segundo as diferentes regiões

onde foi pesquisada²¹⁻²⁷, o que demonstra a nossa grande miscigenação racial^{27,28}. Em pesquisa realizada no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) observamos que, de 108 pacientes analisados quanto á presença da mutação $\Delta F508$, 21,3% eram homozigotos, 46,3% heterozigotos e 32,4% não eram portadores dessa mutação²⁹.

Tem-se observado uma alta heterogeneidade no espectro de mutações no gene CFTR em diferentes populações, particularmente no sul da Europa e na América Latina^{28,30,31}. Dependendo do nível celular da seqüência de produção, armazenamento, transporte e ação onde a proteína CFTR é alterada, as mutações CFTR são divididas em seis classes. As mutações de classes I a III podem causar perda total da função, enquanto que as de classes IV, V e VI causam disfunção parcial (Figura 2)³². A extensa variação no defeito molecular resultante das mutações no gene CFTR explica a diversidade fenotípica e na gravidade da doença, havendo desde casos muito graves com manifestação precoce e, outros muito leves, por vezes subdiagnosticados ou diagnosticados apenas na idade adulta. O espectro genotípico da doença sugere a existência ainda de genes modificadores que estão envolvidos na modulação do fenótipo e na gravidade da doença³³⁻³⁵. De Boeck *et al.*³⁶ descreveram recentemente os casos típicos e atípicos de FC. Os casos atípicos ou portadores da forma não clássica da FC podem ter dosagem normal de cloro no suor ou limítrofe, os sintomas e sinais incluem doença pulmonar leve, pancreatite e ausência congênita bilateral dos vasos deferentes^{36,37}.

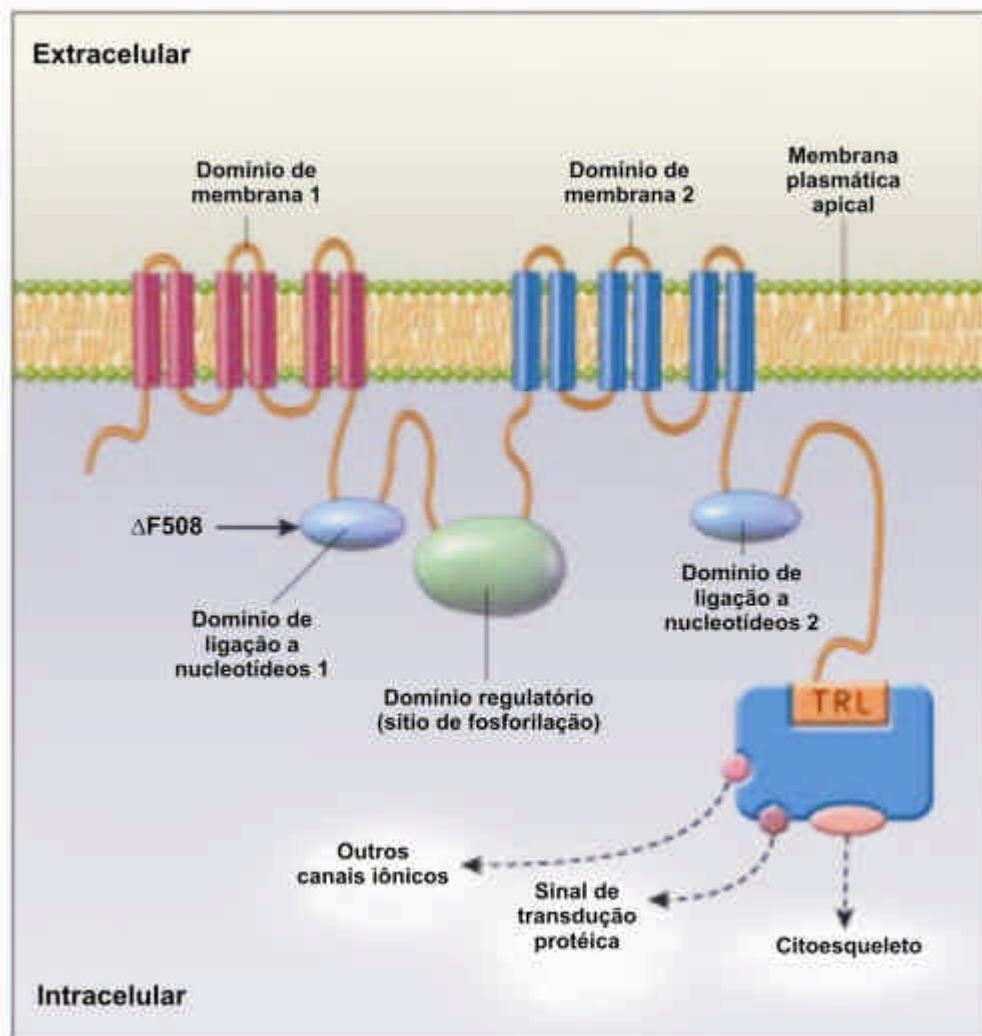


Figura 1 - Estrutura hipotética da proteína CFTR. O seqüenciamento da proteína CFTR demonstrou que ela forma um canal de cloro regulado pelo AMP cíclico na membrana celular contendo cinco domínios: dois deles capazes de atravessar a membrana seis vezes que formam o poro do canal de cloro, dois contendo uma seqüência de consenso para ligação de nucleotídeos que também apresentam uma alta proporção de resíduos de aminoácidos eletricamente carregados em uma posição pouco usual, denominado domínio regulatório (R), ligando as duas metades desta proteína. A ativação da proteína CFTR ocorre quando um agonista se liga especificamente a um receptor de membrana acoplado de membrana acoplado à proteína G, que estimula a enzima adenilciclase a aumentar a concentração de AMPc, que por sua vez fosforila a proteinoquinase A, a qual transfere a ativação para o domínio R. A fosforilação do domínio R pelo AMPc tem uma função reguladora da atividade do canal e a ligação do ATP e da hidrólise dos domínios de ligação de nucleotídeos controlam a abertura e o fechamento do canal. A mutação delta F 508 está localizada na superfície do primeiro domínio de ligação de nucleotídeos com o ATP da CFTR (Modificado de Rowe *et al.*³²)

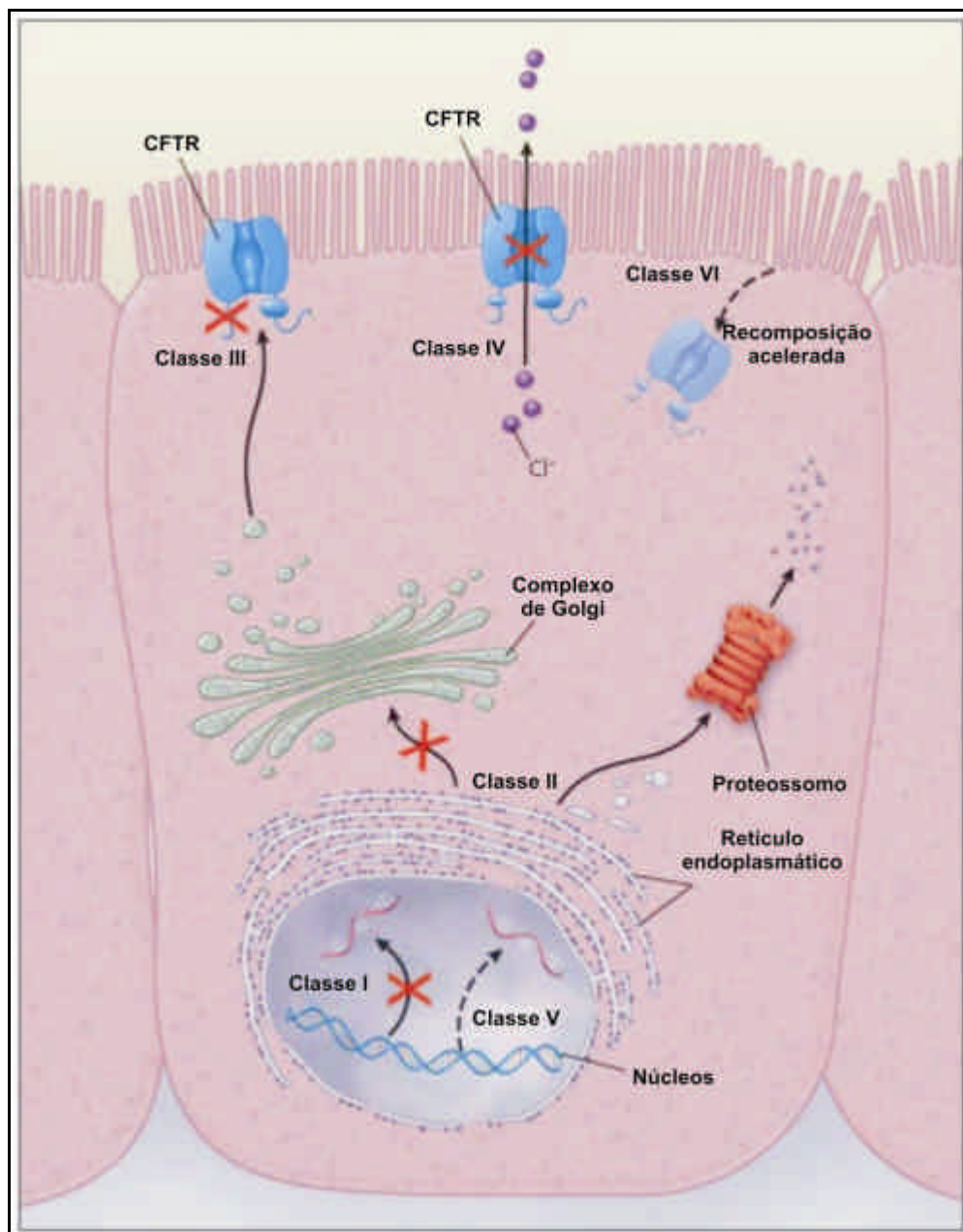


Figura 2 - Tipos de mutações da proteína CFTR. As diferentes classes de mutações no gene CFTR incluem: a ausência de síntese (classe I); maturação protéica defeituosa e degradação prematura (classe II); defeitos na regulação tais como: redução na ligação com ATP e hidrólise (classe III); defeito na condutância do cloro ou no canal de cloro (classe IV); um número reduzido de transcrições da proteína CFTR devido a anormalidades nos "promoters" ou "slicing" (classe V); e recomposição acelerada da superfície das células (classe VI) (Modificado de Rowe *et al.*³²)

Como consequência do perfil genotípico, o quadro clínico da FC é variável, mas a forma clássica da doença é frequentemente grave afetando as funções de órgãos envolvidos primariamente: pulmões, pâncreas exócrino, fígado, seios da face e intestino^{38,39}. Ocorrem também manifestações secundárias incluindo: infecção pulmonar polimicrobiana, desnutrição, distúrbios hidroeletrólíticos, diabetes, vasculite, polipose nasal, atresia dos ductos deferentes, esterilidade e hipertensão pulmonar^{40,41}. A doença pulmonar crônica e progressiva acomete cerca de 90% dos pacientes e resulta na maior morbidade e mortalidade da doença, sendo um dos principais focos de atenção nas pesquisas científicas e no manejo da doença^{3,42,43}.

O diagnóstico de fibrose cística é confirmado na presença de pelo menos dois dos quatro critérios clínico-laboratoriais: historia familiar de fibrose cística, insuficiência pancreática caracterizada por diarreia crônica e/ou esteatorreia, doença pulmonar obstrutiva supurativa crônica e níveis elevados de cloro e sódio no suor (> 60 mEq/L)⁴⁴⁻⁴⁶. Outros dados clínicos que contribuem para o diagnóstico são: historia de íleo meconial e/ou obstrução intestinal com atresia, déficit no desenvolvimento pondero-estatural, prostração ao calor, pansinusopatia crônica, pólipos nasais, volvo intestinal, intuscepção e azoospermia⁴⁴.

1.2 A Patogênese da Doença Pulmonar

A ação defeituosa da proteína CFTR nas glândulas mucosas, faz com que não ocorra transporte adequado de cloro da célula para o lúmen glandular, impedindo a rehidratação adequada do fluido luminal e levando à formação de secreções mais viscosas^{47,48}. Isto ocasiona a obstrução dos ductos destas glândulas e perda de sua função. Nas glândulas sudoríparas, a falta do canal de cloro CFTR bloqueia a reabsorção de sais ao nível dos ductos glandulares, o que acarreta aumento da concentração de sódio e cloro no suor¹⁸. A proteína CFTR também desempenha um papel importante na secreção do íon bicarbonato porque ela é permeável a este íon e provavelmente estimula a troca de cloro e bicarbonato¹⁸. A manifestação primária da perda desta função é a secreção defeituosa de bicarbonato pelos ácinos pancreáticos e redução do pH no líquido da superfície epitelial de outros tecidos⁴⁹. A falha de alcalinização dos fluidos secretados acarreta processamento anormal das mucinas e contribui para a sua hiperviscosidade¹⁸. Quinton⁵⁰, em artigo recente, propõe que o bicarbonato é crucial para a expansão normal das mucinas porque formam complexos com esses íons. O defeito na secreção de bicarbonato causa agregação das mucinas nos órgãos afetados tendendo a permanecer agregadas, pobremente solubilizadas e menos transportáveis.

Várias hipóteses tem sido postuladas para explicar a maior predisposição à infecção crônica das vias aéreas nos pacientes com FC⁵¹⁻⁵³. A explicação mais aceita para a doença respiratória na FC é a hipótese do baixo volume do líquido isotônico periciliar⁵⁴⁻⁵⁷. A redução do volume de

líquido na superfície da via aérea causa falha no transporte mucociliar e nos mecanismos inatos de defesa pulmonar⁵⁸. Por outro lado o microambiente mucoso hipóxico estimula a produção de biofilmes bacterianos⁵⁹.

Dessa maneira, os pacientes com FC são inábeis em clarear efetivamente bactérias inaladas e conseqüentemente apresentam uma grande susceptibilidade à colonização e infecção endobrônquica por bactérias e outros agentes, sendo a infecção broncopulmonar crônica a maior causa do dano pulmonar progressivo⁶⁰. Em adição, ocorre uma resposta inflamatória excessiva aos diferentes patógenos⁶¹. A inflamação das vias aéreas é um marcador da doença pulmonar na FC. Comparado com indivíduos normais, os fluidos das vias aéreas de pacientes com FC mostram um aumento do número de neutrófilos e aumento dos níveis de citocinas pro-inflamatórias: fator de necrose tumoral (TNF alfa), interleucinas (IL) 6, IL 8 e leucotrieno B4, mas redução dos níveis de IL 10 com atividade antiinflamatória^{62,63}. A IL 8 exerce um potente efeito quimiotático para neutrófilos e sua hiperprodução é a causa provável da excessiva infiltração neutrofílica nos pulmões de pacientes com FC⁶⁴. Neutrófilos vivos e mortos liberam compostos nocivos incluindo oxidantes, proteinases e DNA, causando lesão da via aérea, inflamação e liberação de citocinas proinflamatórias⁶⁵. Estes fenômenos são responsáveis pela inflamação crônica das vias aéreas e, combinado com a infecção bacteriana e a redução do clearance mucociliar, determina a formação de secreção crônica mucopurulenta e bronquiectasias⁶⁰. A lesão progressiva tecidual causada por enzimas lisossomais de leucócitos polimorfonucleares é um dos

mecanismos responsáveis pela insuficiência respiratória crônica e óbito dos pacientes com FC¹.

Teichgraber *et al.*⁶⁶, em artigo publicado recentemente, mostraram que o acúmulo de ceramida em células CFTR deficientes pode ser responsável pela inflamação pulmonar, morte de células respiratórias epiteliais, depósito de DNA nos brônquios e alta susceptibilidade à infecção grave pela *Pseudomonas aeruginosa*.

Existe um debate se a infecção é causa ou consequência da inflamação pulmonar na FC⁶⁷. Os pulmões de crianças com FC estão inflamados e infectados desde a mais tenra idade e é muito difícil excluir a presença de todos os patógenos possíveis, particularmente os vírus^{52,68}. Um estudo recente em modelo murino mostrou que a hiperexpressão do canal epitelial de sódio no epitélio bronquiolar é capaz de reduzir o volume de líquido periciliar e produzir uma doença similar à FC⁶⁹. Utilizando este modelo observou-se inflamação neutrofílica e aumento de proteínas proinflamatórias de macrófagos na ausência de infecção, suportando a hipótese que a inflamação pode se originar da desregulação do transporte iônico no epitélio da via aérea, antes da infecção⁶⁹.

Dessa maneira, ocorre uma infecção precoce dos pulmões de crianças com FC por vírus, bactérias e fungos^{70,71}. De uma maneira geral, nos primeiros anos de vida, ocorre freqüentemente colonização do trato respiratório pelo *Staphylococcus aureus* ou *Haemophilus influenzae*⁷¹. Posteriormente, ocorre a colonização pela *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que inicialmente as cepas são não mucóides, mas com a progressão da

infecção podem se converter para o fenótipo mucóide, através da produção de um polissacarídeo denominado alginato^{70,71}. O alginato facilita a aderência bacteriana e a formação de biofilmes envolvendo as microcolonias bacterianas dificultando a opsonização, fagocitose e a penetração de anticorpos e antibióticos^{72,73}. Esse fenótipo bacteriano associa-se a uma enorme dificuldade na erradicação da infecção, que cronifica e gera a intensa resposta inflamatória. Os estudos epidemiológicos mostram que com o avançar da idade, 70 a 90% dos pacientes são estarão infectados pela *P. aeruginosa*^{10,70}.

A infecção por cepas do complexo *Burkholderia cepacia* pode ocasionar uma aceleração no declínio da função pulmonar ou um quadro fulminante, com disseminação hematogênica e óbito, a chamada “Síndrome da cepacia”⁷⁴. Este problema é agravado pela diversidade da espécie e dificuldades na sua identificação, e atualmente a infecção por complexo *B. cepacia* é considerada uma contra-indicação para transplante pulmonar em alguns centros⁷⁵. Os agentes virais são responsáveis por percentual desconhecido das exacerbações respiratórias, mas têm um significativo papel patogênico para os lactentes, como agentes de bronquiolites virais⁷⁶.

Do ponto de vista anatomo-patológico, ao nascimento os pulmões são aparentemente normais⁶⁰. A lesão inicial é caracterizada pela dilatação e hipertrofia das glândulas mucosas, seguida de metaplasia escamosa do epitélio brônquico, presença de rolhas de muco nas vias aéreas periféricas, alterações ciliares secundárias e infiltrados linfocitários na submucosa^{60,70}. A evolução é para bronquiolectasias e bronquiectasias, resultantes dos ciclos

repetidos de obstrução e infecção^{45,60}. Ocorrem alterações na vasculatura pulmonar, com dilatação e adelgaçamento das artérias brônquicas nas regiões ao redor das bronquiectasias, sendo a ruptura desses vasos a causa de hemoptises⁶⁰. Com o aparecimento de hipoxemia há vasoconstrição da artéria pulmonar, com hipertrofia da camada média das artérias musculares e conseqüente hipertensão pulmonar secundária⁷⁷.

A pequenas vias aéreas estão precocemente envolvidas na patogênese da FC, mas pouco é conhecido sobre o fluxo fisiológico de íons e fluido a este nível⁷⁰. Blouquit *et al.*⁷⁸ examinaram comparativamente a altura da superfície líquida e as propriedades bioelétricas das células do epitélio bronquiolar e brônquico de indivíduos com e sem FC. As mesmas anormalidades presentes no tecido bronquial, incluindo redução da altura da superfície líquida, estavam também presentes no tecido bronquiolar, demonstrando que as anormalidades fisiológicas relacionadas à proteína CFTR também estão presentes nas pequenas vias aéreas. Este fato é de importância crucial pois o acometimento das pequenas vias aéreas contribui para anormalidades funcionais, nem sempre detectáveis por métodos e parâmetros que avaliam as grandes vias, como a capacidade vital forçada (CVF) e o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) que são habitualmente utilizados⁷⁹.

1.3 Conseqüências da Infecção e Inflamação das Vias Aéreas na Função Pulmonar de Pacientes com FC

A medida da função pulmonar é uma dos critérios mais importantes para avaliar objetivamente a evolução da doença e o impacto de intervenções terapêuticas⁸⁰. Os parâmetros mais freqüentemente utilizados são as medidas espirométricas do VEF1, CVF e os fluxos em diferentes volumes pulmonares. Pouca atenção tem sido dada para o valor das medidas do volume residual (VR) e da relação entre o volume residual e a capacidade pulmonar total (VR/CPT), em virtude de estas medidas requererem um equipamento mais complexo e oneroso como os pletismógrafos de corpo total⁸⁰. A curva de declínio da função pulmonar em função do tempo é um fator de prognóstico mais importante do que qualquer medida isolada^{81,82}. O principal objetivo das intervenções terapêuticas é estabilizar a função pulmonar em um patamar horizontal para melhorar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes⁸⁰.

Demonstrou-se que nos pacientes com FC ocorre uma taxa de declínio progressivo e variável na função pulmonar^{80,83}. Este declínio é mais ou menos intenso ou eventualmente ocorre de forma abrupta dependendo da intensidade do acometimento pulmonar, da precocidade da intervenção no estado nutricional, do tipo de colonização, de infecções por patógenos oportunistas, por fungos, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia* e de complicações associadas tal como o Diabetes relacionado à fibrose cística e a aspergilose broncopulmonar alérgica^{82,84-91}.

Konstan *et al.*⁹¹ analisaram a taxa de declínio do VEF1 e fatores de risco associado a este declínio. Foi determinada a taxa de declínio entre 3 a 6 anos em três diferentes grupos etários. As médias em relação aos valores previstos

foram: 88,4% ± 20,5% para 6 a 8 anos (n = 1811); 85,3% ± 20,8% para 9 a 12 anos (n = 1696) e 78,4% ± 22,0% para 13 a 17 anos (n = 1359). As taxas de declínio no VEF1% em relação ao previsto/ano foram -1,12, -2,39 e -2,34, respectivamente. Os fatores de risco independentes associados a este declínio foram: sexo feminino, infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, estertores pulmonares persistentes, baixo peso para a idade, doença supurativa pulmonar, sibilância, sinusites, exacerbações pulmonares tratadas com antibioticoterapia endovenosa, testes de função hepática alterados e insuficiência pancreática.

Corey *et al.*⁸¹ em estudo retrospectivo por análise mista de regressão estimaram a taxa média de declínio por parâmetros espirométricos com base na faixa etária, sexo, suficiência pancreática e genótipo. Verificaram que os pacientes que morreram antes dos 15 anos tinham pior função pulmonar inicial e um declínio mais rápido quando comparado com o grupo de pacientes que sobreviveram após os 15 anos. A taxa de declínio foi significativamente maior nos pacientes do sexo feminino, naqueles com insuficiência pancreática e nos homozigotos para a mutação delta F 508.

A medida longitudinal do VEF1 pode refletir a progressão e o prognóstico da doença pulmonar⁴². Kerem *et al.*⁴² através de estudo de coorte mostraram que a medida do VEF1, dentre outras medidas laboratoriais, era o fator preditivo mais significativo de mortalidade, aliado a sexo e idade. Concluíram que os pacientes com FC deveriam ser considerados para transplante pulmonar quando o VEF1 caísse abaixo de 30% em relação ao previsto, nesta situação, os pacientes mais jovens e do sexo feminino deveriam ter uma indicação mais precoce.

1.4 O Manejo da Doença Pulmonar

Com o objetivo de preservar e estabilizar a função pulmonar dos pacientes com FC foram desenvolvidas diferentes estratégias para a terapêutica da doença respiratória. Varias opções de intervenção terapêutica podem ser utilizadas conjuntamente, de acordo com diretrizes e consensos atuais no manejo da FC^{2,92-102}, e podem incluir:

- Protocolos para a tentativa de erradicação precoce da *Pseudomonas aeruginosa*, quando da sua detecção inicial, através de antibioticoterapia parenteral e inalatória.
- Antibioticoterapia inalada para os pacientes colonizados cronicamente por *Pseudomonas aeruginosa* (tobramicina ou colistin) para supressão do crescimento bacteriano e conseqüentemente da inflamação.
- Tratamento das exacerbações pulmonares com antibioticoterapia apropriada oral ou parenteral baseada nas culturas e nos antibiogramas.
- Redução da inflamação pulmonar pelo uso de ibuprofeno ou antibióticos macrolídeos (azitromicina, claritromicina).
- Tratamento da aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), quando diagnosticada, pelo uso de antifúngico e corticoterapia oral.
- Identificação e tratamento precoce da infecção por agentes não habituais como *Burkholderia cepacia*, micobacterias atípicas e *Stenotrophomonas maltophilia*.
- Uso de drogas mucoativas como a dornase alfa ou solução salina hipertônica, associadas às técnicas de fisioterapia respiratória e de mobilização das secreções e uso de broncodilatadores quando indicados.

Muitas dessas opções de tratamento têm sido discutidas em revisões sistemáticas quanto às suas indicações e eficácia^{92,94}. A Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança do HC-FMUSP tem produzido varias pesquisas e respectivas publicações enfocando alguns dos diferentes aspectos no manejo da doença pulmonar da criança com FC relacionados anteriormente^{75,103-109}. O enfoque desta nova pesquisa foi verificar se o brometo de tiotrópio, um novo medicamento broncodilatador anticolinérgico de ação prolongada, que está sendo utilizado com sucesso e segurança em adultos com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) das vias aéreas, seria também capaz de melhorar a função pulmonar de pacientes com fibrose cística.

1.5 O Uso de Broncodilatadores em Fibrose Cística

As alterações estruturais que ocorrem nos pacientes com FC acarretam distúrbios funcionais concomitantes, sendo o dano funcional caracterizado por uma obstrução progressiva das vias aéreas intratorácicas devido ao edema inflamatório da mucosa, acúmulo de secreção e um componente variável de broncoespasmo^{60,110}. A doença obstrutiva funcionalmente leva a um aumento da resistência das vias aéreas, hiperinsuflação, aprisionamento aéreo, desequilíbrio na relação ventilação -perfusão e ineficiência nas trocas gasosas^{79,110,111}. Por outro lado, a presença de bronquiectasias resultantes da lesão proteolítica das paredes cartilaginosa das vias aéreas, provoca uma grande instabilidade das vias aéreas, o que pode ser verificado por testes funcionais mais sofisticados como as medidas de fluxo instantâneos nas curvas

fluxo-volume, onde se demonstra um aumento da distensibilidade e compressibilidade das vias aéreas centrais^{110,112,113}.

No entanto, apesar dos pacientes com FC desenvolverem uma doença obstrutiva crônica e algumas vezes hiperresponsividade brônquica, a maioria deles não mostra resposta significativa com broncodilatador nos testes de função pulmonar¹¹⁴. Zach *et al.*¹¹⁵ demonstraram que, paradoxalmente, a obstrução ao fluxo aéreo pode piorar com o uso de broncodilatadores beta agonistas como consequência da instabilidade das vias aéreas nesses pacientes.

Do ponto de vista clínico, os pacientes com fibrose cística comumente apresentam episódios de sibilância recorrente e desconforto respiratório resultante do componente obstrutivo da doença, por esta razão os broncodilatadores são prescritos freqüentemente na prática médica diária¹¹⁶. No entanto, apesar do uso freqüente e, muitas vezes, por tempo prolongado, há muitas controvérsias e falta de evidências objetivas atuais sobre a eficácia dos broncodilatadores na fibrose cística¹¹⁷⁻¹²⁰.

Halfhide *et al.*¹¹⁸ em uma revisão sistemática recente analisaram a efetividade dos broncodilatadores em crianças e adultos com fibrose cística, através de estudos randomizados onde foram confrontados com placebo ou outros broncodilatadores inalados. Os dados foram sub-agrupados de acordo com a classe de broncodilatador e cada classe em efeito em curto prazo (menos que uma semana) e em longo prazo (maior ou igual a uma semana). Foram identificadas 43 referências, sendo que 14 eram ensaios clínicos elegíveis para inclusão na análise e envolveram um total de 257 participantes,

na faixa etária de 6 a 39 anos. A revisão avaliou tanto os broncodilatadores de curta ação como os de longa ação. Não foram encontrados ensaios clínicos utilizando fenoterol, formoterol ou tiotrópio. Não foi possível uma metanálise porque todos os estudos tinham um desenho do tipo cruzado. Os beta adrenérgicos de curta ação (salbutamol ou albuterol) foram administrados nas doses variando de 80 a 600 mcg por aerossol dosimetrado ou de 0,5 a 5 mg por nebulização. O beta adrenérgico de longa ação (salmeterol) foi administrado nas doses de 84 a 336 mcg por aerossol dosimetrado. Houveram variadas conclusões nos diferentes ensaios, refletindo sua heterogeneidade. O beta adrenérgicos de curta ação demonstraram uma resposta consistente na função pulmonar em estudo de curto prazo (dois dias a quatro semanas), embora esse benefício não tenha sido mantido em estudos de longo prazo. Cinco estudos de curto prazo focalizaram em pacientes com resposta broncodilatadora documentada ou com hiperresponsividade brônquica¹²¹⁻¹²⁵ e neste subgrupo de pacientes todos indivíduos demonstraram uma melhora significativa na função pulmonar medida pelo VEF1 ou pelo PFE. Três estudos eram de longo prazo com duração de quatro a 26 semanas^{122,126,127}, dois deles mostraram melhora funcional na evolução medida pelo VEF1 ou PFE^{122,126}. Um dos estudos¹²² comparou beta adrenérgico de curta ação com de longa ação e encontrou uma melhor resposta com o de longa ação.

Em resumo, comparado ao placebo, os beta-agonistas de curta ação aumentaram o a função pulmonar em curto e em longo prazo em pacientes que demonstraram hiperresponsividade brônquica ou resposta a broncodilatador ou ambos¹¹⁸. Os beta-agonistas de longa ação melhoraram a função pulmonar em

curto prazo em pacientes com reconhecida resposta a broncodilatador, mas produziram resultados inconsistentes em longo prazo¹¹⁸. Baseada nesta revisão, considera-se que o uso de beta agonistas de curta e longa ação para pacientes com seis ou mais anos de idade podem ser benéficos em curto e em longo prazo, particularmente em pacientes que demonstram resposta a broncodilatador ou hiperresponsividade brônquica ou ambas, com qualidade de evidências considerada boa e benefício moderado⁹².

1.6 Anticolinérgicos Inalados

A revisão sistemática da Cochrane de Halfhide *et al.*¹¹⁸, citada anteriormente, incluiu também a análise de medicamentos anticolinérgicos inalados de curta ação, porém não haviam dados de eficácia de anticolinérgicos de longa ação. Foram identificados quatro estudos^{121,123,128,129} que analisaram o benefício potencial do brometo de ipratrópio inalado em um total de 79 pacientes com FC ,estáveis, na faixa etária de 6 a 43 anos, com VEF1 basal extremamente variável entre 15,6 a 128,8% dos valores preditos. O brometo de ipratrópio foi administrado na dose de 40 a 80 mg por aerossol dosimetrado ou de 50 mg por nebulização. A função pulmonar resultante após uma dose única de ipratrópio foi comparada com a medida após a administração de placebo ou com a medida basal obtida antes da administração do brometo de ipratrópio no mesmo dia ou a do dia anterior. Nenhum dos estudos avaliou a eficácia clínica em longo prazo.

Três dos estudos demonstraram aumento estatisticamente significativo no VEF1 em resposta á inalação de brometo de ipratrópio^{123,128,129}. Um

aumento agudo no VEF1 maior que 10% após inalação de brometo de ipratrópio foi observado em um subgrupo de pacientes que também apresentavam melhora do fluxo aéreo após inalação de beta adrenérgicos de curta ação^{123,128}.

A Fundação Americana de Fibrose Cística baseando-se nesses estudos com anticolinérgico de curta ação e na revisão sistemática da Cochrane e em diretriz recentemente publicada, concluiu que faltam evidências para recomendar ou contra-indicar o uso de broncodilatadores anticolinérgicos para melhorar a função pulmonar de pacientes com fibrose cística em curto ou longo prazo⁹².

Até o momento (julho de 2008), não identificamos estudos utilizando anticolinérgicos de longa ação (tiotrópio) em crianças ou adultos com fibrose cística, nas bases de dados Medline e Lilacs. A quase totalidade dos estudos farmacocinéticos, de eficácia e segurança com tiotrópio foi realizada em pacientes adultos portadores de DPOC, os quais serão relatados a seguir.

Nas últimas duas décadas, os agentes anticolinérgicos de longa ação tem sido utilizados rotineiramente como drogas de primeira escolha no tratamento de pacientes com DPOC e, em menor extensão, em pacientes com asma¹³⁰. Os anticolinérgicos são particularmente importantes em pacientes com DPOC, porque o tônus vagal parece ser o único componente reversível da limitação ao fluxo aéreo nesses pacientes^{130,131}. Os anticolinérgicos aprovados para uso clínico são os derivados quaternários da atropina e incluem o brometo de ipratrópio, o brometo de oxitrópio e o brometo de tiotrópio¹³¹.

1.7 Brometo de Tiotrópio

1.7.1 Farmacologia e ação

O brometo de tiotrópio é um composto sintético quaternário derivado da amônia e relacionado estruturalmente ao brometo de ipratrópio. Foi aprovado em pelo Food and Drug Administration (FDA) em janeiro de 2004 nos Estados Unidos, mas estava disponível em outros países desde 2002 para uso por tempo prolongado uma vez ao dia no tratamento de manutenção do broncoespasmo associado à doença pulmonar obstrutiva crônica do adulto¹³². Está comercializado na forma de pó seco, sendo que 18 mcg da droga é inalada uma vez ao dia através do dispositivo HandiHaler^{®133}. A potencia e a ação duradoura desse broncodilatador anticolinérgico resulta primariamente do seu efeito bloqueador prolongado e específico sobre receptores muscarínicos que são mediadores da contração da musculatura lisa das vias aéreas e uma dissociação relativa mais rápida dos receptores M2¹³⁴.

A atividade parassimpática nas vias aéreas induz contração da musculatura lisa dos brônquios, liberação de muco no lúmen das vias aéreas e estimulação da atividade ciliar¹³⁵. Estas ações são mediadas através dos subtipos de receptores muscarínicos M1 e M3 localizados predominantemente nas vias aéreas de grande e médio calibre¹³⁴. Por outro lado, receptores M2 localizados nos nervos parassimpáticos pós-ganglionares funcionam com autoreceptores que inibem a liberação de acetilcolina destas terminações nervosas produzindo um mecanismo de inibição por retro-alimentação. Teoricamente uma ótima inibição da atividade parassimpática pode ser atingida por antagonismo seletivo de receptores M1

e M3, poupando os receptores M2¹³⁵. Nos tecidos humanos e de animais, o tiotrópio liga-se aos três subtipos de receptores muscarínicos mas dissocia-se rapidamente dos receptores M2^{136,137}. A meia vida do complexo receptor-droga, um índice de duração de efeito da droga é de 35 horas para o tiotrópio nos receptores M3 e de três horas para o brometo de ipratrópio¹³⁸.

Os estudos realizados em tecidos de animais de laboratório demonstraram que o tiotrópio tem uma cinética seletiva para os receptores muscarínicos das vias aéreas, é mais potente, e tem uma ação significativamente mais longa que o ipratrópio¹³⁶.

1.7.2 Eficácia clínica

1.7.2.1 Efeito broncodilatador e estudos de dose resposta

Após a inalação de uma única dose de tiotrópio o VEF1 aumenta vagarosamente atingindo um pico após uma a três horas^{139,140}. O pico de resposta é seguido por um patamar de longa duração. Doses de 10 a 80 mcg mostraram pequenas diferenças de resposta broncodilatadora entre elas, sendo que todas foram significativamente maior que o placebo até 32 horas após a dose inicial¹⁴⁰. O declínio no VEF1 observada entre 16 a 24 horas após a dose é devido á queda do ritmo circadiano noturno na função pulmonar que não é abolida pelo tiotrópio¹⁴¹. O'Connor *et al.*¹⁴² estudaram 12 pacientes asmáticos, atópicos que receberam tiotrópio nas doses de 10 a 80 mcg após serem submetidos a estímulo broncoconstritor induzido por metacolina. Houve uma proteção significativa do broncoespasmo pelo tiotrópio durante 48 horas, demonstrando o seu efeito por tempo prolongado.

Os estudos clínicos que utilizaram repetidas doses diárias de tiotrópio, mostram que ocorre broncodilatação evidente desde o primeiro dia de uso, com aumento progressivo a partir do valor basal do VEF1 nos dias subseqüentes 23 a 24 horas após a dose, mas antes da próxima dose^{139,143,144}. Van Noord *et al.*¹³⁹ demonstraram que o VEF1 aumenta de 0,19 l (18% acima do valor basal) após oito dias de uso diário, sendo que a maior parte desse incremento ocorre no segundo dia. A medida seriada da CVF aumenta de 0,67 l (27% acima do valor basal) por volta do oitavo dia de uso.

1.7.2.2 Estudos de dose-resposta

Maesen *et al.*¹⁴⁰ em estudo randomizado de dose-resposta, duplo-cego, placebo controlado e cruzado analisaram 35 pacientes com DPOC que receberam doses únicas de tiotrópio variando de 10, 20, 40 e 80 mcg e placebo. Os testes de função pulmonar foram realizados antes e após a administração da droga em intervalos de tempo regulares até 32 horas após. Quando comparado ao grupo placebo o tiotrópio produziu melhora significativa em todos os parâmetros espirométricos observados (VEF1, CVF, PFE e fluxo expiratório forçado entre 25%-75% da CVF [FEF 25-75%]). A resposta broncodilatadora foi quase imediata, sendo que o pico de melhora do VEF1 ocorreu entre uma a quatro horas após a inalação da droga e a duração da ação se estendeu até 32 horas. Houve uma clara relação de dose resposta analisada pelo pico do VEF1 e pela média do VEF1 nos diferentes períodos, porém doses de 20 mcg ou maiores tiveram pouca diferença de resposta, embora a resposta broncodilatadora da dose

de 80 mcg foi superior à de 10 mcg. Não houve evidências de efeitos anticolinérgicos sistêmicos, mesmo nas doses mais elevadas.

Littner *et al.*¹⁴⁵ em estudo de doses resposta para análise da situação de equilíbrio farmacológico (“steady state”) com doses diárias regulares, randomizaram 169 pacientes com DPOC recebendo doses únicas de 0, 4.5, 9, 18, ou 36 mcg de tiotrópio diariamente às 12 horas por quatro semanas. A espirometria era realizada antes da inalação da droga ou placebo e a cada hora por seis horas, após a administração. Quando comparado ao placebo, houve uma melhora significativa do VEF1 e CVF dose relacionada que ocorreu uma hora após a primeira dose de tiotrópio. Durante todo período de estudo, todas as doses de tiotrópio produziram aumento significativo em relação ao placebo, mas sem uma diferença significativa entre as doses investigadas. Em todos os grupos tratados, o VEF1 elevou até um nível estável de aproximadamente 0,1 litro em relação ao valor basal. A medida do pico de fluxo expiratório (PFE) retornou gradualmente aos níveis pré-tratamento em um período de três semanas de avaliação após descontinuidade da droga, indicando o efeito prolongado da droga. O perfil de segurança para as doses de tiotrópio foi semelhante ao placebo. Baseado nesse estudo, conclui-se que doses abaixo de 36 mcg são eficazes e seguras. Como consequência, todos os estudos subsequentes de longo prazo têm utilizado a dose diária de 18 mcg.

1.7.2.3 Estudos de longo prazo em pacientes com DPOC

A eficácia do tiotrópio em longo prazo foi estudada em três ensaios clássicos multicêntricos randomizados^{143,144,146}. Um dos estudos de um ano de duração foi realizado nos Estados Unidos e comparou tiotrópio com placebo¹⁴³, outro de um ano foi realizado na Europa e comparou tiotrópio com ipratrópio¹⁴⁶. Dois ensaios de seis meses compararam tiotropio com salmeterol e placebo^{144,147}.

Casaburi *et al.*¹⁴³ estudaram 921 pacientes estáveis com DPOC, admitidos em dois estudos idênticos, randomizados, duplo-cegos, placebo controlado, com duração de um ano. Os pacientes inalaram 18 mcg de tiotropio ou placebo diariamente. O desfecho primário foi a medida do VEF1 antes de cada dose. Foram medidas as mudanças no grau de dispnéia pela medida do índice de dispnéia transicional (“Transition Dyspnea Index”), e a qualidade de vida com o questionário respiratório específico de St George e o formulário simplificado genérico 36 (“Short Form 36”). O tiotrópio produziu uma broncodilatação significativamente superior relativamente ao placebo com resposta seriada do VEF1 de aproximadamente 12 % em relação ao basal e média de resposta durante as três horas de cerca de 22% sobre o basal durante o período de 12 meses de estudo. Os pacientes que receberam tiotrópio tiveram menor índice de dispnéia, escore superior de qualidade de vida, menor número de exacerbações e hospitalizações. Os eventos adversos foram comparáveis ao do placebo, exceto a incidência de sensação de boca seca (16% no grupo tiotrópio *versus* 2,7% no placebo). Tashkin *et al.*¹⁴⁸ fizeram uma análise desse estudo e concluíram que a

resposta espirométrica ao tiotrópio no primeiro dia de tratamento não prediz a habilidade dos pacientes de se beneficiar do tratamento com tiotrópio em longo prazo.

Vincken *et al.*¹⁴⁶ realizaram ensaio randomizado com desenho e desfechos semelhantes ao estudo descrito anteriormente, envolvendo 356 pacientes com DPOC recebendo 18 mcg de tiotropio diariamente comparados a 179 recebendo 40 mcg de ipratropio quatro vezes ao dia. A medida seriada média do VEF1 após um ano aumentou em 0,12 litro com tiotrópio e declinou em 0,03 litro com o ipratrópio. Houve uma melhora significativa no PFE redução do uso de salbutamol de resgate, melhora do escore do índice de dispnéia e na qualidade de vida medida pelo questionário respiratório de St George no grupo que recebeu tiotrópio O tiotrópio reduziu o número de exacerbações em 24%, aumentou o tempo da primeira exacerbação e o tempo da primeira hospitalização. Quando comparado ao ipratrópio, os eventos adversos foram similares entre os tratamentos, exceto a maior incidência de sensação de boca seca no grupo tiotrópio.

Donohue *et al.*¹⁴⁴ realizaram estudo com desenho semelhante aos anteriores, porem com seis meses de duração comparando uso inalatório de 18 mcg de tiotrópio com 50 mcg de salmeterol duas vezes ao dia. Houve a participação de 623 pacientes com DPOC randomizados em três grupos (tiotrópio, n = 209; salmeterol, n = 213 e placebo, n = 213). Comparado com o grupo placebo, a média do VEF1 pré-dose seguindo seis meses de terapêutica aumentou significativamente mais no grupo tiotrópio (0,14 litro) do que no salmeterol (0,09 litro).

Brusasco *et al.*¹⁴⁷ realizaram uma análise combinada de dois estudos envolvendo 1207 pacientes com DPOC subdivididos em três grupos (tiotrópio: 402, salmeterol: 405, placebo: 400). Após seis meses de tratamento regular a medida seriada do VEF1 aumentou de 0,12 litro em relação ao valor basal do primeiro dia no grupo tiotrópio e de 0,09 no grupo salmeterol, sendo que esta diferença foi estatisticamente significativa. Na análise global do estudo, comparado ao placebo, o tiotrópio, mas não o salmeterol foi associado com uma redução significativa no tempo de início da primeira exacerbação. O número de exacerbações da doença por paciente por ano foi menor no grupo tiotrópio (1,07) que no placebo (1,49, $p < 0,05$), sendo que o grupo salmeterol não diferiu do placebo. No grupo tiotrópio, durante o período de estudo, houve menor número de admissões hospitalares comparado ao salmeterol e placebo e melhor escore de qualidade de vida.

1.7.2.4 Efeito nos volumes estáticos pulmonares e outros efeitos fisiológicos

Nos pacientes com doença pulmonar obstrutiva, particularmente os com DPOC, ocorre um aumento da medida dos volumes pulmonares decorrente da hiperinsuflação pulmonar. Na DPOC o grau de dispnéia está mais intimamente correlacionado com a hiperinsuflação do que com o VEF1^{149,150}. Em adição, a broncodilatação efetiva e a redução da dispnéia são tipicamente associadas com a redução nos volumes pulmonares¹⁵¹. O parâmetro de volumes pulmonares que tem um interesse especial em DPOC é a capacidade inspiratória (CI). que pode ser medida na espirometria e seu

aumento reflete uma redução na hiperinsuflação^{149,152}. Dois estudos analisaram o efeito do tiotrópio nos volumes pulmonares, incluindo a CI^{153,154}. Celli *et al.*¹⁵³ relataram o efeito do uso de quatro semanas de tiotrópio ou placebo em pacientes com DPOC. Os resultados mostraram que no grupo de pacientes que recebeu tiotrópio houve redução substancial da CRF e aumento da CI, indicando uma redução na hiperinsuflação.

O'Donnell *et al.*¹⁵⁴ em um estudo duplo cego ,controlado em 187 pacientes com DPOC observaram que a redução na hiperinsuflação resultou no aumento do volume corrente durante uma taxa de trabalho constante no cicloergômetro, com melhora no tempo de “endurance” e índice de dispnéia. O tempo de “endurance” aumentou em 21 % após seis semanas de tratamento. Faltam novos estudos sobre os efeitos do tiotrópio nos volumes pulmonares estáticos, na pressão de recolhimento elástico e na capacidade de difusão pulmonar.

Gross *et al.*¹³⁰ analisaram o efeito do tiotrópio nos gases arteriais, comparado com o salmeterol após quatro semanas de tratamento regular com cada agente. Os resultados mostraram que o tiotropio tem menor tendência de causar queda transitória da PaO₂ e aumento do gradiente alvéolo-arterial do PaO₂ que o salmeterol. Estes achados são concordantes com estudos prévios que compararam o ipratrópio com agonistas beta adrenérgicos^{155,156}.

1.7.2.5 Evolução de sintomas

O índice de dispnéia transicional (IDT) de Mahler *et al.*¹⁵⁷ tem sido utilizado para a medida dos efeitos do tiotrópio em DPOC. Este índice é baseado em um questionário que mede as mudanças de dispnéia imperceptíveis de um tempo a outro. Sua escala varia de -9 (pior) a + 9 (melhor), uma mudança de 1 U é considerada clinicamente significante^{158,159}. Nos estudos de longo prazo com tiotrópio citados anteriormente^{143,144,146} o IDT foi medido sistematicamente. Nesses estudos, a melhora do IDT nos pacientes com DPOC em uso de tiotrópio foi estatisticamente significante quando comparado ao placebo, havendo tendência para aumentar com a duração do uso, algumas vezes excedendo a uma unidade mínima de significância clínica. Nos estudos onde o salmeterol foi incluído, a melhora no IDT com tiotrópio foi estatisticamente maior que com salmeterol em um dos estudos¹⁴⁴.

No estudo de Casaburi *et al.*¹⁴³, placebo controlado, os sintomas de DPOC (chiado, respiração curta, tosse e aperto no peito) foram avaliados utilizando um escore de gravidade (de 0 a 3) no tempo inicial e a cada nova visita. Chiado e respiração curta melhoraram significativamente no grupo tiotrópio comparado com placebo, mas não tosse ou aperto no peito.

1.7.2.6 Qualidade de vida

O efeito do tiotrópio na qualidade de vida foi medido nos estudos de longo prazo usando o Questionário Respiratório de St George (QRSG)^{160,161}. O escore varia de 0 a 100, sendo que escores mais baixos significam melhor qualidade de vida. A diferença de quatro unidades é considerada clinicamente significante. Isto foi validado em pacientes com DPOC¹⁶¹.

Em todos estudos analisados de longo prazo a média total do escore QRSG dos pacientes com DPOC que receberam tiotrópio melhorou, no final do estudo, significativamente em relação ao valor basal inicial, bem como em comparação com placebo¹⁴⁴ ou ipratrópio¹⁴⁶, mas não quando comparado ao salmeterol¹⁴⁴. A melhora com o tiotrópio ocorreu desde o momento da primeira avaliação e tendeu a melhorar ou manter-se constante através dos longos períodos de estudo.

O formulário simplificado genérico 36 ("Short Form-36") é um instrumento genérico de avaliação da qualidade de vida com domínios não específicos para doença respiratória que foi utilizado em dois estudos com tiotrópio em pacientes com DPOC, com um ano de duração^{143,146}. Em ambos os estudos, os escores sumarizados dos domínios de saúde física aumentaram significativamente no grupo tiotrópio em comparação ao grupo controle.

1.7.2.7 Exacerbações da DPOC

Uma das principais metas no manejo da DPOC é reduzir a frequência e a gravidade das exacerbações¹⁶². As exacerbações agudas ocorrem uma a três vezes por ano em pacientes com DPOC de graus moderada a grave. Cada episódio de exacerbação é associado com significativa morbidade e deterioração da função pulmonar e da qualidade de vida^{163,164}. As exacerbações também são responsáveis pela maior parte do custo anual da doença para o sistema de saúde⁴³.

Nos estudos de longo prazo^{143,146} o efeito do tratamento com tiotrópio nos pacientes com DPOC na incidência de exacerbações foi avaliado como

um desfecho secundário. Os pacientes que receberam tiotrópio tiveram uma frequência de 20 a 30% menos exacerbações e hospitalizações do que nos pacientes dos grupos placebo ou ipratrópio. Não houve diferença significativa entre os grupos tiotrópio e salmeterol.

Niewoehner *et al.*¹⁶⁵, em um estudo multicêntrico recente com pacientes com DPOC, em que o tempo da primeira exacerbação foi considerado um desfecho primário, mostrou um benefício estatisticamente significativo nos pacientes do grupo tiotrópio *versus* placebo. Nesse estudo, no grupo de pacientes que receberam tiotrópio as exacerbações foram menos frequentes, requereu menor número de hospitalizações e houve menor utilização do serviço de saúde.

1.7.3 Segurança e efeitos adversos

O tiotrópio, tal como o ipratrópio, tem pouca absorção no trato gastrointestinal e sua biodisponibilidade sistêmica é muito baixa. Nos diversos ensaios clínicos em que foi utilizado, em longo prazo, o efeito adverso mais comum foi a sensação de secura na boca, um efeito anticolinérgico típico^{143,144,146}. Este efeito ocorreu em cerca de 10 a 16% dos pacientes estudados, uma frequência que foi discretamente maior do que a observada com o uso de ipratrópio^{143,144,146}. Este efeito foi considerado leve e raramente levou à descontinuidade da droga. Outros efeitos estudados não diferiram do grupo controle ou do placebo. Até o momento não houve relatos de interações medicamentosas desfavoráveis entre tiotrópio e outras drogas, dados sobre a administração do tiotrópio concomitantemente com

corticosteróides inalados, beta agonistas de longa ação ou metilxantinas são incompletos. Um estudo mais recente de Van Noord *et al.*¹⁶⁶ sugere que a adição de formoterol uma ou duas vezes ao dia aumento o efeito broncodilatador obtido com o uso de tiotrópio uma vez ao dia.

Em resumo, os resultados dos vários estudos realizados com tiotrópio em pacientes com DPOC com duração acima de seis meses têm mostrado sua efetividade com aumento na medida seriada do VEF1 de 0,1 a 0,15 l e aumento do pico do VEF1 de 0,15 a 0,2 l. O tiotrópio mostrou-se estatisticamente superior ao ipratrópio administrado quatro vezes ou salmeterol administrado duas vezes ao dia. Não se observou perda de eficácia (taquifilaxia) no curso de um ano de tratamento regular com o tiotrópio. A inalação do tiotrópio também leva a uma redução significativa nos volumes estáticos em pacientes hiperinsuflados com DPOC; isto contribui em longo prazo para a redução da dispnéia. O uso regular da droga foi associada com a melhora clinica significativa no índice de dispnéia transicional o que indica uma redução da dispnéia associada com a atividade diária. Foi também documentado uma melhora da qualidade de vida empregando-se o questionário respiratório específico de St George. Finalmente, a somatória dos dados coletados de estudos de um ano e de dois a seis meses documentaram 20 a 28% de redução no número de exacerbações por paciente por ano. Os efeitos colaterais tem sido relativamente mínimos, sendo que a sensação de secura na boca é o sintoma mais comum atingindo 6 a 16% dos pacientes em uso contínuo e raramente leva à descontinuidade da droga. Alguns estudos compararam a

eficácia do tiotrópio com outros broncodilatadores. O uso de uma dose diária do tiotrópio é claramente superior ao ipratrópio quatro vezes ao dia nos pacientes com DPOC. O resultado de dois estudos comparando uma dose diária de tiotrópio com duas inalações de doses padronizadas de salmeterol, mostra uma magnitude de resposta broncodilatadora semelhante entre as duas drogas no início do estudo. Contudo, após seis meses o efeito broncodilatador do tiotrópio foi maior que o do beta agonista de longa ação. Dados preliminares sugerem que a combinação do com beta agonistas de longa ação pode produzir uma ação broncodilatador adicional em DPOC.

1.8 Justificativa

A fibrose cística é uma doença obstrutiva das vias aéreas, onde os vários estudos com uso de broncodilatador que foram realizados não conseguiram, até o momento, determinar se existe alguma efetividade dessas drogas no tratamento desses pacientes. Uma alternativa poderia ser o uso de um anticolinérgico de longa ação como o brometo de tiotrópio. No entanto, apesar dos resultados favoráveis obtidos em pacientes adultos com DPOC, não existe nenhum estudo na literatura até o momento, em pacientes com fibrose cística, particularmente na faixa etária pediátrica.

1.9 Hipóteses

Tal como demonstrado em pacientes adultos com DPOC, pacientes pediátricos com fibrose cística poderiam se beneficiar do uso de uma droga anticolinérgica de longa ação. A resposta aguda ao brometo de tiotrópio, desde que favorável, poderia ser um passo inicial na investigação do efeito dessa droga na função pulmonar de pacientes com fibrose cística. Essa resposta imediata pode refletir, tal como ocorreu em DPOC, um benefício em longo prazo na função pulmonar de pacientes com FC, particularmente na melhora do aprisionamento aéreo e conseqüentemente da hiperinsuflação pulmonar e sinalizar para a elaboração de novos estudos prospectivos em longo prazo com o intuito de investigar o efeito no grau de dispnéia, na tolerância aos exercícios, no consumo de oxigênio e na melhoria da qualidade de vida dos pacientes e seus familiares.

2 OBJETIVO

Avaliar a efetividade da resposta aguda a brometo de tiotrópio, comparada a placebo, em pacientes com fibrose cística por meio de parâmetros espirométricos e de pletismografia.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram admitidos para o estudo 20 pacientes de ambos os sexos, na faixa etária dos 6 aos 20 anos, com diagnóstico de fibrose cística pelos critérios de Rosenstein *et al.*⁴⁴ e das diretrizes da Cystic Fibrosis Foundation⁹², em seguimento ambulatorial na Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança do HC-FMUSP.

3.2 Métodos

3.2.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão:

- Ter idade = 6 anos e ser capaz de executar prova espirométrica e de pletismografia.
- Não estar dependente de oxigênio diurno (saturação arterial de O₂ ≥ 90% em ar ambiente).
- Ter estabilidade clínica no momento da realização da função pulmonar.
- Ser capaz de inalar apropriadamente medicamentos administrados na forma de pó, após treinamento com o dispositivo Handihaler[®].
- Ter lido e assinado o consentimento livre e esclarecido (Anexo A).

Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão:

- Pacientes que necessitem suplementação de oxigênio no período diurno ou com distúrbio ventilatório obstrutivo grave (VEF1 < 40 %).
- Incapacidade de utilizar o dispositivo inalatório e/ou de realizar adequadamente as manobras de provas de função pulmonar (PFP) - capacidade vital forçada ou de pletismografia.
- Agudização clínica no momento da PFP e até quatro semanas antes (piora da tosse e aumento da secreção e aumento da dispnéia com ou sem febre).
- Ter asma como diagnóstico associado

3.2.2 Delineamento do estudo

O desenho do estudo foi prospectivo, transversal, duplo-cego, placebo-controlado e cruzado. Inicialmente, todos os pacientes foram treinados e testados quanto à habilidade na realização de pletismografia e para inalar medicamentos na forma de pó. Todos os pacientes já haviam realizado testes de função pulmonar anteriormente e tinham conhecimento das manobras realizadas durante o exame.

Os pacientes foram randomizados para inalar a droga ativa (brometo de tiotrópio, 18 mcg em lactose, Spiriva - Boehringer Ingelheim[®]) ou placebo (cápsula preparada sem qualquer conteúdo) através de cápsulas idênticas em dispositivo Handihaler[®]. Os pacientes foram sorteados, utilizando-se uma tábua de números aleatórios, para receber por via inalatória nas visitas uma e três a droga ou o placebo, que foram denominados respectivamente pelas

letras “A” e “B” de modo duplo-cego (Anexo B). Foram realizadas quatro visitas para cada paciente conforme o seguinte esquema:

- Visita 1: PFP pré-medicação A ou B e 30, 60, 120, 180 minutos após a inalação da droga ou placebo.
- Visita 2: PFP 24 horas após o uso da medicação A ou B.
- Visita 3: PFP pré-medicação A ou B e 30, 60, 120, 180 minutos após a inalação da droga ou placebo.
- Visita 4: PFP 24 horas após o uso da medicação A ou B.
- O intervalo entre as visitas 1 e 3 foi de sete dias.
- Antes de cada PFP foi avaliada a saturação de O₂ pela oximetria de pulso, frequência cardíaca e respiratória. Utilizou-se oxímetro da marca Nonin[®]. A pressão arterial foi avaliada nos tempos inicial, aos 180 minutos e 24 horas após a medicação, utilizando-se de manguitos de tamanho apropriado para cada paciente.

3.2.3 Avaliação da gravidade da doença

Foi utilizado o ultimo Escore de Shwachman¹⁶⁷ (Anexo C), calculado durante o seguimento ambulatorial, que avalia a gravidade da fibrose cística baseado na soma de pontuações para quatro categorias: atividade física, alterações da propedêutica pulmonar, estado nutricional e radiografia de tórax. Cada critério varia de 5 a 25 pontos, sendo que quanto menor a pontuação maior é a gravidade clínica do paciente.

3.2.4 Provas de função pulmonar

As provas espirométricas e pletismográficas foram realizadas segundo recomendações da American Thoracic Society (ATS) e da European Respiratory Society (ERS)¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Foram avaliados os seguintes parâmetros: CVF, VEF1, FEF 25-75%. Foi realizada pletismografia para determinação dos volumes e capacidades pulmonares (CPT, VR, CI e VR/CPT), resistência e condutância das vias aéreas.

O equipamento utilizado foi o pletismógrafo da marca Sensormedics[®] do laboratório de Provas de Função Pulmonar da Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança do HC-FMUSP. Todas as medidas foram realizadas no período da manhã. O equipamento foi calibrado imediatamente antes da realização do primeiro exame do período. Os resultados foram expressos em valores absolutos e em porcentagem dos valores previstos para altura e sexo segundo as equações de Polgar e Promadhat e Polgar e Weng^{171,172}.

O projeto foi aprovado pelo Comissão de Ética para Análise de Projetos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPpesq) sob protocolo número: 0814/07 (Anexo D).

3.2.5 Análise estatística

O tamanho amostral foi calculado tomando por base o critério da American Thoracic Society¹⁶⁸ que considera como resposta significativa broncodilatadora um incremento mínimo de 12% no VEF1 em relação ao valor basal como resposta significativa broncodilatadora. Com base no programa Sample Power 2.0[®], utilizando-se o teste T pareado diferente de

zero, com a bicaudal de 5% e poder de teste de 80%; estimou-se como necessário um n de 20 pacientes. Os dados antropométricos foram calculados pelo programa EpiInfo versão 3.3.2 (fevereiro de 2005) utilizando-se como referência o CDC 2000. Foram calculados os valores médios em valores absolutos e em percentuais com relação aos valores previstos para altura e sexo de todos os parâmetros funcionais analisados e os respectivos desvios padrão, nos diferentes momentos da avaliação: basal, pós-droga e pós-placebo. Foram também determinadas as médias e variações das avaliações dos parâmetros funcionais, nos diferentes momentos. Foi aplicado o teste de análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) para detectar diferenças significativas entre os valores medidos seqüencialmente nos diferentes momentos da avaliação após a administração do tiotrópio. Quando significativo, o programa aplicou automaticamente o teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações para detecção dos diferentes momentos em que as variações das medidas foram significativas com relação aos valores basais. O teste T de Student pareado foi aplicado para determinação exata do valor de p, quando as diferenças entre os diferentes momentos foram significantes ao nível de 5% pelo teste de Tukey-Kramer. Foi realizada também uma análise comparativa através do teste T pareado de Student nos momentos correspondentes em que os grupos receberam tiotropio ou placebo. Para análise da significância da variação das médias das medidas dos parâmetros vitais no grupo tiotrópio, nos diferentes momentos, utilizou-se o teste de ANOVA para a frequência, pressão arterial sistólica e oximetria de pulso e o teste não paramétrico de

Friedman para medidas repetidas para comparação das medianas da frequência respiratória e da pressão diastólica, nos diferentes momentos.

Todo o calculo estatístico foi realizado utilizando-se o programa SPSS 12.0.

Foi utilizada a regressão linear para descrever graficamente a tendência de evolução dos parâmetros ao longo do período de estudo, em ambos os grupos, utilizando-se o programa Graphpad prisme 4.

4 RESULTADOS

A Tabela 1 resume as características gerais dos pacientes estudados. Dos 20 pacientes, 10 (50%) eram do sexo masculino e 10 do feminino (50%), a média de idade foi de 12,7 anos (variação $\pm 2,84$ anos), mediana de idade: 12,9 anos. A média do índice de massa corpórea (IMC) foi 18,6 kg/m² (variação $\pm 2,9$ kg/m²), a media do escore Z para o IMC foi -0,2, variação $\pm 1,2$. A mediana do escore clínico de Schwachman-Kulczycki foi de 75 pontos. Quanto aos dados de colonização do trato respiratório aferidos nos últimos 12 meses precedentes á admissão no estudo, 15 (75 %) dos pacientes estavam infectados por *Pseudomonas aeruginosa*, sendo seis deles cronicamente, 13 (65%) por *Staphylococcus aureus*, sendo sete cronicamente e um dos pacientes era colonizado por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina. Três pacientes foram infectados pela *Burkholderia cepacia*, três pela *Stenotrophomonas maltophilia* e oito por outras bactérias: *Alcaligenes xylosoxidans* (dois), *Klebsiela pneumoniae* (dois), *Serratia marcescens* (um), *Acinetobacter* (dois), *Enterobacter cloacae* (um). Dezoito pacientes tinham insuficiência pancreática e estavam recebendo suplementação enzimática, seis pacientes tinham alteração da função hepática e estavam em uso de acido ursodeoxicólico, cinco recebiam tobramicina por via inalatória, 17 dornase alfa e quatro azitromicina por via oral.

Tabela 1 - Dados demográficos e características gerais dos pacientes com fibrose cística randomizados

Características	N= 20
Idade (anos), média± DP	12,7±2,84
Sexo (n) masculino/feminino	10/10
Peso (kg), média ± DP	40,5±11,3
Estatura (cm), média ± DP	146,1±13
IMC (kg/m ²), média ± DP	18,6±2,9
Escore Z do IMC, media ±DP	-0,2±1,2
Escore clínico de S-K (pontos), mediana.	75
Saturação arterial de O ₂ (média ± DP)	94,85±2,41
Colonização do trato respiratório:	
Crônica:	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , n(%)	6 (30)
<i>Staphylococcus aureus</i> , n +(%)	7 (35) (1 SARM*)
Intermitente:	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , n(%)	9 (45)
<i>Staphylococcus aureus</i> , n +(%)	6 (30)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , n(%)	3 (15)
<i>Burkholderia cepacia</i> , n(%)	3 (15)
Outras bactérias, n (%)	8 (40)
Medicamentos em uso:	
Dornase alfa, n (%)	17 (85)
Tobramicina inalatória n(%)	5 (25)
Enzimas digestivas, n(%)	18 (90)
Ácido desoxiursacólico n(%)	6 (30)
Azitromicina n(%)	4 (20)

DP= desvio padrão da média ,IMC= índice de massa corpórea, S-K =Schwachman-Kulczycki, ARM= *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (oxacilina)

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos dos parâmetros espirométricos e pletismográficos avaliados em valores absolutos e em percentagem dos valores previstos para idade, altura e sexo dos pacientes, dos grupos tiotropio (A) e placebo (B) na situação basal e nos diferentes momentos sucessivos após a administração da droga (A) ou placebo (B). Os valores estão expressos pela média e os respectivos desvios padrão. Os resultados completos das provas de função pulmonar desta casuística estão especificados nos Anexos E e F.

Tabela 2 - Dados dos parâmetros espirométricos e pletismográficos basais nos momentos pré-administração do tiotrópio (Grupo A) e do placebo (Grupo B)

Grupos	Tiotrópio (A)		Placebo (B)	
	Parâmetros	Valor absoluto	%do previsto	Valor absoluto
CVF (l)	2,34 ±0,73	85,75 ± 16,45	2,27 ± 0,67	84,90 ± 16,52
VEF ₁ (l)	1,79 ± 0,59	71,2 ± 17,41	1,74 ± 0,57	68,90 ± 16,26
VEF ₁ /CVF (%)	-	74,85 ± 10,94	-	73,65 ± 11,25
FEF _{25-75%} (l/seg)	1,65 ± 0,81	58,35 ± 30,22	1,53 ± 0,80	52,15 ± 25,77
VR (l)	1,21 ± 0,53	162,2 ± 64,62	1,18 ± 0,50	158,05 ± 65,91
CPT (l)	3,6 ± 0,88	102 ± 11,57	3,57 ± 0,85	101,65 ± 13,88
VR/CPT (%)	-	33,6 ± 11,29	-	32,75 ± 11,95
Rva (cmH ₂ O/l/s)	5,09 ± 1,56	153,1 ± 54,57	5,04 ± 1,67	150,65 ± 54,86
Cva (l/seg/cmH ₂ O/l)	0,089 ± 0,032	42,3 ± 18,10	0,09 ± 0,04	43,10 ± 18,39
CI (l)	1,70 ± 0,54	70,42 ± 14,41	1,72 ± 0,55	71,80 ± 18,29

Os dados estão apresentados como média ±desvio padrão. l= litros, CVF= capacidade vital forçada, VEF₁= volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF, FEF_{25-75%}= fluxo expiratório forçado entre os 25 e 75% da CVF, VR= volume residual, CPT= capacidade pulmonar total, Rva= resistência das vias aéreas, Cva = condutância das vias aéreas, CI = capacidade inspiratória

Nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 estão apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão das medidas obtidas por espirometria e pletismografia, em valores percentuais em relação aos valores previstos, na situação basal e nos diferentes momentos sucessivos após a administração de tiotrópio ou placebo. Estão mostrados os resultados da análise estatística comparativa entre as medidas repetidas no grupo tiotrópio nos diferentes momentos e entre o grupo tiotrópio e placebo em cada momento da avaliação. A análise estatística envolveu a comparação entre as médias percentuais dos valores obtidos em relação ao predito, entre os valores basais e os obtidos nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de tiotrópio pela análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) e, se significativa, fez-se uma análise entre momento basal e cada um dos diferentes momentos sucessivos primeiro pelo teste de Tukey-Kramer e depois pelo teste T de Student pareado para determinação do valor exato de p (expressos por p1), sendo que foram indicados os valores quando significantes ($p1 = 0,05$). Foi realizada também uma análise comparativa através do teste T de Student pareado nos momentos correspondentes em que os grupos receberam tiotropio ou placebo (expressos por p2).

Tabela 3 - Resultados das médias das medidas espirométricas em relação ao previsto da CVF e do VEF1 na situação basal e nos diferentes momentos de avaliação após a administração de tiotrópio e placebo. Análise estatística comparativa entre as medidas repetidas no grupo tiotrópio nos diferentes momentos e entre o grupo tiotrópio e placebo em cada momento correspondente da avaliação

Parâmetro	CVF				VEF ₁				
	Tempos	P (%)	T (%)	P1	P2	P (%)	T (%)	P1	P2
basal		84,90	85,75	-	0,6474	68,90	71,25	-	0,2997
30min		84,45	87,55	ns	0,1925	70,40	72,25	ns	0,3051
60min		85,10	85,65	ns	0,7366	69,30	70,90	ns	0,3444
120min		85,00	86,55	ns	0,4343	71,40	72,05	ns	0,6490
180min		86,20	86,70	ns	0,7311	71,65	72,75	ns	0,5124
24 horas		84,95	87,50	ns	0,0469	70,65	73,65	ns	0,0462
P3 (ANOVA)			0,3575				0,1563		

CVF= capacidade vital forçada, VEF₁= volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF, T= grupo tiotrópio, P= grupo placebo, ns= não significante, P1 = valor de significância das medidas efetuadas intragrupo entre os diferentes momentos de avaliação e o basal pelo teste T pareado, P2= valor de significância das médias das medidas efetuadas intergrupo entre o grupo tiotrópio e o placebo, nos diferentes momentos de avaliação pelo teste T pareado. P3 (ANOVA)= valor de significância da análise de variância entre as medidas repetidas em diferentes momentos efetuadas no grupo tiotrópio

Tabela 4 - Resultados das médias das medidas espirométricas em relação ao previsto do FEF 25-75% e da relação VEF1/CVF na situação basal e nos diferentes momentos de avaliação após a administração de tiotrópio e placebo. Análise estatística comparativa entre as medidas repetidas no grupo tiotrópio nos diferentes momentos e entre o grupo tiotrópio e placebo em cada momento correspondente da avaliação

Parâmetro	FEF _{25-75%}				VEF ₁ /CVF				
	Tempos	P (%)	T (%)	P1	P2	P (%)	T (%)	P1	P2
basal		52,15	58,35	-	0,1616	75,15	76,55	-	
30min		54,80	58,20	ns	0,2059	75,85	76,10	ns	
60min		53,10	57,55	ns	0,1256	75,85	76,40	ns	
120min		56,05	60,90	ns	0,1903	76,00	76,65	ns	
180min		58,00	62,45	ns	0,4065	76,40	77,40	ns	
24 horas		57,35	64,55	0,0397	0,0070	76,60	76,95	ns	
P3 (ANOVA)			0,1443				0,6091		

FEF_{25-75%} = fluxo expiratório forçado entre os 25 e 75% da CVF; CVF= capacidade vital forçada, VEF₁= volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF, T= grupo tiotrópio, P= grupo placebo, ns= não significante. P1 = valor de significância das medidas efetuadas intragrupo entre os diferentes momentos de avaliação e o basal pelo teste T pareado. P2= valor de significância das médias das medidas efetuadas intergrupo entre o grupo tiotrópio e o placebo, nos diferentes momentos de avaliação pelo teste T pareado. P3 (ANOVA)= valor de significância da análise de variância entre as medidas repetidas em diferentes momentos efetuadas no grupo tiotrópio.

Tabela 5 - Resultados das médias das medidas pleтымográficas, em relação ao previsto, do VR, CPT e da relação VR/CPT na situação basal e nos diferentes momentos de avaliação após a administração do tiotrópio e placebo. Análise estatística comparativa entre as medidas repetidas no grupo tiotrópio nos diferentes momentos e entre o grupo tiotrópio e placebo em cada momento correspondente da avaliação)

Parâmetros	VR			CPT			VR/CPT					
	P	T	P1	P2	P	T	P1	P2	P	T	P1	P2
basal	158,05	162,20	-	0,7288	101,65	102,00	-	0,9042	32,75	33,60	-	0,6314
30 min	163,75	154,20	ns	0,3652	101,35	100,80	ns	0,7847	34,00	32,45	ns	0,3590
60 min	155,85	148,10	ns	0,4323	99,30	100,25	ns	0,7006	33,30	31,30	ns	0,2721
120 min	148,00	154,05	ns	0,3359	98,85	102,00	ns	0,0529	32,20	32,10	ns	0,9161
180 min	162,25	136,65	0,0122	0,1275	101,40	99,30	ns	0,6191	32,30	29,45	0,0119	0,1212
24 horas	167,85	137,40	0,0229	<0,0001	101,85	97,70	0,0468	0,0002	35,20	30,20	0,0395	0,0005
P3 (ANOVA)	0,0082				0,0973				0,0462			

VR= volume residual, CPT= capacidade pulmonar total, T= grupo tiotrópio, P= grupo placebo, ns= não significante. P1 = valor de significância das medidas efetuadas intragrupo entre os diferentes momentos de avaliação e o basal pelo teste *t-Student* pareado. P2= valor de significância das medidas efetuadas intergrupo entre o grupo tiotrópio e o placebo, nos diferentes momentos de avaliação pelo teste *t-student* pareado. P3 (ANOVA)= valor de significância da análise de variância entre as medidas repetidas em diferentes momentos efetuadas no grupo tiotrópio

Tabela 6 - Resultados das médias das medidas pleismográficas da resistência e condutância das vias aéreas e da capacidade inspiratória (CI) na situação basal e nos diferentes momentos de avaliação após administração de tiotrópio e placebo. Resultados da análise estatística comparativa entre as medidas repetidas no grupo tiotrópio nos diferentes momentos e entre o grupo tiotrópio e placebo em cada momento correspondente da avaliação

Parâmetros	Condutância			Resistência			CI			
	P	T	P1 P2	P	T	P1 P2	P	T	P1 P2	
basal	43,10	42,30	-	150,65	153,10	-	71,80	70,42	-	0,9145
30 min	43,90	46,90	0,0302	156,05	146,15	0,2446	74,15	75,50	ns	0,6890
60 min	46,35	50,65	0,0028	143,90	138,30	0,1075	70,60	75,35	ns	0,2277
120 min	46,85	50,30	0,0045	140,00	136,85	0,1456	71,60	77,10	ns	0,1305
180 min	47,85	54,40	0,0031	136,85	130,40	0,0261	69,35	75,70	ns	0,2120
24 horas	44,35	54,65	0,0001	143,30	124,55	0,0049	73,35	73,35	ns	0,9999
P3	<0,0001			0,0017						
(ANOVA)										

CI= capacidade inspiratória T= grupo tiotrópio, P= grupo placebo, ns= não significante. P1 = valor de significância das medidas efetuadas intragrupo entre os diferentes momentos de avaliação e o basal pelo teste *t-Student* pareado. P2= valor de significância das médias das medidas efetuadas intergrupo entre o grupo tiotrópio e o placebo, nos diferentes momentos de avaliação pelo teste *t-Student* pareado. P3 (ANOVA)= valor de significância da análise de variância entre as medidas repetidas em diferentes momentos efetuadas no grupo tiotrópio

A seguir são apresentadas as representações gráficas das medidas obtidas para os parâmetros analisados no momento basal e nos diferentes momentos após a administração do tiotrópio. Os valores utilizados foram as médias dos valores percentuais em relação ao previsto para cada momento da avaliação. Estão indicados na figura os valores de p determinados pelo teste T de Student pareado, entre os diferentes momentos de avaliação e o basal, quando houve significância estatística pelo teste de variância de medidas repetidas (ANOVA) e pelo de Tukey-Kramer.

Não houve mudanças significativas nas médias dos valores percentuais em relação ao previsto obtidos para o VEF1 ($p = 0,1563$), para a CVF ($p = 0,3575$) e para a relação VEF1/CVF ($p = 0,6091$), com relação à média dos percentuais do previsto dos valores basais, em todos os momentos de avaliação pós tiotrópio (Gráficos 1, 2 e 3).

Gráfico 1 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da CVF (capacidade vital forçada) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18 mcg de tiotrópio. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes momentos analisados (ANOVA)

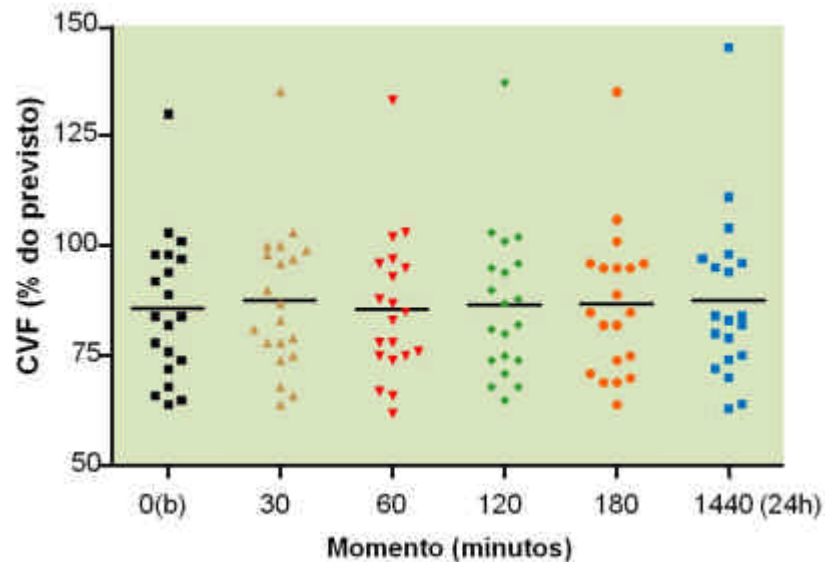


Gráfico 2 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas do VEF₁ (volume expiratório forçado no primeiro segundo da capacidade vital forçada) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18mcg de tiotrópio. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes momentos analisados (ANOVA)

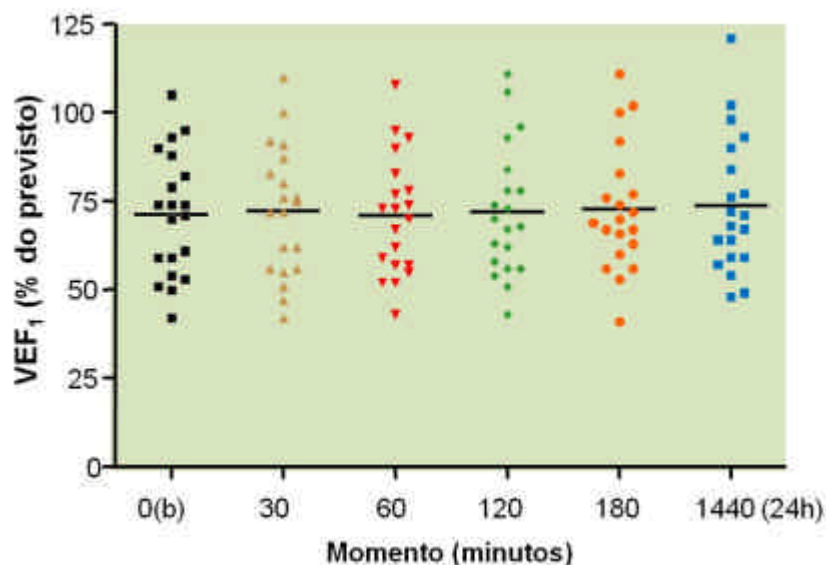
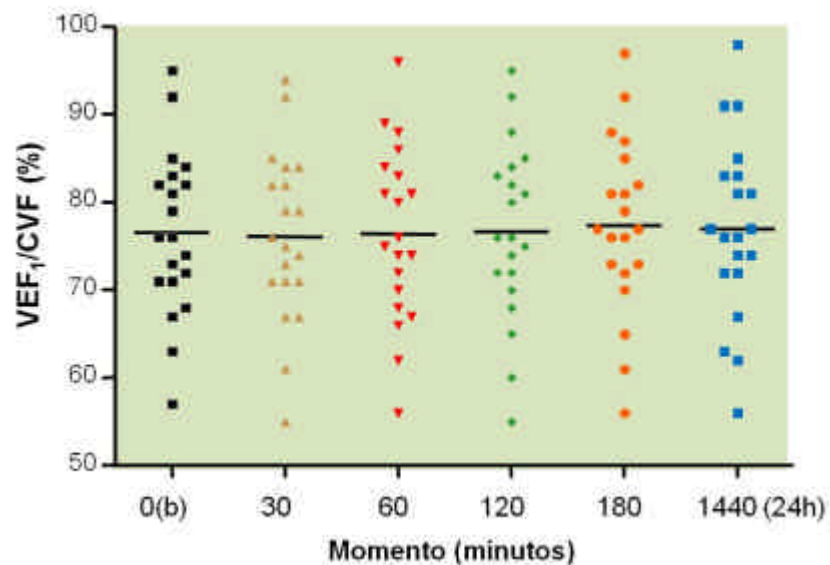
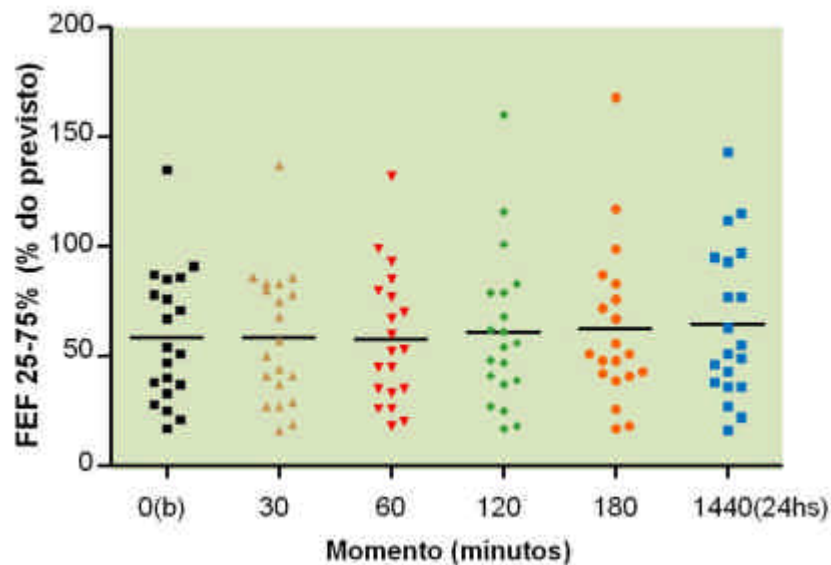


Gráfico 3 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da relação VEF₁/CVF no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18mcg de tiotrópio. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes momentos analisados (ANOVA)



Com relação à avaliação do FEF 25-75%, houve aumento significativo nas médias dos valores percentuais em relação ao previsto, entre o valor basal e o momento 24 horas após a administração do tiotrópio ($p = 0,0397$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas do FEF 25-75% no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18 mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos basal e no momento 24 horas (t-Student, $p = 0,0397$)



Houve queda significativa nas médias dos valores em relação ao previsto do VR, em relação ao basal, nos momentos 180 minutos ($p = 0,0122$) e 24 horas ($p = 0,0229$) pós tiotrópio (Gráfico 5). Observou-se também queda significativa, dos valores percentuais médios dos valores em relação ao previsto da CPT em relação ao basal no momento 24 horas pós tiotrópio ($p = 0,0468$) (Gráfico 6). Resultados semelhantes observados para o VR foram obtidos para os valores médios percentuais da relação VR/CPT, ocorrendo queda significativa, em relação ao basal nos momentos 120 minutos ($p = 0,0119$) e 24 horas ($p = 0,0395$) (Gráfico 7).

Gráfico 5 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas do VR (volume residual) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18 mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos basal e 180 minutos (T de Student; $p = 0,0122$) e entre o basal e 24 horas (T de Student; $p = 0,0229$)

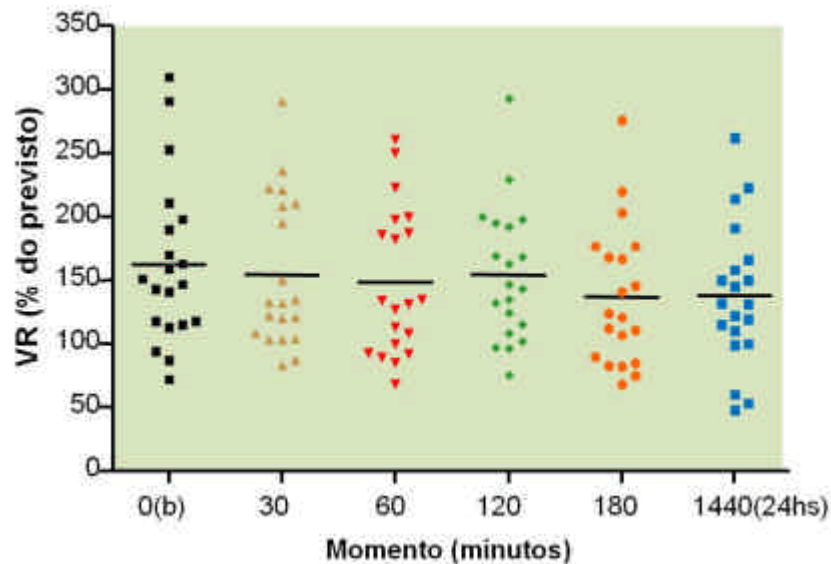


Gráfico 6 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da CPT (capacidade pulmonar total) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18 mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos basal e 24 horas (T de Student; $p = 0,0468$)

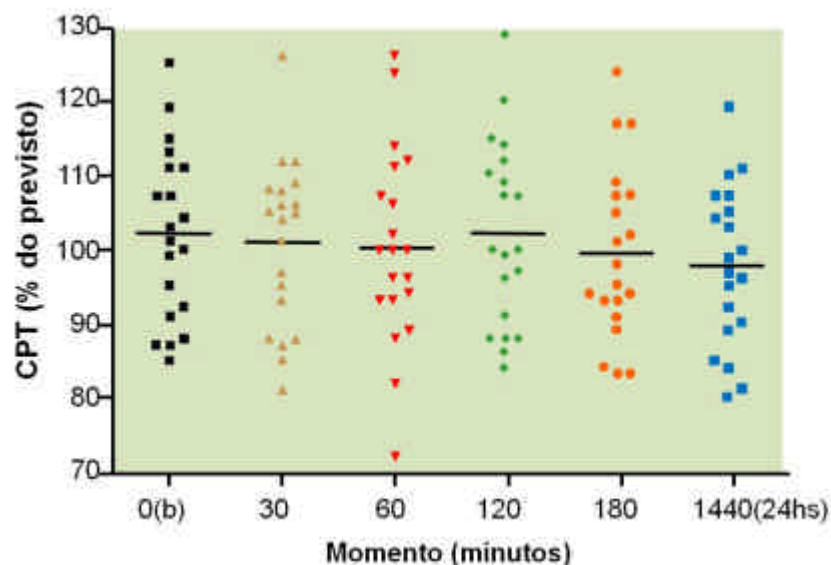
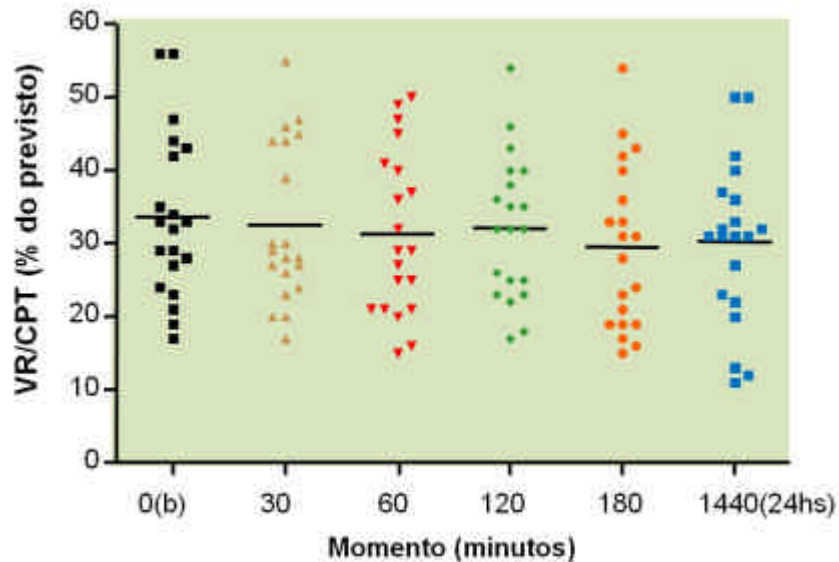


Gráfico 7 - Representação gráfica das médias das medidas da relação VR/CPT (relação do volume residual com a capacidade pulmonar total) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos basal e 180 minutos (T de Student; $p = 0,0119$) e entre o basal e 24 horas (T de Student; $p = 0,0395$)



Houve um aumento significativo das médias dos valores em relação ao previsto da condutância das vias aéreas, com relação à media dos valores basais, em todos os momentos da avaliação pós tiotrópio (Gráfico 8). Houve uma queda concomitante das médias dos valores em relação ao previsto da resistência das vias aéreas, nos momentos 180 minutos ($p = 0,0261$) e 24 horas ($p = 0,049$) da avaliação pós tiotrópio (Gráfico 9).

Gráfico 8 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da condutância das vias aéreas no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18 mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre o momento basal e todos os outros momentos analisados pelo teste T de Student: 30 minutos, $p = 0,0302$; 60 minutos, $p = 0,0028$; 120 minutos, $p = 0,0045$; 180 minutos, $p = 0,0031$, 24horas, $p = 0,0001$

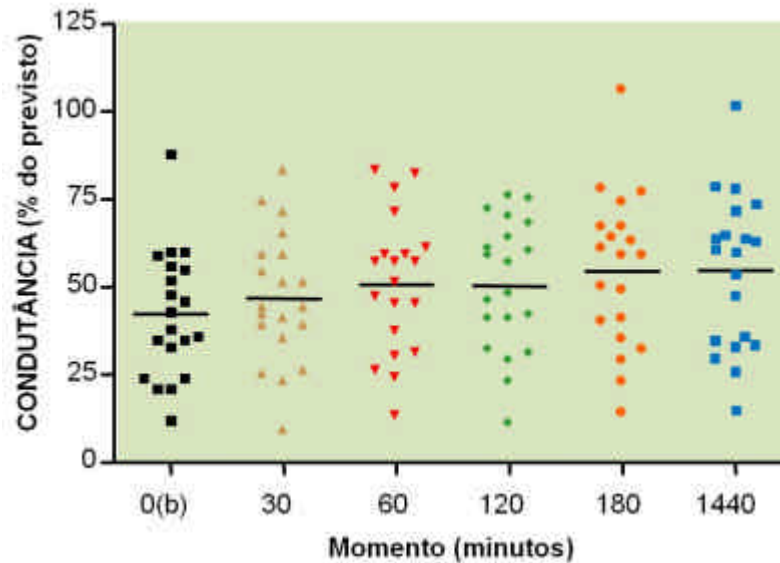
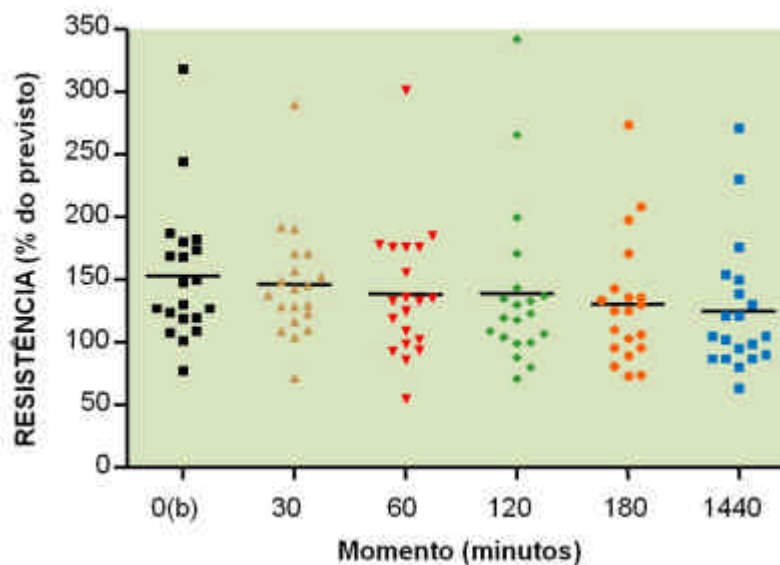
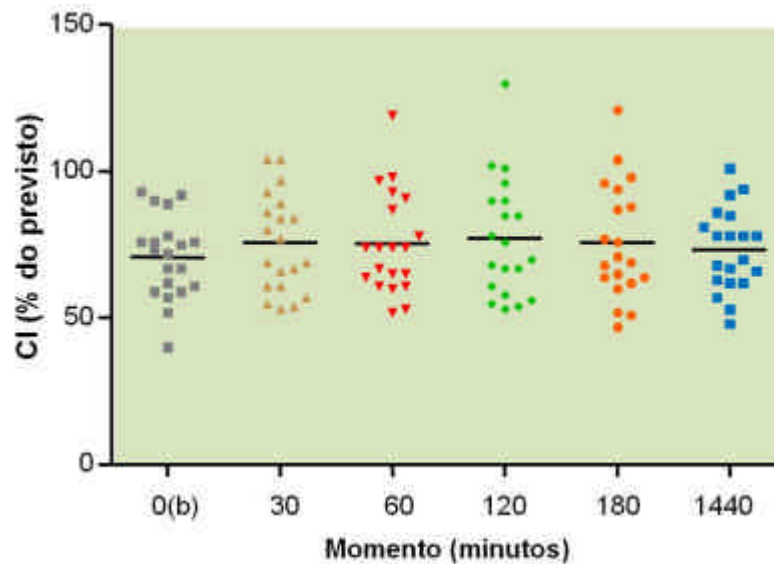


Gráfico 9 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da resistência das vias aéreas no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18mcg de tiotrópio. Houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos basal e 180 minutos (T de Student; $p = 0,0261$) e entre o basal e 24 horas (T de Student; $p = 0,049$)



Não houve mudanças significativas nas médias dos valores percentuais em relação ao previsto obtidos para a capacidade inspiratória, com relação à média dos percentuais do previsto dos valores basais, em todos os momentos de avaliação pós tiotrópio (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Representação gráfica das médias das medidas em percentual com relação ao previsto obtidas da capacidade inspiratória (CI) no momento basal (b) e nos momentos sucessivos após a administração de uma dose de 18mcg de tiotrópio. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes momentos analisados (ANOVA)



Quando comparadas as médias dos valores percentuais obtidos com relação ao previsto dos parâmetros analisados do grupo placebo em relação ao tiotrópio, nos diferentes momentos correspondentes de avaliação, observou-se os seguintes resultados:

- Houve aumento significativo no grupo tiotrópio em relação ao placebo, pelo teste T de Student pareado, nos parâmetros espirométricos CVF ($p = 0,0469$), VEF1 ($p = 0,0462$) FEF 25-75% ($p = 0,007$) no momento 24 horas.
- Quanto aos parâmetros que avaliam aprisionamento aéreo, observou-se redução significativa, pelo teste T de Student, no VR ($p = <0,0001$), CPT ($p = 0,0468$) e relação VR/CPT ($p = 0,0005$), no grupo tiotrópio em relação ao placebo, no momento 24 horas.
- Em relação á análise da condutância e resistência das vias aéreas observou-se, no teste T de Student, um aumento significativo da condutância no grupo tiotrópio em relação ao placebo nos momentos 180 minutos ($p = 0,0495$) e 24 horas ($p = 0,0013$) e redução significativa da resistência no grupo placebo no momento 24 horas ($p = 0,0213$).
- Quanto à CI não houve alteração significativa entre o grupo tiotrópio e placebo em todos os momentos da avaliação (ANOVA).

Os Gráficos 11, 12 e 13 mostram os gráficos de tendência resultante das comparações entre os grupos placebo e tiotrópio nos diferentes momentos de avaliação, para os parâmetros CVF, VEF1 e FEF 25-75%. Observa-se uma tendência de aumento dos valores percentuais em relação ao previsto desses

parâmetros, ao longo dos momentos analisados, no grupo tiotrópio, em relação ao placebo. Considerando-se que esses parâmetros tem distribuição normal foi possível avaliar os valores percentuais médios no percentil 15 e no percentil 85 (correspondentes a aproximadamente \pm um desvio padrão acima e abaixo da média dos valores percentuais obtidos com relação ao previsto), em ambos os grupos estudados, dos parâmetros CVF, VEF1 e FEF 25-75%. A intenção foi estabelecer uma relação entre gravidade funcional e resposta broncodilatadora ao tiotrópio. Observa-se que o grupo de pacientes de maior gravidade do ponto de vista funcional considerando-se os valores médios basais com relação ao previsto (situados no percentil 15) tem menor tendência de resposta ao tiotrópio comparado ao placebo. Por outro lado, o grupo de pacientes de menor gravidade funcional basal (situados no percentil 85) tem melhor tendência de resposta em relação ao grupo placebo.

Gráfico 11 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas da CVF e da sua tendência de evolução, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação. Estão também expressas no gráfico, as comparações entre as médias dos valores, em ambos os grupos, nos percentis 15 e 85

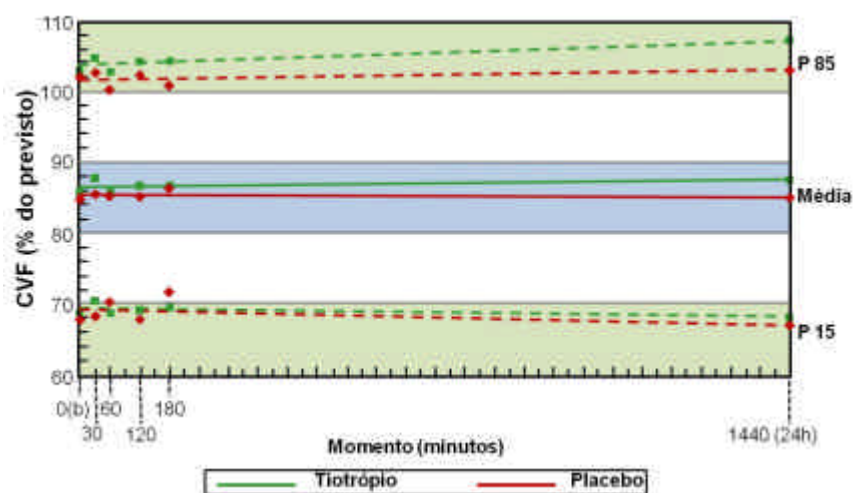


Gráfico 12 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas do VEF1 e da sua tendência de evolução, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação. Estão também expressas no gráfico, as comparações entre as médias dos valores, em ambos os grupos, nos percentis 15 e 85

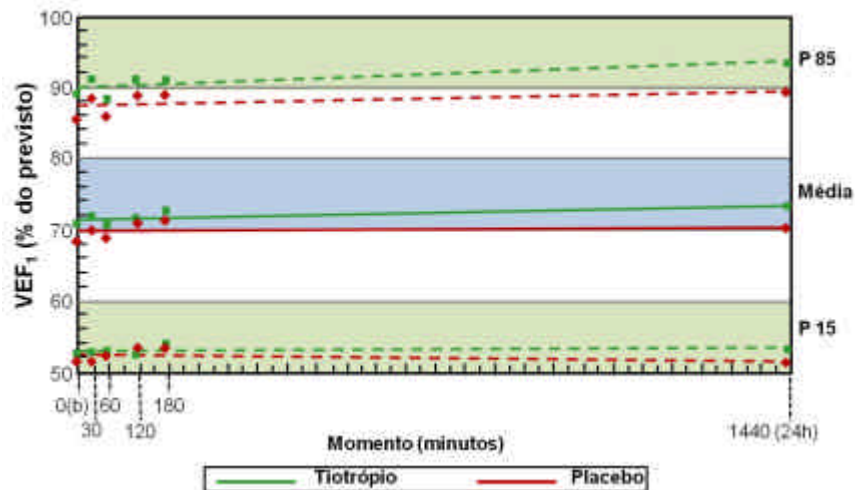
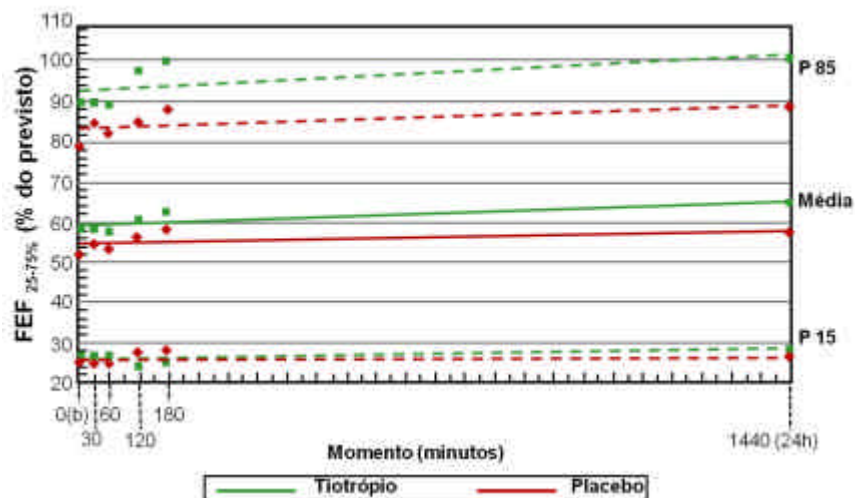


Gráfico 13 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas do FEF25-75% e da sua tendência de evolução, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação. Estão também expressas no gráfico, as comparações entre as médias dos valores, em ambos os grupos, nos percentis 15 e 85



Os Gráficos 14,15 e 16 mostram os gráficos de tendência resultante das comparações entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação, considerando-se os parâmetros que avaliam o aprisionamento aéreo (CPT, VR e relação VR/CPT). Observa-se uma tendência acentuada de queda das médias dos valores percentuais em relação ao previsto, ao longo dos momentos analisados. Isto reflete uma melhora significativa do aprisionamento aéreo dos pacientes no grupo tiotrópio, considerando-se ainda que na comparação estatística entre as médias dos valores percentuais com relação ao previsto desses parâmetros entre os grupos placebo e tiotrópio, houve uma melhora no grupo tiotrópio no momento 24 horas.

Gráfico 14 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas da CPT, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação

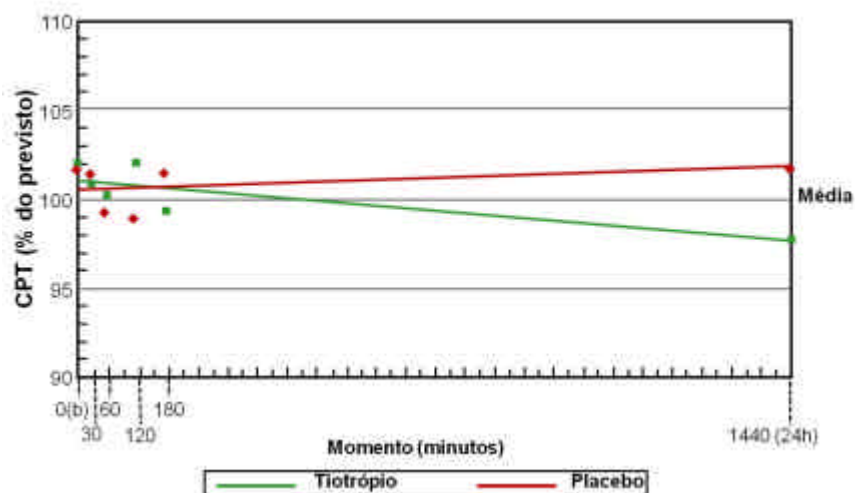


Gráfico 15 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas do volume residual (VR), entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação

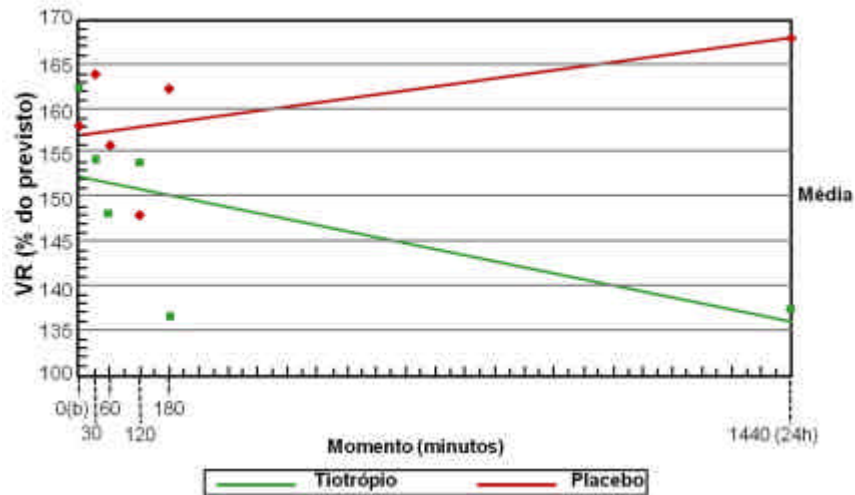
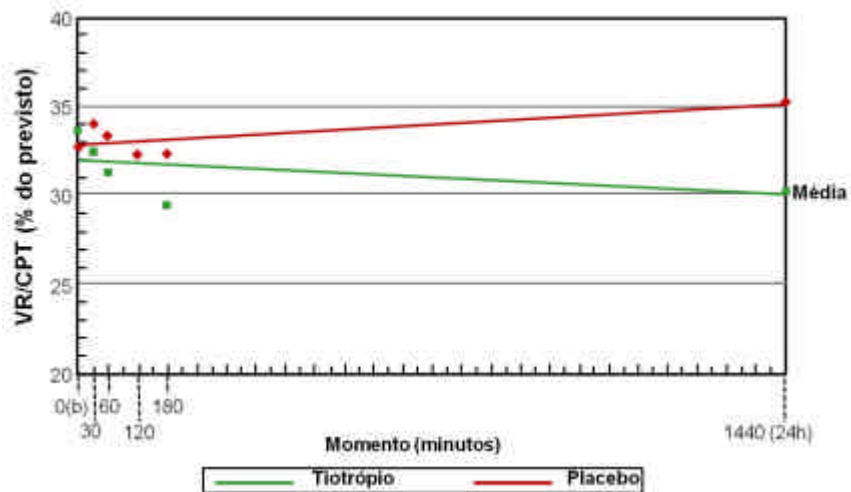


Gráfico 16 - Representação gráfica da comparação das medias dos valores percentuais da relação VR/CPT, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação



Os Gráficos 17 e 18 mostram os gráficos de tendência da condutância e resistência das vias aéreas, comparando-se as médias dos valores percentuais em relação ao previsto entre os grupos placebo e tiotrópio, ao longo dos diferentes momentos da avaliação. Observa-se uma tendência de aumento acentuado na condutância das vias aéreas e queda na resistência das vias aéreas, o que pode indicar um aumento da permeabilidade das vias aéreas no grupo que recebeu tiotropio.

Gráfico 17 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas da resistência das vias aéreas, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação

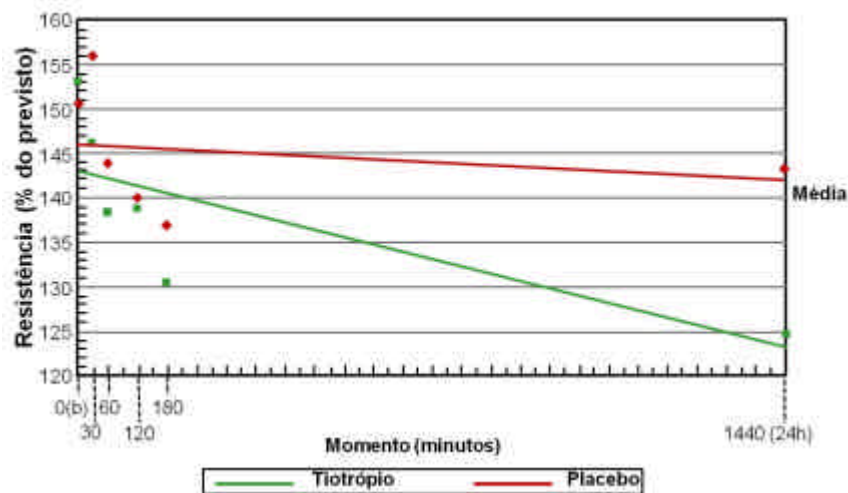
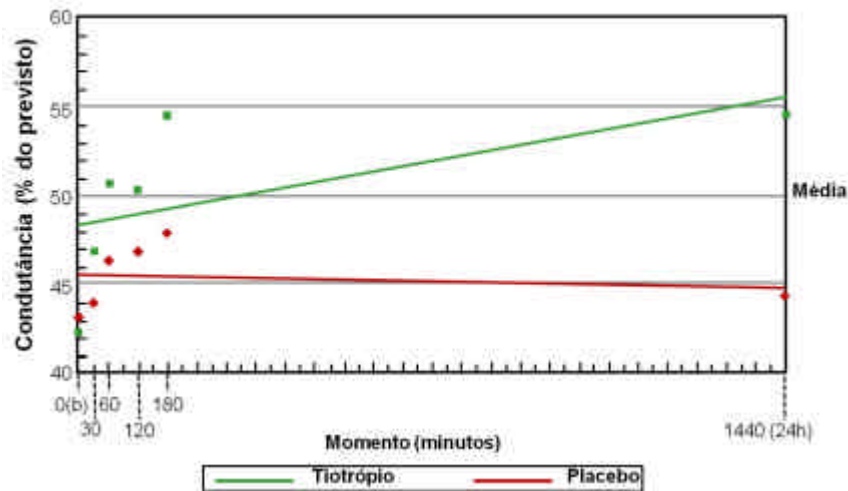
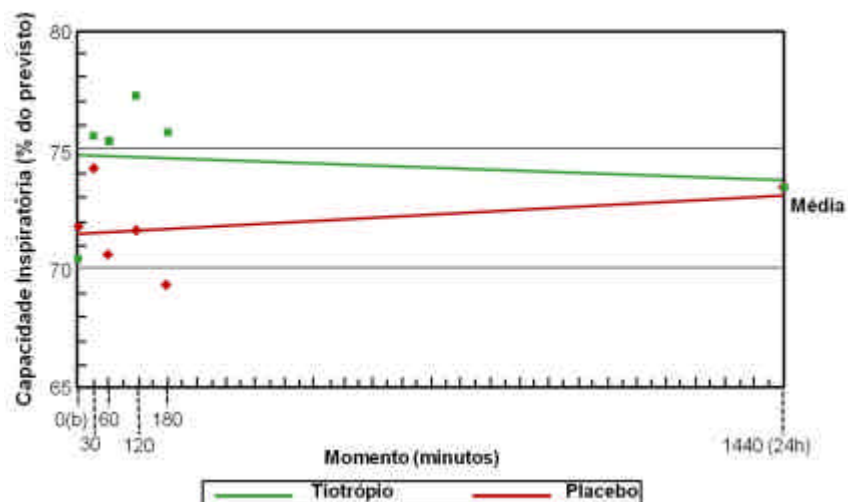


Gráfico 18 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas da condutância das vias aéreas, entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação



O Gráfico 19 mostra a tendência dos valores médios percentuais em relação ao previsto da CI, comparando-se o grupo placebo ao grupo tiotrópio. Não houve tendência de melhora desse parâmetro ao longo do tempo com relação ao grupo placebo.

Gráfico 19 - Representação gráfica da comparação das médias dos valores percentuais com relação ao previsto das medidas da capacidade inspiratória (CI), entre os grupos placebo e tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação



Na Tabela 7 estão especificadas as médias ou medianas das medidas da frequência respiratória, frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diastólica e oximetria de pulso efetuadas no grupo tiotrópio, nos diferentes momentos de avaliação. A intenção foi avaliar os possíveis efeitos adversos do tiotrópio através da análise da variação desses parâmetros nos diferentes momentos seqüenciais de avaliação. Foram selecionados para avaliação os momentos basal, 60 minutos, 180 minutos e 24 horas. Foi realizado o teste de ANOVA para medidas repetidas para análise de variação das médias dos parâmetros frequência cardíaca, PA sistólica e oximetria nos diferentes momentos, pois essas medidas mostraram uma distribuição normal. Utilizou-se o teste não paramétrico de Friedman para comparação da variação das medianas da frequência respiratória e da PA diastólica, entre os diferentes momentos.

Tabela 7 - Resultados das medidas da frequência cardíaca, frequência respiratória, pressões sistólica e diastólica e oximetria de pulso na situação basal e nos diferentes momentos de avaliação após a administração de tiotrópio. Análise estatística comparativa entre as médias (ANOVA) ou das medianas (teste não paramétrico de Friedman) para as medidas repetidas no grupo tiotrópio nos diferentes momentos

Parâmetros/ Tempo	FR (mediana irpm)	FC (média, pbm)	PA sistólica (média, mmHg)	PA distólica (mediana, mmHg)	Oximetria (%)
basal	22	86,50	96,00	52,50	94,85
60Nmin	20	86,15	97,25	50,50	95,35
180 min	22	87,20	95,25	45,50	95,25
24 horas	22	88,25	96,25	51,50	95,30
p	0,0696	0,8331	0,7635	0,7176	0,5791

5 DISCUSSÃO

A fibrose cística é uma doença muito grave quanto ao acometimento pulmonar, havendo colonização precoce e infecção pulmonar crônica por agentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e outros agentes, o que acarreta inflamação crônica das vias aéreas, distúrbio ventilatório obstrutivo, desenvolvimento de bronquiectasias e doença supurativa obstrutiva crônica das vias aéreas^{56,70,173}. Como consequência, ocorre queda progressiva da função pulmonar ao longo da vida dos pacientes, o que culmina em dispnéia progressiva, piora da qualidade de vida, evolução para transplante pulmonar e óbito por insuficiência respiratória^{42,91}. Vários medicamentos com atividade antiinfeciosa, antiinflamatória, mucolíticos e broncodilatadores tem sido testados nessas crianças com o objetivo de melhorar a função pulmonar, impedir a sua queda progressiva, reduzir o grau de dispnéia e melhorar a qualidade de vida dos pacientes^{1,89,92}. Qualquer tentativa nesse sentido merece consideração desde que não constitua fator de risco para os pacientes.

Este estudo analisou, durante o período de 24 horas, a resposta funcional aguda a uma dose de 18 mcg de brometo de tiotrópio em crianças e adolescentes com fibrose cística, na faixa etária de 6 a 20 anos, média de idade: 12,7 ± 2,84 anos. O desenho da pesquisa foi transversal, prospectivo, duplo cego, randomizado, placebo controlado. Foram incluídos 20 pacientes

com doença estável, fora de agudização pulmonar, com VEF1 acima de 40% (média de $71,2 \pm 17,41$ em relação ao previsto), aptos para inalar medicamentos na forma de pó, randomizados através de uma tábua de randomização aleatória para receber brometo de tiotrópio (A) ou placebo (B). Os pacientes foram avaliados na condição basal e 30, 60, 180 minutos e 24 horas após a inalação da droga ou placebo. Os pacientes que receberam o tiotrópio recebiam o placebo após uma semana e vice-versa. A análise dos parâmetros espirométricos e pletismográficos demonstraram que, após o uso da droga, houve aumento estatisticamente significativo ao longo do tempo em relação aos valores basais e/ou em relação ao grupo placebo, porém em tempos diferentes, no VEF1, na CVF, no FEF 25-75%, na CPT e condutância das vias aéreas e redução significativa no volume residual, na relação VR/CPT e na resistência e das vias aéreas. Não se observou incremento agudo significativo na CI. Houve uma melhora significativa mais precoce da condutância das vias aéreas já aos 30 minutos após exposição à droga e estes incrementos se mantiveram significativos e crescentes nos tempos sucessivos em relação ao valor basal, até as 24 horas denotando um efeito gradual e persistente do tiotrópio, conforme já descrito por outros autores em pacientes com DPOC. A curva de incremento de resposta funcional pelo tempo foi ascendente comparando com os valores médios basais e com o placebo nos diferentes tempos. Houve redução significativa do volume residual e da relação VR/CPT, este achado demonstra que o medicamento pode reduzir agudamente o aprisionamento aéreo e a hiperinsuflação pulmonar e este efeito pode ser mantido por até 24 horas.

Este foi o primeiro estudo na literatura que analisou o efeito do tiotrópio em pacientes com fibrose cística na faixa etária pediátrica e seus resultados mostram uma nova perspectiva quanto ao uso desse medicamento por tempo prolongado, diariamente, com objetivo de melhorar a função pulmonar e o desconforto respiratório crônico dos pacientes.

O brometo de tiotrópio é uma droga anticolinérgica de uso habitual em pacientes adultos com doença pulmonar obstrutiva crônica das vias aéreas, nos quais o seu uso prolongado demonstrou melhora do grau de dispnéia, do aprisionamento aéreo, da hiperinsuflação dinâmica, de tolerância ao exercício, do consumo de oxigênio durante o exercício e da qualidade de vida dos pacientes^{130,135,174}. Os efeitos adversos observados pelo uso crônico foram mínimos nessa faixa etária, apenas sensação de secura na boca e nenhum efeito cardiovascular agudo considerável¹³⁰. Por outro lado, uma droga anticolinérgica da qual o brometo de tiotrópio derivou, o brometo de ipratrópio, foi aprovada há cerca de 20 anos e tem sido utilizada universalmente com sucesso por via inalatória no tratamento de crises de asma aguda em crianças de qualquer faixa etária sem efeitos adversos significativos^{130,175-179}.

Neste estudo houve monitoramento de efeitos adversos através da análise da frequência cardíaca, frequência respiratória, saturação arterial de O₂ por oximetria de pulso e pressão arterial, e não observamos qualquer efeito adverso estatisticamente significativo através da análise desses parâmetros. Todos os pacientes candidatos admitidos no estudo estavam na faixa etária acima de 6 anos de idade, com idade média de 12 anos, quando

a doses de anticolinérgicos e de outros medicamentos não diferem substancialmente das de adultos, bem como seus efeitos adversos conhecidos. O brometo de tiotrópio foi utilizado uma única vez, em dose única, diferentemente de como é recomendado pelas diretrizes em pacientes adultos com DPOC, ou seja, diariamente por tempo prolongado, por meses ou anos^{162,180,181}. O intuito foi verificar a resposta aguda que, segundo dados da literatura, poderia refletir resposta funcional semelhante ao que teríamos com o seu uso crônico^{139,143}. A dose que utilizamos, 18 mcg por dia, foi a dose mínima que produziu melhor efeito na melhora funcional nos estudos de farmacocinética realizados em adultos^{140,145}.

Os broncodilatadores são drogas consagradas e efetivas na liberação do broncoespasmo em pacientes com doença obstrutiva crônica das vias aéreas¹³¹. Nos pacientes com fibrose cística a resposta broncodilatadora aos beta-agonistas é variável, havendo a possibilidade de uma resposta paradoxal em virtude da instabilidade das vias aéreas produzida pela inflamação crônica e lesão estrutural brônquica que afeta o seu arcabouço cartilaginoso de sustentação^{110,115,118}. Os estudos realizados com beta-agonistas demonstraram até o momento respostas variáveis, sendo que a utilização de beta agonistas, incluindo os de longa ação parecem ter melhor efeito nos pacientes portadores de hiperresponsividade brônquica demonstrada por testes de broncoprovocação^{114,118}.

Houveram poucos estudos com a utilização do anticolinérgico brometo de ipratrópio em pacientes com fibrose cística e nenhum com a utilização do brometo de tiotrópio. Halfhide *et al.*¹¹⁸ em revisão sistemática

identificaram quatro estudos^{121,123,128,129} que analisaram o benefício potencial do brometo de ipratrópio inalado em um total de 79 pacientes com FC, estáveis, na faixa etária de 6 a 43 anos. Três dos estudos demonstraram aumento estatisticamente significativo no VEF1 em resposta á inalação de brometo de ipratrópio^{123,128,129}. Um aumento agudo no VEF1 maior que 10% após inalação de brometo de ipratrópio foi observado em um pequeno subgrupo de pacientes que também apresentavam melhora do fluxo aéreo apos inalação de beta adrenérgicos de curta ação^{123,128}.

5.1 O Papel do Sistema Colinérgico na Fisiopatologia da Doença Pulmonar da FC

Existem três subtipos de receptores muscarínicos com papel definido identificados nos pulmões¹⁸². Os receptores mediadores da broncoconstrição pertencem ao subtipo M3, sendo do que a secreção de muco é mediada pelos receptores M1 e M3¹⁸³. A estimulação desses receptores resulta em vasodilatação pela ativação de receptores M3 nas células endoteliais que liberam oxido nítrico¹⁸². Os receptores M1 estão também localizados nos gânglios parassimpáticos, onde facilitam a neurotransmissão mediada via receptores nicotínicos¹⁸². Existem também receptores inibidores muscarínicos (autoreceptores) nos nervos colinérgico das vias aéreas, pertencentes ao subtipo M2, que inibem a liberação de acetilcolina e que servem para limitar a broncoconstrição vagal, exercendo um mecanismo de auto-regulação¹⁸².

Esses receptores muscarínicos estão localizados nos músculos lisos de todas as vias aéreas, embora sua densidade seja maior nas grandes vias¹⁸⁴.

Estão também localizados no epitélio e nas glândulas submucosas, justificando o efeito estimulador da acetilcolina das secreções mucosas¹⁸³. O estímulo inflamatório aumenta a síntese de acetilcolina nas células epiteliais por aumento de expressão da acetilcolinesterase¹⁸². Teoricamente isto poderia então contribuir para o efeito colinérgico nas doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas^{182,185}. Este mecanismo pode ser importante na obstrução das vias aéreas periféricas que não recebem inervação colinérgica, mas que podem ter um papel relevante na fisiopatologia das doenças pulmonares crônicas^{182,185}. A acetilcolinesterase também é expressa nas células inflamatórias incluindo macrófagos e T linfócitos, indicando uma outra via de atuação da acetilcolina nas doenças inflamatórias das vias aéreas^{186,187}. As células inflamatórias não somente tem a capacidade de sintetizar acetilcolina, mas também respondem à acetilcolina através da ativação de receptores muscarínicos¹⁸². Isto sugere a possibilidade das drogas anticolinérgicas terem um efeito inibitório nas células inflamatórias que são ativadas pela liberação neural e extra neural de acetilcolina¹⁸². Os linfócitos T são ativados pela acetilcolina via receptores M1 para liberação de interleucina 2, o que possibilita a sua proliferação¹⁸⁸. A acetilcolina também estimula as células epiteliais brônquicas e macrófagos a liberar citocinas tal como o fator de necrose tumoral e fatores quimiotáticos para monócitos e neutrófilos via receptores M1^{189,190}.

Adicionalmente, outros mecanismos fisiopatológicos relacionados à função da proteína CFTR podem estar envolvidos na doença pulmonar da FC^{18,191}. A defesa aguda das vias aéreas é mediada centralmente pela via

vagal, é primariamente colinérgica e estimula um volume copioso de secreção mucosa em resposta e a insultos agudos das vias aéreas. Na FC o mecanismo agudo de defesa reflexa pode estimular as glândulas a produzir grandes quantidades de muco, embora suas propriedades estejam alteradas.

A defesa inata das vias aéreas é constituída por baixos níveis de secreção mucosa, atividade mucociliar e fagócitos residentes na superfície mucosa, responsáveis por manter a sua esterilidade¹⁹². A secreção mucosa é controlada por neurônios periféricos intrínsecos das vias aéreas e reflexos locais e pode depender desproporcionalmente de mecanismos não colinérgicos, sendo a maior parte da secreção produzida pelo peptídeo vasoativo intestinal (PVI), acetilcolina (AC) e taquicininas¹⁹³. Recentemente hipotetizou-se que neurônios intrínsecos das vias aéreas que expressam PVI e AC abundantemente, estão normalmente ativos e estimulam a produção de baixas quantidades de secreção pelas glândulas mucosas, como um dos componentes da defesa inata de mucosas, sendo que esta atividade de controle é CFTR dependente¹⁹¹. Na FC as glândulas mucosas das vias aéreas não secretam em resposta ao VIP isoladamente, mas secretam em resposta à AC e falham em mostra um sinergismo entre VIP, taquicininas e AC, o que é observado em glândulas normais. Choy *et al.*¹⁹¹ em estudo recente demonstraram que baixos níveis de PVI e AC produzem significativa secreção mucosa em células glandulares humanas por uma forte interação sinérgica. No entanto este sinergismo, dependente de CFTR, está perdido em glândulas de pacientes com FC, o que acarreta produção excessiva de

muco e é um dos fatores de vulnerabilidade às infecções bacterianas e de obstrução brônquica.

Portanto, está demonstrado que o sistema colinérgico tem um papel importante na regulação do tônus das vias aéreas, na secreção mucosa e na doença inflamatória das vias aéreas e que a utilização de drogas anticolinérgicas são úteis na liberação da obstrução ao fluxo aéreo e poderia ter um papel secundário no controle da inflamação¹⁸⁵.

5.2 A Análise do Efeito do Tiotrópio Sobre os Parâmetros Espirométricos

Em pacientes portadores de DPOC ocorre uma melhora considerável na função pulmonar com a terapêutica broncodilatadora baseando-se em critérios padronizados de resposta significativa a broncodilatadores^{143,148,162,180,194}. Nestes pacientes a terapêutica broncodilatadora parece ser mais efetiva com drogas anticolinérgicas do que com os simpatomiméticos, devido às peculiaridades das alterações fisiopatológicas envolvidas na DPOC, particularmente ao papel do sistema nervoso colinérgico em controlar e o tônus da via aérea nesses pacientes¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Do ponto de vista farmacocinético, o tiotrópio tem uma ligação mais longa (horas) aos receptores muscarínicos M3 responsáveis pela broncodilatação do que o ipratrópio (minutos)¹⁸². O tiotrópio também se dissocia mais rapidamente dos receptores M2 (cuja estimulação resulta na liberação de acetilcolina) do que dos receptores M3¹⁸². Esses efeitos justificam as observações do seu efeito prolongado do tiotropio nas vias aéreas de pacientes com DPOC nos estudos em que foram utilizadas dose única ou doses múltiplas, descritos a seguir.

Maesen *et al.*¹⁴⁰ em estudo randomizado, duplo cego, placebo controlado, cruzado, avaliaram 35 pacientes com DPOC recebendo doses únicas, variando de 10 a 80 mcg de tiotrópio e placebo, com um período de “Washout” entre os testes de 72 horas. Os testes de função pulmonar foram realizados antes e em intervalos de tempos regulares até 32 horas após a administração da droga ou placebo. Quando comparado ao grupo placebo, houve melhora significativa no VEF1, CVF e no FEF 25-75%. O pico de resposta broncodilatadora medida pelo VEF1 foi atingido em uma a quatro horas, com um aumento de 19 a 26% do valor basal, comparado a um aumento de 16% no grupo placebo, por efeito do aprendizado. A duração do efeito se entendeu até 32 horas, exceto para a dose de 10 mcg, e houve uma clara relação de dose resposta entre as doses utilizadas (10, 20, 40 e 80 mcg). Não houve evidências de efeitos adversos sistêmicos.

Van Noord *et al.*¹³⁹ realizaram estudo duplo cego, randomizado, controlado com brometo de ipratrópio para analisar o tempo de início do estado de equilíbrio farmacológico (“steady state”) do tiotrópio em pacientes com DPOC com média de VEF1 de 1,13 litros (38 % do valor previsto). Os pacientes receberam por uma semana, 18 mcg de tiotrópio uma vez ao dia ou 40 mcg de ipratrópio quatro vezes ao dia. Nesse grupo, houve um aumento médio no VEF1 de 0,19 litros (18%), no oitavo dia, em relação ao basal, sendo que 90 % desse aumento ocorreu após 24 horas da primeira dose. Em relação à CVF, o aumento médio no oitavo dia foi de 0,47 litros (19%) sendo cerca de 70% dessa melhora foi observada após duas doses de tiotrópio. Os autores concluíram que ponto de equilíbrio farmacológico do

VEF1 com o tiotrópio é atingido em 48 horas. No entanto, em relação ao à CVF, ocorre uma melhora continuada até o final da primeira semana de tratamento, sugerindo que a manutenção da terapêutica é requerida para atingir mudança máxima da hiperinsuflação. A provável explicação para se atingir o “steady state” no VEF1 é que a inalação de 18 mcg de tiotrópio equilibra-se rapidamente com os fluidos pulmonares e com receptores de membrana no tecido pulmonar. Estas concentrações são altas em relação à afinidade do tiotrópio pelos receptores M3 e provavelmente leva à saturação de mais de 90% com a primeira dose¹⁹⁸. Em contraste, o “steady state” no plasma é atingido mais tardiamente, em baixos níveis (5 picogramas), havendo uma lenta acumulação linear plasmática e uma longa meia vida, o que explica o longo tempo de ação do tiotrópio. Por outro lado, não existe efeito crônico cumulativo além desse nível como foi demonstrado pela estabilização dos níveis plasmáticos por vários meses¹⁹⁹.

Littner *et al.*¹⁴⁵ em estudo de grupos paralelos, placebo controlado, com 169 pacientes com DPOC, randomizados para receber 0; 4,5; 9; 18 e 36 mcg de tiotrópio diariamente por quatro semanas, com os parâmetros espirométricos sendo obtidos antes e a cada hora até seis horas pós doses. Observaram uma significativa dose-resposta relacionada ao aumento do VEF1 após a primeira dose. Todas as doses de tiotrópio aumentaram significativamente o VEF1 e a CVF, em todos os momentos, quando comparado ao placebo. O steady state foi atingido com uma semana de tratamento. Após duas a três semanas de interrupção do tratamento o VEF1 retornou ao basal, em todas as doses utilizadas, porém sem redução abaixo

do basal, indicando não haver efeito rebote de deterioração funcional. Não houve diferença significativa no VEF1 e CVF as doses de 18 mcg e 36 mcg. Também não houve diferença quanto aos efeitos adversos, avaliados pela medida da frequência respiratória, frequência cardíaca e monitorização eletrocardiográfica, com relação às diferentes doses utilizadas, exceto boca seca no grupo que recebeu 36 mcg. A partir deste estudo a dose de 18 mcg tem sido utilizada e recomendada no rotina nas principais diretrizes atuais de tratamento e nos estudos de longo prazo^{143,162,180}.

Casaburi *et al.*¹⁴³ em estudo de três meses, randomizado, duplo cego, placebo controlado, comparou a eficácia broncodilatadora de 18 mcg de tiotrópio diário, em 279 pacientes adultos com DPOC. O “steady state” para o VEF1 foi atingido no oitavo dia de tratamento, atingindo valores acima de 12% em relação ao basal (0,20 litros de aumento em volume absoluto), e se manteve até o término do período de treze semanas de estudo, sem evidências de taquifilaxia. A CVF teve o mesmo comportamento atingindo uma melhora de 12% em relação ao basal (0,26 litros) após uma semana de tratamento. O efeito no VEF1 e na CVF, após três meses de tratamento, em relação ao observado no primeiro dia, foi de 10% e 11% maior, respectivamente.

Vincken *et al.*¹⁴⁶ em estudo randomizado, envolvendo 356 pacientes com DPOC recebendo tiotrópio e 179 recebendo ipratrópio, encontrou dados farmacodinâmicos semelhante aos observados por Casaburi *et al.*¹⁴³ para o grupo tiotrópio e demonstrou uma superioridade broncodilatadora do tiotrópio (18 mcg uma vez ao dia) em relação ao ipratrópio administrado

quatro vezes ao dia, havendo uma melhora significativamente maior durante todo o período de estudo na CVF, no VEF1 e no PFE.

Em síntese, o estudo de doses múltiplas, com as doses de tiotropio variando de 4,5 a 36 mg, demonstrou-se pouca dose dependência quando se considerou a melhora da obstrução por parâmetros espirométricos, sendo que a dose terapêutica considerada ótima foi a de 18 mg¹⁴⁵. A efetividade dessa dose nas 24 horas foi confirmada nos estudos com espirometria seriada em todo intervalo entre as doses, demonstrando broncodilatação significativa. Por essa razão, apesar de estarmos estudando o efeito da droga em uma população diferente de pacientes, selecionamos a padronização dessa dose para a nossa pesquisa.

Em nosso estudo, a melhora observada nos parâmetros espirométricos (VEF1, CVF e FEF 25-75%), em relação ao grupo placebo, apenas na vigésima quarta hora após a dose de 18 mcg de tiotrópio, foi mais tardia do que o observado pelos estudos descritos anteriormente em pacientes com DPOC, onde o pico de ação da droga ocorreu entre uma a quatro horas após a sua administração^{140,143}. Este fenômeno pode refletir uma melhora lenta das condições ventilatórias pulmonares por uma persistência prolongada ou oclusão mantida das vias aéreas previamente fechadas em pacientes com FC. No entanto, apesar da aparente discreta melhora no VEF1, na CVF e no FEF 25-75%, em relação ao placebo, apenas após 24 horas da dose, é possível que a extensão do estudo por semanas ou meses possa indicar um “steady state” diferente do que foi observado nos pacientes com DPOC e um efeito cumulativo na função

pulmonar pelo uso do tiotrópio em longo prazo. Por outro lado, pode indicar, que as alterações fisiopatológicas que ocorrem na fibrose cística, particularmente o efeito da colonização bacteriana, infecção crônica e inflamação, presentes na maioria dos nossos pacientes afete a integridade das vias aéreas e determine respostas broncodilatadoras diferentes das observadas em pacientes com DPOC. Esta hipótese é suportada pelo fato de que os nossos pacientes com FC com pior função pulmonar basal, situados no percentil 15 da casuística utilizada, tem menor tendência de resposta funcional evidenciada pelas medidas do VEF1, CVF e FEF 25-75%, quando comparado com aqueles com melhor função pulmonar basal, situados no percentil 85 da amostra estudada.

Outro achado importante do nosso estudo foi a melhora do FEF 25-75%, um parâmetro pouco valorizado nos estudos clínicos com tiotrópio em adultos com DPOC. O FEF 25-75% e o fluxo instantâneo aos 75% da CVF (Vmax 75%), segundo alguns autores, são parâmetros discriminatório de maior sensibilidade na avaliação de obstrução em pacientes asmáticos e em portadores de fibrose cística, traduzindo particularmente a obstrução de pequenas vias aéreas²⁰⁰⁻²⁰⁴.

Há evidências de que a maioria das doenças obstrutivas começa nas vias aéreas periféricas e interfere na sua capacidade funcional, antes de produzir sintomas significativos ou alterar os testes de função pulmonar^{202,205-207}. Anormalidades nas pequenas vias podem ser um fenômeno precoce na patogênese da bronquite crônica, fibrose cística e asma^{202,208,209}. Zapletal *et al.*⁷⁹ analisando por pletismografia parâmetros espirométricos e curvas fluxo-

volume em crianças com fibrose cística e asma assintomática, observaram redução do Vmax 75% e da pressão de recolhimento elástico em todos os pacientes, sendo essa mais acentuada em pacientes com fibrose cística. Houve correlação entre a queda da pressão de recolhimento elástico, Vmax 75% e VEF 1. Os autores sugerem que a perda da pressão de recolhimento elástico é um fator importante na limitação ao fluxo nestes pacientes. Landau *et al.*²¹⁰, analisando e comparando as várias técnicas na detecção de doença de pequenas vias aéreas em 52 crianças normais, 30 com fibrose cística e 35 com asma, concluíram que estas técnicas não detectam um processo patológico específico nas vias aéreas, mas refletem as consequências das anormalidades de pequenas vias, que podem variar na mesma doença e em doenças diferentes.

A reversibilidade total ou parcial da obstrução periférica pode ser um fator importante para redução da hiperinsuflação e melhora na relação ventilação perfusão, pois a resistência ao fluxo aéreo de vias aéreas terminais, em condições fisiológicas pode representar 10 a 20 % da resistência pulmonar total¹⁶⁹

Uma outra implicação muito importante do nosso estudo, é que os critérios de resposta à broncodilatador estabelecidos frente á broncodilatadores beta-agonistas de curta ação para pacientes com asma, que demonstram uma reversibilidade da obstrução, não deveriam ser válidos ou extrapolados para pacientes com DPOC ou com FC. Esses critérios podem ser um guia imperfeito para avaliar a terapêutica em pacientes com outras doenças crônicas pulmonares²¹¹. A definição clássica de resposta

broncodilatadora é um aumento significativo do VEF1 e/ou da CVF, em relação ao basal, após a administração de uma dose de salbutamol ou fenoterol¹⁶⁹. Os critérios atuais da American Thoracic Society e da European Respiratory Society²¹² recomendam a resposta a broncodilatador é considerada significativa quando em uma avaliação individual, ocorre um incremento de resposta pós broncodilatador em relação ao valor basal no VEF1 e/ou na CVF maior ou igual a 12% e um aumento absoluto igual ou superior a 200 ml. Enfatiza-se que um incremento nos fluxos ou a redução na hiperinsuflação pulmonar pós broncodilatador podem indicar uma resposta significativa e explicar uma redução no grau de dispnéia, mesmo na ausência de um aumento significativo no VEF1 e/ou na CVF²¹². Em adição, a falta de resposta broncodilatadora no laboratório não exclui a possibilidade de uma resposta clínica favorável²¹². Por outro lado, a resposta terapêutica com broncodilatador é subestimada pelo VEF1 e/ou CVF quando se compara com a medida da condutância e da resistência das vias aéreas ou medidas de fluxo durante a manobra de expiração forçada²¹².

Portanto, a decisão terapêutica baseada em um teste agudo com um beta agonista de curta ação, tal como, realizado em pacientes com asma, pode não ser apropriados para pacientes com DPOC ou com FC, sendo que testes negativos não deveriam excluir uma resposta clínica relevante. Dessa forma, os estudos com broncodilatores em pacientes com FC idealmente deveriam também considerar, tal como ocorreu em alguns estudos com DPOC, variação de volumes após vários dias ou semanas como um desfecho importante¹⁶².

5.3 Análise do Efeito Sobre os Volumes Pulmonares

Os dados recentes sugerem que: as alterações de volumes pulmonares são mais importantes para avaliar a melhora do grau de dispnéia dos pacientes. O Donnell *et al.*^{149,154}, demonstraram que mudanças na hiperinsuflação estão correlacionadas significativamente com grau de dispnéia durante testes de exercício em pacientes com DPOC.

A hiperinsuflação é um fenômeno que comumente acompanha a limitação ao fluxo aéreo em pacientes com doença pulmonar crônica e contribui de maneira importante para a dispnéia e limitação da atividade física²¹³. A hiperinsuflação tem se tornado um alvo importante de estudos em pacientes com DPOC^{166,214}. Há evidências de que o aumento dinâmico agudo da hiperinsuflação pulmonar, submetida a condições de piora da limitação ao fluxo expiratório e aumento da demanda ventilatória, ou ambos, podem prejudicar seriamente a função cardiopulmonar, particularmente nos pacientes com doença mais avançada²¹⁵. Sabe-se atualmente que apesar das alterações menores nos parâmetros espirométricos tradicionais, a terapêutica broncodilatadora pode estar associada com redução expressiva na hiperinsuflação pulmonar^{213,216,217}

A redução farmacológica dos volumes pulmonares está associada à melhora dos músculos inspiratórios e estimula o acoplamento mecânico do sistema respiratório durante a atividade física, mesmo nos indivíduos com doença avançada¹⁷⁴. A melhora nos mecanismos dinâmicos pode estar associada fisiologicamente à redução da dispnéia e à limitação na atividade física^{174,216}.

Um estudo recente¹⁶⁶ envolvendo os mecanismos de liberação da dispnéia após tratamento com tiotrópio mostrou que a liberação do tônus colinérgico estava correlacionada a melhora da condutância das vias aéreas, da capacidade pulmonar total e do volume residual. O recolhimento elástico estático dos pulmões não foi alterado após a administração aguda de tiotrópio e também o tempo expiratório durante a respiração espontânea. Está demonstrado que a terapêutica broncodilatadora com anticolinérgicos reduz o tempo inspiratório de enchimento pulmonar e o aprisionamento aéreo. Com isto ocorre uma melhora da função dos músculos inspiratórios e o acoplamento neuromecânico contribuindo para a melhora da dispnéia.

Estudos recentes mostraram uma redução significativa no volume de reserva expiratório (VRE) e melhora da capacidade inspiratória após tratamento com tiotrópio, com modesta melhora no VEF1^{153,154,166,218}. A melhora da CI, que indiretamente significa redução do VRE, indica redução da hiperinsuflação pulmonar e tem um significado clínico importante correspondendo a uma melhora da dispnéia e da tolerância aos exercícios^{215,218,219}. Em pacientes com DPOC a CI representa um fator limitante para a expansão do volume corrente (VC) durante o exercício. O recrutamento da CI após terapêutica broncodilatadora, pode aumentar o VC durante o exercício e conseqüentemente reduzir a frequência respiratória²²⁰⁻²²³. O'Donnell *et al.*²²⁴ em estudo recente demonstraram que o uso de tiotrópio comparado com placebo esteve associado com redução da resistência das vias aéreas e do enchimento elástico dos músculos inspiratórios, o que resulta na redução do trabalho respiratório e no consumo de oxigênio durante o exercício.

Em nosso estudo, observamos uma redução significativa do VR, da CPT e da relação VR/CPT a partir de 180 minutos da administração do tiotrópio com relação ao basal e ao grupo placebo, o que fisiologicamente significa redução do aprisionamento aéreo e da hiperinsuflação pulmonar. Em adição, houve uma melhora substancial da condutância das vias aéreas já nos primeiros 30 minutos com redução concomitante da resistência, indicando uma facilitação no tempo inspiratório de enchimento pulmonar. Durante o exercício físico esses fatores podem ser importantes para poupar o trabalho dos músculos inspiratórios e o consumo de oxigênio²¹⁷.

Em nosso estudo, não se demonstrou aumento significativo da CI em relação ao basal e em relação ao placebo nos diferentes momentos da avaliação. No entanto, essas medidas foram realizadas em repouso. Está demonstrado que em pacientes com DPOC e asma, ocorre uma redução acentuada da CI durante o exercício, este fenômeno é denominado hiperinsuflação dinâmica o que resulta em uma menor tolerância ao exercício e maior esforço cardiopulmonar^{143,225,226}.

O'Donnel *et al.*¹⁵⁴ avaliaram 190 pacientes com DPOC moderados ou graves, randomizados para receber tiotrópio (18 mcg) ou placebo uma vez ao dia por seis semanas. Os pacientes tinham em média um VR de repouso duas vezes maior que os valores previstos, indicando uma hiperinsuflação importante. A tolerância ao exercício foi determinada por teste incremental padronizado e a CI foi medida durante testes com exercício, em intervalos regulares, durante o período de tratamento. Apenas os pacientes que receberam tiotrópio tiveram aumento significativo da CI de cerca de 200 ml em

relação ao teste de exercício basal, o que foi mantido durante todo o período de estudo representando uma redução acentuada da hiperinsuflação dinâmica.

Os estudos em pacientes com DPOC demonstraram que pequenos aumentos da CI durante o exercício, após a administração de tiotrópio, estão associados com reduzido tempo de enchimento pulmonar, aumento funcional da força dos músculos inspiratórios, resultando em redução do trabalho respiratório e do consumo de oxigênio²¹⁷. Um aumento de 10% na CI em relação ao previsto pode significar uma maior habilidade para expandir o VC durante o exercício com conseqüente aumento da capacidade ventilatória^{149,218,227}. A redução dos volumes pulmonares durante o exercício, estimula o acoplamento neuromecânico do sistema respiratório, ou seja, a relação entre o estímulo neural e a resposta mecânica, aliviando o desconforto respiratório. O efeito global de todos esses benefícios fisiológicos é melhorar a capacidade do paciente de executar exercícios físicos²¹⁴.

Portanto seria importante um estudo futuro para avaliação dos pacientes com fibrose cística recebendo tiotrópio, durante o exercício físico, por semanas ou meses com o intuito de verificar se tal qual ocorre em pacientes com DPOC, haveria uma melhora na tolerância ao exercício físico, por aumento da CI, com conseqüente redução na resistência ao fluxo aéreo, redução na hiperinsuflação dinâmica durante exercício, resultando em menor grau de dispnéia e melhora da atividade física.

Apesar do VEF1 ser o parâmetro habitual para a medida do efeito broncodilatador de uma droga, estudos em pacientes com DPOC e em crianças asmáticas, demonstraram que a medida da condutância

específica das vias aéreas são mais sensíveis que a medida do VEF1^{228,229}. As diferenças entre grupos em estudos clínicos, podem não ser demonstradas pela medida isolada do VEF1 por espirometria, particularmente na avaliação de broncodilatadores de longa ação^{228,229}.

O objetivo de se utilizar a avaliação de parâmetros pletismográficos em nosso estudo aliado a espirometria, além da análise dos parâmetros que avaliam o aprisionamento aéreo, foi utilizar parâmetros mais sensíveis para detectar a resposta a broncodilatador. A condutância das vias aéreas parece ser o parâmetro mais sensível para detectar a resposta significativa a broncodilatador em crianças com asma, tal como observamos em estudo anterior²³⁰.

Em nosso estudo, com crianças com FC, observamos que quando comparado aos valores basais em percentuais dos valores previstos, a condutância teve um incremento significativo, em todos os momentos de observação até 24 horas, desde os 30 minutos após administração do tiotropio. Adicionalmente ocorreu o mesmo fenômeno nos momentos 180 minutos e 24 horas de observação com relação ao grupo placebo. Paralelamente ao aumento da condutância observamos uma queda da resistência das vias aéreas, o que representa o mesmo fenômeno fisiológico, ou seja, melhora significativa da permeabilidade das vias aéreas.

A determinação da condutância foi o parâmetro mais sensível para detectar variações significantes entre os valores basais e do grupo placebo nos diferentes momentos de observação pós tiotrópio. A avaliação desse parâmetro nos pareceu imprescindível em estudos futuros para avaliação do efeito do tiotrópio em pacientes com fibrose cística.

5.4 Considerações Sobre os Efeitos Adversos

Vários estudos têm demonstrado que o tratamento com broncodilatadores anticolinérgicos de curta ação (brometo de ipratrópio) é seguro e efetivo em pacientes com DPOC, sem o desenvolvimento de taquifilaxia^{140,194,231}. O perfil de segurança dos antimuscarínicos quaternários é superior aos beta agonistas particularmente quanto aos efeitos cardiovasculares^{232,233}. Anormalidades na relação ventilação-perfusão são freqüentes em pacientes com pneumopatia crônica sendo que os beta-agonistas podem aumentar a hipoxemia por aumento do efeito “shunt”, no entanto este efeito não é observado com os anticolinérgicos. Por outro lado há evidências de que o tratamento com beta agonistas por tempo prolongado em pacientes asmáticos induz taquifilaxia e aumenta a hiperresponsividade brônquica¹⁴⁰. Também tem sido relatado piora da doença e alguns estudos sugerem que diminua a duração da broncodilatação²³⁴⁻²³⁶.

5.5 Considerações Finais

Sumariamente, este estudo mostrou que uma única dose de 18 mcg de tiotrópio administrada com dispositivo Handihaler[®] na forma de pó seco, em uma população de crianças e adolescentes com FC, melhorou os parâmetros espirométricos (VEF1, CVF e FEF 25-75%), em relação ao grupo placebo, 24 horas após a sua administração. Houve também uma melhora significativa e mais precoce, aos 180 minutos, do aprisionamento aéreo evidenciado pelas quedas do VR, CPT e relação do VR/CPT e ocorreu principalmente uma melhora acentuada e gradual na condutância desde os

30 minutos da sua administração e queda concomitante na resistência das vias aéreas. Por outro lado, este estudo também demonstrou que o tiotrópio administrado em uma única dose é bem tolerado, com boa segurança, quando utilizado em crianças acima de seis anos de idade, evidenciado pela monitorização dos parâmetros vitais, pressão arterial e saturação arterial de O₂ por oximetria de pulso.

Os resultados obtidos suportam a nossa hipótese inicial de que pacientes com FC podem apresentar um componente colinérgico importante relacionado à obstrução brônquica e conseqüentemente ao aprisionamento aéreo. Apesar das diferenças fisiopatológicas determinantes da obstrução brônquica, os pacientes com FC, tal como os pacientes com DPOC, respondem agudamente a uma dose farmacologicamente adequada de tiotrópio com melhora dos parâmetros funcionais. Além disso, os nossos resultados com crianças e adolescentes com FC estão de acordo com estudos prévios com pacientes adultos com DPOC que demonstraram que uma dose diária de tiotrópio resulta em mudanças significantes nos parâmetros espirométricos e volumétricos até 24 horas após o seu uso^{140,143,145}.

Observamos neste estudo que uma dose de 18 mcg de tiotrópio, utilizada em uma população de pacientes com FC, com monitorização da função pulmonar por espirometria e pletismografia por 24 horas, melhorou significativamente o VEF1, a CVF, o FEF 25-75% quando comparada com o grupo placebo. Um achado importante foi uma redução significativa da hiperinsuflação e um incremento substancial e precoce na condutância das vias aéreas quando comparado aos valores basais e ao grupo placebo.

Estas mudanças fisiológicas podem representar uma nova perspectiva para o tratamento da doença obstrutiva da FC com a finalidade de melhorar a função pulmonar, o grau de dispnéia, a tolerância ao exercício físico e a qualidade de vida dos pacientes. Os achados deste estudo indicam que são necessários estudos futuros, com casuísticas maiores, preferentemente multicêntricos, com a consideração de estender o período de observação para semanas ou meses, utilizando uma dose diária de tiotrópio com a finalidade de analisar:

- O “steady state” farmacodinâmico do VEF1, CVF e FEF 25-75%, bem como dos volumes estáticos, incluindo CV lenta, VR, CI, VRE e CPT.
- A influência da gravidade da doença na melhora dos parâmetros espirométricos e pletismográficos.
- O efeito clínico na melhora dos sintomas e no grau de dispnéia.
- O efeito na tolerância aos exercícios físicos e na hiperinsuflação dinâmica durante o exercício.
- O possível efeito na prevenção, atenuação e redução do número de exacerbações pulmonares.
- O efeito na qualidade de sono e na qualidade de vida dos pacientes.
- Os possíveis efeitos adversos com o seu uso por tempo prolongado.
- O efeito da terapêutica combinada do tiotrópio com beta agonistas de longa ação (salmeterol ou formoterol).

6 CONCLUSÕES

As crianças e adolescentes com fibrose cística têm resposta aguda funcional significativa a um anticolinérgico de longa ação, o brometo de tiotrópio. Uma única dose de tiotrópio de 18 mcg, administrado na forma de pó seco, melhora de maneira significativa no intervalo de 24 horas:

- A permeabilidade das vias aéreas centrais e periféricas traduzido pela melhora do VEF1, do FEF 25-75% e da condutância das vias aéreas com queda concomitante da resistência.
- O aprisionamento aéreo e a hiperinsuflação pulmonar caracterizada pela redução da CVF, do VR, da CPT e da relação VR/CPT.

A administração de uma dose de tiotrópio em crianças e adolescentes com FC foi isenta de efeitos adversos significativos.

7 ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA****Título da pesquisa****“Resposta funcional aguda ao brometo de tiotrópio em crianças e adolescentes com Fibrose cística”**

Esta pesquisa será realizada com os pacientes portadores de fibrose cística, com 6 ou mais anos de idade, que estão sendo acompanhados no ambulatório de Pneumologia do Instituto da Criança do HCFMUSP. A fibrose cística é uma doença pulmonar crônica que afeta os brônquios causando inflamação e estreitamento das vias aéreas o que provoca a falta de ar. Os medicamentos broncodilatadores utilizados até o momento têm sido pouco eficazes para controlar esta doença e diminuir a falta de ar.

O objetivo desta pesquisa é verificar se um novo medicamento broncodilatador que já foi utilizado com sucesso e segurança em adultos com doença pulmonar obstrutiva crônica das vias aéreas (DPOC), denominado brometo de tiotrópio, é também capaz de melhorar a função pulmonar de crianças com fibrose cística. Nos pacientes com DPOC, os estudos mostraram que esse medicamento, quando utilizado uma vez ao dia, melhorou a função pulmonar, reduziu a falta de ar, melhorou a qualidade de vida e não teve efeitos colaterais significativos mesmo quando utilizado por tempo prolongado. Um medicamento semelhante a esse denominado brometo de ipratrópio já é utilizado rotineiramente no tratamento de crianças asmáticas e também não mostra efeitos colaterais de importância. Portanto, apesar do brometo de tiotrópio estar sendo utilizado pela primeira vez em crianças e adolescentes com fibrose cística, a experiência mostrou que, no tratamento de adultos com DPOC, esse medicamento é bastante seguro e eficaz.

O seu filho (a) será submetido a um único tipo de procedimento que é o exame de prova de função pulmonar completa (espirometria e pletismografia), que já faz parte da avaliação rotineira da função respiratória de pacientes com fibrose cística após os 6 anos de idade. Não será necessária coleta de sangue ou outro tipo de material para a pesquisa.

Durante o estudo serão realizadas 4 visitas ao laboratório de Prova de Função Pulmonar do Instituto da Criança.

Na visita 1 o teste será realizado em 5 etapas: sem o uso prévio da medicação, após 30 minutos, 60, 120 e 180 minutos do uso da medicação.

Esse medicamento, na forma de um pó para inalação, estará dentro de uma cápsula e será aspirada através de um pequeno dispositivo para inalação. A cápsula irá conter o remédio em estudo (brometo de tiotrópio) ou não (placebo); nem o médico nem o paciente saberá qual cápsula estará sendo usada até o final do estudo, para que no final da pesquisa possamos descobrir se o remédio realmente funciona “abrindo” os brônquios da criança e melhorando a “falta de ar”.

A visita 2 será feita 24 horas após a primeira (no dia seguinte) e a criança irá realizar a prova de função pulmonar apenas uma vez, sem a utilização de qualquer medicamento.

Na semana seguinte (visita 3), o paciente deverá voltar ao laboratório para realizar os mesmos procedimentos descritos na visita 1, dessa vez com a cápsula contendo o oposto da usada na visita 1 (brometo de tiotrópio ou placebo). No dia seguinte (visita 4) será feito apenas mais um último exame de função pulmonar sem o uso de qualquer medicação.

Tanto o exame quanto os medicamentos utilizados não oferecem qualquer risco para as crianças com fibrose cística. É possível que alguns pacientes, após inalar o medicamento tenham a sensação de secura na boca.

Esta pesquisa poderá fornecer informações importantes caso se demonstre que esse medicamento, tal como aconteceu em pacientes adultos com DPOC, melhora a função pulmonar e reduz a falta de ar dos pacientes com fibrose cística. Esse medicamento poderá, no futuro, integrar a tratamento de crianças e adolescentes com fibrose cística.

Todos os resultados serão informados aos pais ou responsáveis no momento da realização dos exames e nas visitas ambulatoriais. Todas as informações obtidas nesse estudo serão consideradas confidenciais e usadas somente para o propósito desta pesquisa.

A participação do seu filho(a) nessa pesquisa é voluntária. E você está livre para não participar ou, a qualquer momento, sair do estudo, sem que isso afete de qualquer modo o seguimento do seu filho(a) na Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP.

O medicamento que será utilizado neste estudo (brometo de tiotrópio) já foi testado previamente em crianças da mesma faixa de idade, em outra doença pulmonar crônica que ocorre em crianças, no laboratório de provas funcionais do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP e não foram observados efeitos adversos. Mesmo assim, todos os pacientes serão monitorados quanto á frequência cardíaca, frequência respiratória, saturação arterial de oxigênio medido por oximetria de pulso e pressão arterial.

Haverá um Médico Pediatra -Pneumologista da Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança acompanhando todos os testes. Caso ocorra qualquer efeito adverso, os testes serão interrompidos e, se houver necessidade, em caso extremo, de observação ou internação do paciente como consequência do uso do medicamento, isto será efetuado nas dependências do Instituto da Criança do HCFMUSP sob responsabilidade e cuidados do pesquisador principal desse estudo Dr Joaquim Carlos Rodrigues.

Não há nenhuma previsão para indenização em caso de efeitos colaterais indesejados resultantes do uso desse medicamento.

Consentimento:

Eu concordo em participar desse estudo. Eu li e recebi uma cópia desse informe.

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do médico da pesquisa: _____

Data: ____/____/____

Anexo B - Tábua de números aleatórios

Por meio da tábua de números aleatórios (White J, Yeats A, Skipworth G. In: Table for statisticians. Random numbers. Cheltenham, England: Stanley Thornes Ltd. 3rd ed, 1979. p 41-2), foram selecionados 25 números (amostra pré-calculada de 20 indivíduos com margem de segurança de 20%) através de leitura horizontal para a direita, sendo o ponto inicial livremente escolhido, ou seja, 5º número da 7º linha. Fixou-se como grupo A a exposição a droga ativa e B ao placebo, sendo que os números pares foram atribuídos ao placebo e os ímpares à droga ativa.

Ordem	Droga	Data - 1	Nome do Paciente	Data - 2
1	B			
2	B			
3	B			
4	A			
5	B			
6	B			
7	B			
8	A			
9	B			
10	A			
11	B			
12	B			
13	B			
14	A			
15	A			
16	B			
17	B			
18	A			
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				

Anexo C - Escore de Shwachman

Escore de Shwachman					
Graduação	Ponto	Atividade	E. Físico	Nutrição	Raio X
Excelente 86 - 100	25	Atividade íntegra, joga, brinca, vai a escola regularmente	Normal. Não tosse, FC e FR normais. Pulmões livres. Boa postura	Peso e altura acima do percentil 25. Fezes bem formadas. Boa musculatura e tónus	Campos pulmonares limpos
Bom 71 - 85	20	Irritabilidade e cansaço no fim do dia. Boa frequência escolar.	FC, FR normais em repouso. Tosse rara. Pulmões livres. Pouco enfisema	Peso e altura entre percentis 15-20. Fezes discretamente alteradas	Pequena acentuação da trama vasobrônquica. Enfisema discreto
Médio 56 - 70	15	Necessita repousar durante o dia. Cansaço fácil após exercícios. Diminui frequência a escola.	Tosse ocasional, às vezes de manhã. FR levemente aumentada. Médio enfisema. Discreto baquetamento de dedos.	Peso e altura acima do terceiro percentil. Fezes anormais pouco formadas. Distensão abdominal. Hipotrofia muscular.	Enfisema de média intensidade. Aumento da trama vasobrônquica
Moderado 41 - 55	10	Dispnéia após pequenas caminhadas. Repouso em grande parte do dia.	Tosse freqüente produtiva, retração torácica. Enfisema moderado, pode ter deformidade de tórax. Baquetamento 2 a 3.	Peso e altura abaixo do terceiro percentil. Fezes anormais. Volumosa redução da massa muscular.	Moderado enfisema. Áreas de atelectasia. Áreas de infecção discreta. Bronquiectasias
Grave 40 ou menos	5 5	Ortopnéia. Confinado ao leito	Tosse intensa. Períodos de taquipnéia e alterações pulmonares. Pode mostrar sinais de falência cardíaca direita. Baquetamento 3 a 4.	Desnutrição intensa. Distensão abdominal, prolapso retal	Extensas alterações. Fenômenos obstructivos. Infecção, atelectasias, bronquiectasias

Anexo D - Aprovação do Protocolo de Pesquisa



APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 22.11.07, **APROVOU**, *ad-referendum*, o Protocolo de Pesquisa nº **0814/07** intitulado "**RESPOSTA FUNCIONAL AGUDA AO BROMETO DE TIOTRÓPIO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM FIBROSE CÍSTICA**", apresentado pelo Departamento de **PEDIATRIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **DR. JOAQUIM CARLOS RODRIGUES**

CAPPesq, 22 de novembro de 2007

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo E - Resultados dos testes de função pulmonar no grupo tiotrópio

	Grupo Tiotrópio	Registro	Idade (anos)	Sexo	Peso (kg)	Escore
1	AS	6056748I	13	M	39,3	75
2	BP	6046396G	14	F	46,5	75
3	BMC	6054602H	12	M	54	90
4	ENN	6031670E	17	F	63	90
5	GPL	6071972K	9	M	40,2	90
6	GPL	3170530H	10	M	29,3	60
7	IMF	6090357G	8	F	24	80
8	JCS	6103700A	17	F	46	75
9	JNV	6068776H	12	M	40,5	75
10	JP	6083097I	8	F	36	80
11	KSS	6046480A	15	F	47	70
12	LRS	6081770D	13	F	50,5	70
13	LFSR	6117005I	12	M	51,2	90
14	MMF	6041688J	15	F	33,5	45
15	MAM	6077930F	9	M	26,6	75
16	PBS	6051478D	15	F	54,4	70
17	PEAMP	6073011A	9	M	28	80
18	RRC	6098866K	8	F	30	90
19	VHCS	6057239D	12	M	23,8	60
20	BTCL	6061545F	15	M	45,5	75

Continua

Continua

	CVF b (l)	CVF b(%)	CVF 30(L)	CVF 30(%)	CVF 60(L)	CVF 60(%)	CVF 120(L)	CVF 120(%)	CVF 180 (L)	CVF 180 (%)	CVF 24h(L)	CVF 24h(%)
1	2,47	78	2,48	78	2,4	75	2,56	80	2,63	82	2,6	82
2	2,27	66	2,17	64	2,29	67	2,33	68	2,38	70	2,52	74
3	3,42	97	3,5	99	3,38	95	3,37	95	3,39	95	3,45	97
4	3,57	101	3,65	103	3,64	103	3,58	101	3,55	101	3,45	98
5	2,43	103	2,36	100	2,4	102	2,42	103	2,5	106	2,63	111
6	1,37	65	1,43	68	1,32	62	1,37	65	1,58	75	1,34	63
7	1,47	92	1,56	97	1,37	85	1,64	102	1,53	96	1,53	95
8	2,52	76	2,56	78	2,52	76	2,49	75	2,35	71	2,49	75
9	2,72	89	2,77	90	2,54	83	2,67	87	2,62	85	2,59	84
10	2,03	94	2,16	100	2,1	97	2,04	94	2,07	95	2,09	96
11	2,2	74	2,35	79	2,31	78	2,4	81	2,41	82	2,48	84
12	2,05	64	2,1	66	2,11	66	2,15	68	2,03	64	2,03	64
13	2,03	72	2,12	75	2,11	74	2,01	71	1,96	69	1,99	70
14	2,15	82	2,28	87	2,3	88	2,31	88	2,33	89	2,18	83
15	1,78	84	1,76	83	1,85	87	1,74	82	1,79	85	1,67	79
16	2,79	98	2,74	96	2,66	93	2,57	90	2,71	95	2,69	94
17	1,68	84	1,62	81	1,49	75	1,47	74	1,38	69	1,44	72
18	2,13	98	2,13	98	2,08	96	2,08	96	2,09	96	2,25	104
19	1,52	68	1,65	74	1,75	78	1,66	74	1,66	74	1,8	80
20	4,29	130	4,45	135	4,41	133	4,53	137	4,45	135	4,81	145

Continuação

Continua

	VEF1 b (L)	VEF1 b %	VEF1 30 (L)	VEF1 30 (%)	VEF1 60(L)	VEF1 60 %	VEF1 120(L)	VEF1 120 (%)	VEF1 180(L)	VEF1 180 (%)	VEF1 24h(L)	VEF1 24h (%)
1	1,78	61	1,81	62	1,72	59	1,84	63	1,92	66	1,97	67
2	1,66	51	1,54	47	1,69	52	1,77	54	1,81	56	1,94	59
3	2,42	74	2,49	76	2,38	73	2,42	74	2,46	76	2,48	76
4	3,04	90	3,07	91	3,14	93	3,14	93	3,1	92	3,13	93
5	1,99	93	1,97	92	2,02	95	2,05	96	2,14	100	2,18	102
6	1,14	59	1,06	56	1,1	57	1,01	58	1,27	67	1,03	54
7	1,4	95	1,46	100	1,32	90	1,55	106	1,49	102	1,44	98
8	2,32	74	2,36	75	2,21	70	2,29	73	2,17	69	2,27	72
9	2,21	79	2,26	80	2,04	73	2,19	78	2,15	77	2,15	77
10	1,66	82	1,76	87	1,67	83	1,7	84	1,67	83	1,69	84
11	1,5	54	1,58	56	1,55	55	1,56	56	1,58	56	1,66	59
12	43	42	1,28	42	1,3	43	1,3	43	1,24	41	1,45	48
13	1,54	59	1,61	62	1,61	62	1,61	62	1,55	60	1,48	57
14	1,23	50	1,26	51	1,28	52	1,27	51	1,3	53	1,22	49
15	1,36	71	1,39	72	1,5	78	1,3	68	1,37	72	1,23	64
16	1,88	70	1,94	72	1,81	67	1,8	67	1,89	70	1,93	71
17	1,33	74	1,37	76	1,33	74	1,25	70	1,21	67	1,22	68
18	1,79	88	1,68	83	1,56	77	1,58	78	1,51	74	1,82	90
19	1,08	53	1,12	55	1,16	57	1,13	56	1,27	63	1,29	64
20	3,2	105	3,34	110	3,26	108	3,37	111	3,38	111	3,67	121

Continuação

Continua

	VEF1(CFY)(%)	FEF25-75% b(L)	FEF25-75%(%)	FEF25-75% 30 (L)	FEF25-75% 30 (%)	FEF25-75% 60(L)	FEF25-75% 60 (%)	FEF25-75% 120 (L)	FEF25-75% 120 (%)	FEF25-75% 180 (L)	FEF25-75% 180 (%)	FEF25-75% 24h (L)	FEF25-75% 24h (%)
1	72	1,23	37	1,36	41	1,16	35	1,27	39	1,38	42	1,62	49
2	73	1,21	33	1,05	29	1,29	35	1,48	41	1,5	41	1,68	46
3	71	1,72	47	1,81	50	1,63	45	1,71	47	1,86	51	1,85	51
4	85	3,42	91	3,13	83	3,72	99	4,37	116	4,39	117	4,19	112
5	82	2,15	85	2,17	86	2,35	93	2,56	101	2,52	99	2,41	95
6	51	1,19	51	0,86	37	1,22	53	1,29	56	1,28	56	1,27	55
7	95	2,52	135	2,56	137	2,46	132	2,89	160	3,13	168	2,66	143
8	92	3,04	86	3,04	86	3,01	85	2,84	83	3,06	87	3,26	93
9	81	2,14	67	2,18	68	1,91	60	2,16	66	2,32	72	2,45	77
10	82	1,84	76	1,9	78	1,82	67	1,81	79	1,85	76	1,87	77
11	68	0,9	28	0,87	27	0,82	26	0,8	25	0,83	26	0,88	27
12	61	0,71	21	0,67	19	0,68	20	0,63	18	0,59	17	0,78	22
13	76	1,19	40	1,31	44	1,34	45	1,6	54	1,44	48	1,12	38
14	57	0,49	17	0,47	16	0,5	18	0,49	17	0,53	18	0,47	16
15	76	1,64	71	1,85	80	1,84	80	1,1	48	1,18	51	0,89	36
16	67	1,16	38	1,28	41	1,03	33	1,15	37	1,22	39	1,33	43
17	79	1,2	54	1,25	57	1,37	70	1,37	62	1,47	67	1,39	63
18	84	2,11	87	1,81	75	1,25	52	1,47	61	1,05	43	2,79	115
19	71	0,59	25	0,65	27	0,63	26	0,65	27	1,17	48	0,88	36
20	74	2,87	78	2,85	83	2,84	77	2,89	79	2,84	83	3,3	97

Continuação

Continua

	CPT b (L)	CPT b (%)	CPT 30 (L)	CPT 30 (%)	CPT 60 (L)	CPT 60 (%)	CPT 120 (L)	CPT 120 (%)	CPT 180 (L)	CPT 180 (%)	CPT 24h (L)	CPT 24h (%)
1	4,26	104	4,58	112	4,1	100	3,95	97	3,83	94	3,88	95
2	4,04	91	4,13	93	4,14	93	3,9	88	3,95	89	4	90
3	4,83	107	4,76	105	4,63	102	4,95	109	4,43	98	4,48	99
4	4,74	103	4,81	104	4,6	100	4,56	99	4,37	95	3,92	85
5	3,36	111	3,21	106	3,22	106	3,48	115	3,55	117	3,27	107
6	3,15	115	2,67	97	2,63	96	2,92	107	2,78	101	2,65	97
7	2,09	101	2,09	101	1,93	93	1,99	96	1,92	93	2,14	104
8	3,8	88	3,66	85	3,8	88	3,71	86	3,58	83	3,6	84
9	3,43	87	3,45	88	3,52	89	3,46	88	3,65	93	3,79	96
10	3,02	107	2,98	106	3,5	124	3,38	120	3,29	117	3,01	107
11	3,83	99	4,17	108	3,85	100	3,5	91	3,61	94	3,85	100
12	4,61	111	4,66	112	4,67	112	4,73	114	4,45	107	4,61	111
13	3,15	87	2,94	81	2,97	82	3,19	88	3,06	84	2,9	80
14	3,23	95	3,71	109	3,64	107	3,75	110	3,63	107	3,75	110
15	2,33	85	2,37	87	2,62	96	2,31	84	2,27	83	2,44	89
16	4,2	113	4	108	4,13	111	4,17	112	4,04	109	3,9	105
17	2,6	100	2,29	88	1,87	72	2,58	100	2,37	91	2,09	81
18	2,58	92	2,67	95	2,63	94	2,8	100	2,87	102	2,6	92
19	3,45	119	3,02	105	3,3	114	3,08	107	3,02	105	2,98	103
20	5,3	125	5,36	126	5,32	126	5,47	129	5,25	124	5,03	119

Continuação

Continua

	VR b (L)	VR b (%)	VR 30(L)	VR 30(%)	VR 60(L)	VR 60 (%)	VR 120(L)	VR 120(%)	VR 180(L)	VR 180(%)	VR 24h(L)	VR 24h(%)
1	1,79	211	2,01	236	1,7	200	1,39	163	1,2	141	1,27	150
2	1,78	190	1,95	208	1,86	198	1,58	168	1,56	167	1,48	158
3	1,41	151	1,27	135	1,25	134	1,58	169	1,04	111	1,03	110
4	1,09	113	1,17	121	0,96	100	0,98	102	0,82	85	0,47	48
5	0,93	143	0,85	132	0,82	127	0,81	124	0,69	107	0,64	99
6	1,49	253	1,24	210	1,31	223	1,18	200	1,2	203	1,31	223
7	0,56	118	0,49	103	0,4	85	0,35	75	0,32	68	0,47	100
8	1,28	141	1,1	122	1,23	135	1,2	132	1,1	121	1,11	122
9	0,71	87	0,68	83	0,89	108	0,79	96	1,02	124	1,19	145
10	0,98	159	0,82	133	0,57	92	0,89	143	0,51	83	0,92	150
11	1,63	198	1,82	222	1,53	187	1,11	135	1,2	146	1,37	166
12	2,56	291	2,56	291	2,29	261	2,58	293	2,42	276	2,3	262
13	0,9	118	0,82	108	0,86	113	1,12	147	0,57	75	0,91	119
14	1,08	147	1,43	195	1,34	182	1,43	195	1,3	177	1,57	214
15	0,55	94	0,61	104	0,77	131	0,57	97	0,48	82	0,78	132
16	1,35	170	1,19	150	1,47	186	1,52	192	1,33	168	1,03	131
17	0,91	163	0,67	120	0,38	68	1,11	198	0,99	177	0,64	115
18	0,45	72	0,54	87	0,55	89	0,71	115	0,69	112	0,33	53
19	1,92	310	1,37	221	1,54	250	1,42	229	1,36	220	1,18	191
20	1,01	115	0,9	103	0,82	93	0,94	108	0,8	90	0,53	60

Continuação

Continua

	VR/CPT b(%)	VR/CPT 30(%)	VR/CPT 60(%)	VR/CPT 120(%)	VR/CPT 180(%)	VR/CPT 24h (%)
1	42	44	41	35	31	33
2	44	47	45	40	40	37
3	29	27	27	32	23	23
4	23	24	21	22	19	12
5	28	27	25	23	19	20
6	47	46	50	40	43	50
7	27	23	21	18	17	22
8	34	30	32	32	31	31
9	21	20	25	23	28	32
10	33	28	16	26	16	31
11	43	44	40	32	33	36
12	56	55	49	54	54	50
13	29	28	29	35	19	31
14	33	39	37	38	36	42
15	24	26	29	25	21	32
16	32	30	36	36	33	27
17	35	29	20	43	42	31
18	17	20	21	25	24	13
19	56	45	47	46	45	40
20	19	17	15	17	15	11

Continuação

Continua

	Res b (L)	Res b (%)	Res 30(L)	Res 30(%)	Res 60(L)	Res 60(%)	Res 120(L)	Res 120(%)	Res 180(L)	Res 180(%)	Res 24h(L)	Res 24h(%)
1	7,23	244	4,24	143	2,75	93	3,64	123	2,85	96	3,03	102
2	4,6	168	4,3	157	4,26	156	3,74	137	3,42	125	3,32	121
3	4,02	148	3,97	146	3,7	136	3,54	130	3,89	143	4,19	154
4	5	187	5,12	192	3,61	135	2,79	104	2,82	106	2,62	98
5	3,78	101	3,92	104	3,24	86	3,29	88	3,58	96	3,39	90
6	7,07	174	6,06	149	7,2	178	5,82	144	5,53	136	4,91	121
7	6	127	5,84	123	5,92	125	5,69	120	5,92	125	4,12	87
8	3,56	127	3,1	110	3,07	109	3,75	133	3,1	110	2,96	105
9	3,67	120	3,95	129	3,63	119	3,02	99	2,71	89	2,91	95
10	5,8	150	5,34	138	6,78	176	6,59	171	6,61	171	5,79	150
11	5,56	182	5,23	171	5,4	176	8,14	266	6,07	198	5,39	176
12	9,18	318	8,37	290	8,7	301	9,89	342	7,91	274	7,82	271
13	5,5	169	6,24	191	6,02	185	6,53	200	6,78	208	7,51	230
14	6,03	180	5,73	171	4,47	133	4,53	135	4,49	134	4,67	139
15	4,41	109	4,77	117	4,12	102	4,78	118	5,5	136	3,52	87
16	3,91	124	4,09	130	3,08	98	3,16	100	2,57	81	2,53	80
17	5,5	130	6,42	152	7,44	176	4,52	107	4,38	103	5,49	130
18	4,15	108	4,2	109	3,63	94	3,09	80	2,86	74	3,36	87
19	4,63	119	5,03	129	5,2	133	4,23	109	5,05	130	4,07	105
20	2,22	77	2,06	72	1,59	55	2,06	71	2,11	73	1,81	63

Continuação

Continua

	Cond b(L)	Cond b(%)	Cond 30(L)	Cond 30(%)	Cond 60(L)	Cond 60(%)	Cond 120(L)	Cond 120(%)	Cond 180(L)	Cond 180(%)	Cond 24h(L)	Cond 24h(%)
1	0,05	24	0,088	41	0,122	57	0,099	46	0,127	59	0,117	54
2	0,064	24	0,069	26	0,068	26	0,081	31	0,092	35	0,09	34
3	0,075	35	0,076	35	0,081	37	0,088	41	0,089	41	0,075	35
4	0,095	36	0,112	42	0,159	61	0,17	64	0,161	61	0,165	63
5	0,095	56	0,119	71	0,138	82	0,118	70	0,124	74	0,132	78
6	0,061	38	0,082	51	0,075	47	0,093	57	0,102	63	0,105	65
7	0,136	59	0,136	59	0,135	59	0,136	59	0,155	67	0,182	79
8	0,136	52	0,156	59	0,149	57	0,111	42	0,13	49	0,128	48
9	0,126	60	0,113	54	0,124	59	0,143	68	0,161	77	0,155	74
10	0,082	33	0,097	39	0,074	30	0,072	29	0,071	29	0,081	33
11	0,055	21	0,061	23	0,062	24	0,06	23	0,06	23	0,068	26
12	0,03	12	0,025	13	0,034	13	0,029	11	0,037	14	0,038	15
13	0,083	43	0,083	44	0,085	45	0,078	41	0,075	40	0,068	36
14	0,055	21	0,064	25	0,079	31	0,082	32	0,082	32	0,078	30
15	0,146	88	0,123	74	0,139	83	0,125	75	0,108	64	0,171	102
16	0,09	35	0,099	39	0,13	51	0,122	48	0,152	59	0,165	64
17	0,091	60	0,125	83	0,108	71	0,0115	76	0,16	106	0,092	61
18	0,12	48	0,128	51	0,141	57	0,179	72	0,195	78	0,149	60
19	0,083	46	0,08	44	0,082	45	0,109	60	0,09	50	0,115	64
20	0,117	55	0,14	65	0,168	78	0,13	61	0,144	67	0,155	72

Continuação

Conclusão

	C ins b(L)	C ins b(%)	C ins 30(L)	C ins 30(%)	C ins 60(L)	C ins 60(%)	C ins 120(L)	C ins 120(%)	C ins 180(L)	C ins 180(%)	C ins 24h(L)	C ins 24h(%)
1	1,93	67	2,3	80	1,75	61	1,76	61	1,72	60	1,89	66
2	1,52	57	1,46	54	1,42	53	1,55	58	1,38	51	1,68	63
3	2,83	89	2,96	93	2,88	91	2,85	90	2,41	76	2,47	78
4	2,53	92	2,84	104	2,37	87	2,46	90	2,39	87	2,34	86
5	1,98	90	2,13	97	2,03	93	2,23	102	2,64	121	2,21	101
6	1,55	75	1,1	53	1,06	52	1,13	55	1,34	65	1,17	57
7	1,1	73	1,04	69	0,97	64	1	67	1,07	71	1,05	70
8	1,72	67	1,69	66	1,9	74	1,81	70	1,76	68	0,128	48
9	1,63	59	1,7	61	1,69	61	1,5	54	1,72	62	2,17	78
10	1,48	78	1,62	86	2,25	119	2,45	130	1,96	104	1,77	94
11	1,43	61	1,96	84	1,53	65	1,98	85	1,81	77	1,9	81
12	1,85	72	1,97	77	2	78	2,01	78	1,78	69	2,18	85
13	2	76	1,81	69	1,95	74	1,98	76	2,3	88	1,78	68
14	0,83	40	1,4	67	1,36	65	1,42	68	1,33	64	1,63	78
15	1,06	52	1,11	55	1,36	67	1,07	53	0,95	47	1,25	62
16	2,13	62	2,02	89	2,23	98	2,18	96	2,19	96	2,1	92
17	1,2	62	1,17	61	1,16	60	1,09	56	1	52	1,03	53
18	1,43	76	1,59	84	1,4	74	1,6	85	1,85	98	1,26	67
19	1,23	59	1,19	57	1,53	74	1,39	67	1,32	64	1,29	62
20	2,72	93	3,06	104	2,86	97	2,97	101	2,75	94	2,29	78

Anexo F - Resultados dos testes de função pulmonar no grupo placebo

	Grupo Placebo	Registro	Idade (anos)	Sexo	Peso (kg)	Estatura (cm)	Escore
1	AS	6056748I	13	M	39,3	155	75
2	BP	6046396G	14	F	46,5	162	75
3	BMC	6054602H	12	M	54	162	90
4	ENN	6031670E	17	F	63	165	90
5	GPL	6071972K	9	M	40,2	136	90
6	GPL	3170530H	10	M	29,3	133	60
7	IMF	6090357G	8	F	24	123	80
8	JCS	6103700A	17	F	46	160	?
9	JNV	6068776H	12	M	40,5	152	75
10	JP	6083097I	8	F	36	135	80
11	KSS	6046480A	15	F	47	152	70
12	LRS	6081770D	13	F	50,5	158	70
13	LFSR	6117005I	12	M	51,2	148	90
14	MMF	6041688J	15	F	33,5	144	45
15	MAM	6077930F	9	M	26,6	132	75
16	PBS	6051478D	15	F	54,4	150	70
17	PEAMP	6073011A	9	M	28	130	80
18	RRC	6098866K	8	F	30	135	90
19	VHCS	6057239D	12	M	23,8	132	60
20	BTCL	6061545F	15	M	45,5	157	75

Continua

Continua

	CVF b (l)	CVF b(%)	CVF 30(L)	CVF 30(%)	CVF 60(L)	CVF 60(%)	CVF 120(L)	CVF 120(%)	CVF 180 (L)	CVF 180 (%)	CVF 24h(L)	CVF 24h(%)
1	2,38	75	2,29	72	2,34	73	2,35	74	2,36	74	2,57	81
2	2,62	77	2,33	68	2,46	72	2,36	69	2,26	66	2,32	68
3	2,34	94	3,28	92	3,06	86	2,17	67	3,02	85	3,13	88
4	3,66	104	3,66	104	3,65	104	3,59	102	3,65	103	3,38	96
5	2,6	111	2,65	112	2,3	98	2,61	111	2,5	106	2,36	100
6	1,44	68	1,46	69	1,58	75	1,55	73	1,73	82	1,5	71
7	1,53	96	1,6	100	1,52	95	1,59	99	1,63	101	1,44	89
8	2,19	66	2,35	71	2,34	71	2,53	77	2,47	75	2,37	72
9	2,86	93	2,96	96	2,87	93	2,78	91	2,76	90	2,63	86
10	2,06	95	1,98	91	1,84	85	1,73	85	2,04	94	2,13	98
11	2,24	76	2,33	79	2,33	79	2,28	77	2,26	76	2,4	81
12	2,18	68	2,14	67	2,19	69	2,21	69	2,26	71	2,15	67
13	1,66	58	1,79	63	1,76	62	1,79	63	1,99	70	1,84	65
14	2,16	83	2,25	86	2,27	87	2,35	90	2,25	86	2,22	85
15	1,98	94	1,86	88	1,93	91	1,81	85	1,95	92	1,65	78
16	2,65	93	2,73	96	2,73	96	2,87	101	2,71	95	2,88	101
17	1,28	64	1,39	70	1,39	70	1,49	75	1,47	73	1,27	63
18	2	92	2,12	98	2,06	95	2,15	99	2,05	95	2,19	101
19	1,63	73	1,53	68	1,76	79	1,54	69	1,64	73	1,64	73
20	3,9	118	3,93	119	4,02	122	4,11	124	3,88	117	4,51	136

Continuação

Continua

	VEF1 b (L)	VEF1 b %	VEF1 30prV	VEF1 30(%)	VEF1 60(L)	VEF1 60 %	VEF1 120(L)	VEF1 120(%)	VEF1 180(L)	VEF1 180(%)	VEF1 24h(L)	VEF1 24h(%)
1	1,76	60	1,65	57	1,7	58	1,76	60	1,75	60	1,88	64
2	2,05	63	1,76	54	1,88	58	1,86	57	1,8	55	1,77	54
3	2,37	73	2,26	69	2,18	67	2,17	67	2,09	64	2,22	68
4	2,94	87	3,06	91	3,12	93	3,03	90	3,05	90	2,92	87
5	2,18	102	2,18	102	1,88	88	2,21	104	2,15	100	1,98	93
6	1,11	58	1,18	61	1,16	60	1,16	61	1,35	70	1,17	61
7	1,34	91	1,46	100	1,41	96	1,4	96	1,46	100	1,36	93
8	2,13	68	2,27	72	2,29	73	2,29	73	2,25	72	2,15	68
9	2,35	84	2,44	87	2,33	83	2,26	80	2,21	79	2,18	78
10	1,7	84	1,61	80	1,44	71	1,73	85	1,73	85	1,72	85
11	1,59	56	1,63	58	1,61	57	1,59	57	1,56	56	1,67	59
12	1,39	46	1,37	45	1,34	34	1,37	45	1,31	43	1,35	45
13	1,31	51	1,33	51	1,46	56	1,4	54	1,48	57	1,42	55
14	1,25	51	1,31	53	1,33	54	1,35	55	1,28	52	1,26	51
15	1,48	77	1,48	77	1,53	80	1,34	70	1,57	82	1,27	67
16	1,87	69	1,93	72	1,91	71	1,95	72	1,95	72	2,04	76
17	0,92	51	1	56	1,05	58	1,16	64	1,09	60	0,9	50
18	1,26	62	1,61	79	1,61	80	1,79	89	1,81	89	1,92	95
19	1,12	55	1,02	51	1,16	57	1,08	53	1,13	56	1,11	55
20	2,74	90	2,82	93	2,8	92	2,91	96	2,75	91	3,3	109

Continuação

Continua

	VEF1(CEV%)	FEF25-75% b(L)	FEF25-75%(%)	FEF25-75% 30 (L)	FEF25-75% 30 (%)	FEF25-75% 60(L)	FEF25-75%60 (%)	FEF25-75% 120 (L)	FEF25-75% 120 (%)	FEF25-75% 180 (L)	FEF25-75% 180 (%)	FEF25-75% 24h (L)	FEF25-75% 24h (%)
1	74	1,33	40	1,19	36	1,22	37	1,34	41	1,28	39	1,33	40
2	78	1,93	53	1,42	39	1,72	44	1,59	47	1,76	48	1,53	42
3	71	1,69	47	1,45	40	1,56	43	1,53	42	1,45	40	1,57	43
4	80	2,93	78	3,17	84	4	107	3,49	93	3,15	84	3,7	99
5	84	2,43	96	2,42	95	1,87	74	2,44	96	2,42	95	2,09	82
6	87	0,97	42	1,05	45	0,87	37	0,9	38	1,2	52	0,99	43
7	87	0,84	39	2,97	127	2,92	124	2,94	109	2,11	113	2,31	124
8	97	3,32	94	3,32	94	2,97	84	3,17	90	3,01	85	3,01	85
9	82	2,38	74	2,51	78	2,29	72	2,27	71	2,15	67	2,2	69
10	82	1,86	77	1,8	74	1,35	56	1,73	71	2,09	86	1,8	74
11	71	1,02	32	1,04	32	1,01	31	0,97	30	0,95	30	1,02	32
12	64	0,79	23	0,81	24	0,71	21	0,78	23	0,62	18	0,75	22
13	79	1,16	39	0,92	31	1,01	34	1,25	42	1,15	38	1,22	41
14	58	0,5	17	0,59	20	0,58	20	0,52	18	0,51	18	0,49	17
15	45	1,18	51	1,36	59	1,42	61	1,06	46	1,63	70	1,23	53
16	70	1,28	41	1,33	43	1,22	39	1,21	39	1,37	44	1,37	44
17	72	0,68	31	0,72	33	0,79	36	0,97	44	0,82	37	0,83	29
18	63	0,55	23	1,27	53	1,47	61	2,2	91	2,59	107	2,47	102
19	69	0,69	28	0,63	26	0,61	25	0,64	26	0,71	30	0,65	27
20	70	1,98	58	2,15	63	1,9	56	2,17	63	2,02	59	2,69	79

Continuação

Continua

	CPT b (L)	CPT b (%)	CPT 30 (L)	CPT 30 (%)	CPT 60(L)	CPT 60(%)	CPT 120(L)	CPT 120(%)	CPT 180(L)	CPT 180(%)	CPT 24h(L)	CPT 24h(%)
1	3,94	97	4,55	111	4,11	101	3,86	94	4,25	104	3,98	97
2	4,13	93	1,24	95	3,87	87	3,97	89	1,03	90	4	90
3	4,62	102	4,72	104	4,54	100	4,42	97	4,54	100	4,67	103
4	4,47	97	4,25	92	4,54	99	4,5	98	4,78	104	4,64	101
5	2,75	90	3,26	107	3,4	112	3,4	112	3,33	110	3,43	113
6	2,62	96	2,72	99	2,85	104	2,61	95	2,61	95	2,9	106
7	2,27	110	1,9	92	1,96	95	2,04	99	2,05	99	2,028	110
8	3,46	80	3,75	87	3,85	90	3,65	85	3,71	86	3,73	87
9	4,15	105	3,92	100	3,92	100	3,81	97	3,84	93	3,65	93
10	2,86	102	2,87	102	3,12	95	3,02	107	2,12	75	3,06	109
11	4,21	109	3,98	103	3,71	96	3,65	95	4,02	104	4,06	105
12	4,3	104	4,29	103	4,2	101	4,34	105	4,89	172	4,8	116
13	2,67	73	2,62	72	2,77	76	2,71	74	2,84	78	2,98	82
14	3,66	107	3,73	110	3,36	98	3,65	107	3,62	106	3,69	108
15	2,5	91	2,92	106	2,78	102	2,54	93	2,58	94	2,51	92
16	4,34	117	4,09	110	4,16	112	3,85	104	4,01	108	4,14	112
17	3,45	133	2,88	111	2,52	97	2,68	103	2,27	88	2,19	85
18	2,64	94	2,65	94	2,8	100	2,71	97	2,63	94	2,74	97
19	3,18	110	3,1	107	2,92	101	2,95	102	3,1	107	3,05	106
20	5,19	123	5,16	122	5,1	120	5,24	124	5,11	121	5,3	125

Continuação

Continua

	VR b (L)	VR b (%)	VR 30(L)	VR 30(%)	VR 60(L)	VR 60 (%)	VR 120(L)	VR 120(%)	VR 180(L)	VR 180(%)	VR 24h(L)	VR 24h(%)
1	1,57	185	2,21	261	1,77	208	1,5	177	1,86	219	1,41	165
2	1,5	160	1,9	203	1,4	150	1,61	172	1,77	189	1,67	179
3	1,27	136	1,38	147	1,47	157	1,26	134	1,52	163	1,54	164
4	0,81	84	0,59	61	0,89	92	0,91	94	1,13	117	1,26	130
5	0,14	22	0,61	95	1,03	160	0,79	122	0,83	128	1,07	166
6	1,15	195	1,27	215	1,27	216	1,06	179	0,88	150	1,4	238
7	0,74	156	0,3	63	0,41	87	0,45	96	0,42	90	0,8	169
8	1,18	130	1,33	147	1,38	152	1,11	122	1,22	134	1,35	149
9	1,16	142	0,96	117	1,01	124	0,99	121	1	122	0,94	115
10	0,8	129	0,89	143	1,07	173	0,86	140	0,07	12	0,93	151
11	1,84	224	1,65	201	1,38	168	1,37	167	1,75	213	1,66	202
12	2,13	242	2,15	245	2,02	229	2,14	243	7,15	557	2,65	302
13	1,01	132	0,63	83	0,89	117	0,92	120	0,85	111	1,14	150
14	1,49	204	1,49	203	1,08	147	1,3	177	1,37	187	1,48	201
15	0,52	89	1,05	179	0,85	144	0,73	125	0,63	107	0,85	144
16	1,45	183	1,35	171	1,42	179	0,98	124	1,31	165	1,26	159
17	1,61	288	1,49	265	1,13	201	1,19	212	0,65	115	0,93	165
18	0,39	63	0,51	82	0,63	102	0,48	79	0,58	95	0,55	89
19	1,54	250	1,57	254	1,16	188	1,41	228	1,46	236	1,41	228
20	1,29	147	1,23	140	1,08	123	1,13	128	1,19	135	0,8	91

Continuação

Continua

	VR/CPT b(%)	VR/CPT 30(%)	VR/CPT 60(%)	VR/CPT 120(%)	VR/CPT 180(%)	VR/CPT 24h (%)
1	40	49	43	39	44	35
2	36	45	36	41	44	42
3	28	29	32	28	34	33
4	18	14	20	20	24	27
5	5	19	30	23	25	31
6	44	47	45	41	34	48
7	32	16	21	22	21	35
8	34	35	36	31	33	36
9	28	25	26	26	26	26
10	28	31	34	29	4	30
11	44	41	37	38	44	41
12	49	50	48	49	68	55
13	38	24	32	34	30	38
14	41	40	32	36	38	40
15	21	36	31	29	24	34
16	33	33	34	26	33	30
17	47	52	45	44	28	42
18	15	19	23	18	22	20
19	49	51	40	48	47	46
20	25	24	21	22	23	15

Continuação

Continua

	Res b (L)	Res b (%)	Res 30(L)	Res 30(%)	Res 60(L)	Res 60(%)	Res 120(L)	Res 120(%)	Res 180(L)	Res 180(%)	Res 24h(L)	Res 24h(%)
1	3,58	121	2,94	99	3,52	119	3,44	116	2,7	91	3,15	106
2	4,89	179	4,52	165	4,29	157	3,58	131	3,94	144	3,65	133
3	8,11	298	8,26	304	5,5	202	4,47	164	3,42	126	3,59	132
4	2,87	108	3,02	113	2,94	110	2,65	99	2,71	102	3,1	116
5	6,77	181	4,19	112	3,82	102	3,5	93	3,78	101	4,29	114
6	6,35	156	7,95	196	6,24	154	8,59	212	6,63	163	7,5	185
7	5,2	110	5,43	115	4,91	104	5,74	121	6,18	130	5,33	113
8	2,91	104	2,68	95	2,57	92	2,93	104	2,25	80	2,46	88
9	3,56	117	4,07	133	3,47	114	3,41	112	3,45	113	3,14	103
10	5,43	141	7,09	184	6,62	172	4,98	129	7,93	206	9,83	255
11	5,58	182	6,58	215	6,68	218	6,66	218	5,79	189	6,32	207
12	6,88	238	8,48	293	9,49	329	7,89	273	7,32	253	8,14	282
13	6,59	202	6,9	212	6,95	213	6,26	192	6,28	193	5,94	182
14	5,28	157	4,91	146	5,02	149	4,63	138	5,37	160	4,78	142
15	3,94	97	3,21	79	3,35	83	4,01	99	3,91	96	4,84	119
16	4,83	153	4,55	144	3,7	117	4,39	139	4,21	133	4	127
17	6,86	162	90,6	214	6,1	144	6,13	145	5,43	128	6,75	160
18	2,95	76	3,16	82	2,92	76	2,94	76	0,58	95	2,96	77
19	6,15	158	6,21	159	6,3	162	6,87	176	6,5	167	6,21	159
20	2,1	73	1,77	61	1,74	61	1,82	63	1,93	67	1,9	66

Continuação

Continua

	Cond b(L)	Cond b(%)	Cond 30(L)	Cond 30(%)	Cond 60(L)	Cond 60(%)	Cond 120(L)	Cond 120(%)	Cond 180(L)	Cond 180(%)	Cond 24h(L)	Cond 24h(%)
1	0,099	46	0,102	48	0,097	45	0,108	50	0,121	57	0,118	55
2	0,063	24	0,068	26	0,075	28	0,089	34	0,08	30	0,084	32
3	0,039	18	0,041	19	0,053	24	0,056	26	0,074	34	0,085	39
4	0,125	47	0,0115	44	0,011	42	0,129	49	0,127	48	0,117	45
5	0,076	45	0,097	57	0,101	60	0,105	62	0,106	63	0,082	49
6	0,077	47	0,065	40	0,079	49	0,06	37	0,074	46	0,058	36
7	0,126	54	0,143	62	0,155	67	0,159	69	0,133	57	0,141	61
8	0,128	49	0,141	53	0,139	53	0,131	50	0,172	65	0,143	54
9	0,121	58	0,105	50	0,123	59	0,127	61	0,122	58	0,142	68
10	0,088	36	0,081	33	0,084	34	0,104	42	0,065	26	0,052	21
11	0,063	24	0,059	23	0,062	24	0,057	22	0,07	27	0,054	21
12	0,045	17	0,036	14	0,031	12	0,037	14	0,021	8	0,033	13
13	0,074	39	0,072	38	0,069	36	0,078	41	0,079	42	0,078	41
14	0,07	27	0,071	28	0,076	29	0,079	31	0,072	28	0,078	30
15	0,159	95	0,176	105	0,163	97	0,157	94	0,154	92	0,133	79
16	0,078	31	0,084	33	0,104	41	0,087	34	0,089	35	0,089	35
17	0,067	44	0,053	35	0,076	50	0,079	52	0,104	68	0,071	47
18	0,166	67	0,165	66	0,177	71	0,177	71	0,186	75	0,15	60
19	0,067	37	0,065	36	0,061	34	0,059	33	0,06	33	0,067	37
20	0,123	57	0,146	68	0,155	72	0,139	65	0,139	65	0,138	64

Continuação

Conclusão

	C ins b(L)	C ins b(%)	C ins 30(L)	C ins 30(%)	C ins 60(L)	C ins 60(%)	C ins 120(L)	C ins 120(%)	C ins 180(L)	C ins 180(%)	C ins 24h(L)	C ins 24h(%)
1	1,8	62	2,26	78	1,99	69	2,09	72	2,2	21	1,98	69
2	1,84	69	1,77	66	1,65	62	1,68	63	1,65	62	1,57	59
3	2,34	74	2,36	74	2,43	76	2,21	70	2,12	67	2,55	80
4	2,6	95	2,2	80	2,6	95	2,46	90	2,61	95	2,99	109
5	1,44	66	1,77	81	1,68	77	1,86	85	1,75	80	1,68	77
6	0,97	47	1,16	56	1,21	59	1,19	58	1,04	51	1,15	56
7	1,09	53	0,98	65	0,99	66	1,07	71	1,05	70	1,26	84
8	1,49	58	1,87	73	1,9	74	2,01	78	2,02	79	1,78	69
9	2,73	98	2,56	92	2,5	90	2,35	85	2,32	83	2,05	74
10	1,51	80	1,6	85	1,66	88	1,8	95	0,96	51	20,1	106
11	2,31	99	2,25	96	2,07	88	1,65	70	2,19	93	1,91	82
12	1,4	55	1,56	61	1,39	54	1,54	60	1,46	57	1,79	70
13	1,33	51	1,33	51	1,27	48	1,37	52	1,52	58	1,47	56
14	1,37	66	1,3	62	1,11	53	1,23	59	1,4	67	1,45	70
15	1,26	62	1,54	76	1,32	65	1,28	63	1,26	62	1,32	65
16	2,45	108	2,43	107	2,22	97	2,03	89	2,21	97	2,12	93
17	1,77	91	1,17	60	0,8	41	1,2	61	1,5	77	0,32	32
18	1,35	71	1,45	77	1,55	82	1,49	79	1,39	73	1,49	79
19	1,06	51	1,15	56	0,92	44	0,94	45	1,05	51	0,96	46
20	2,36	80	2,56	87	2,46	84	2,56	87	2,73	93	2,67	91

8 REFERÊNCIAS

1. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2003;361(9358):681-9.
2. Davies JC, Alton EW, Bush A. Cystic fibrosis. *BMJ*. 2007; 335(7632):1255-9.
3. Accurso FJ. Update in cystic fibrosis 2006. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175(8):754-7.
4. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173(5):475-82.
5. Santos GP, Domingos MT, Wittig EO, Riedi CA, Rosario NA. Neonatal cystic fibrosis screening program in the state of Parana: evaluation 30 months after implementation. *J Pediatr (Rio J)*. 2005; 81(3):240-4.
6. Honório LFO, Ludwig Neto N, Barbosa E, Perin N, Gastaldi LA, Ferreira JE et al. Avaliação da triagem neonatal para fibrose cística no Estado de Santa Catarina. *J Bras Pneumol*. 2006; 32(1):S1.
7. Reis F, Melo SO, Vergara AA. Programa de triagem neonatal para fibrose cística de Minas Gerais (PETN-FC): aspectos clínicos e laboratoriais. *J Bras Pneumol*. 2006; 32(1):S1.

8. Raskin S, Phillips JA, III, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet.* 1993; 46(6):665-9.
9. Dodge JA, Morison S, Lewis PA, Coles EC, Geddes D, Russell G, et al. Incidence, population, and survival of cystic fibrosis in the UK, 1968-95. UK Cystic Fibrosis Survey Management Committee. *Arch Dis Child.* 1997; 77(6):493-6.
10. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Report 2006. Bethesda, Maryland, USA; 2007.
11. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med.* 2007; 28(2):279-88.
12. Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J.* 2007; 29(3):522-6.
13. Balfour-Lynn IM. Newborn screening for cystic fibrosis: evidence for benefit. *Arch Dis Child.* 2008; 93(1):7-10.
14. Camargos PA. Cystic fibrosis in Brazil: the pediatrician's turn. *J Pediatr (Rio J).* 2004; 80(5):344-6.

15. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989; 245(4922):1066-73.
16. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989; 245(4922):1073-80.
17. Riordan JR, Alon N, Grzelczak Z, Dubel S, Sun SZ. The CF gene product as a member of a membrane transporter (TM6-NBF) super family. *Adv Exp Med Biol*. 1991; 290:19-29.
18. Riordan JR. CFTR Function and Prospects for Therapy. *Annu Rev Biochem*. 2008 Feb 27.
19. Quinton PM. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology*. (Bethesda) 2007; 22:212-25.
20. Kerem B, Chiba-Falek O, Kerem E. Cystic fibrosis in Jews: frequency and mutation distribution. *Genet Test*. 1997; 1(1):35-9.
21. Martins CS, Ribeiro F, Costa FF. Frequency of the cystic fibrosis delta F 508 mutation in a population from Sao Paulo State, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 1993; 26(10):1037-40.

22. Raskin S, Phillips JA, III, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet.* 1993; 46(6):665-9.
23. Parizotto EA, Bertuzzo CS. Molecular characterisation of cystic fibrosis patients in the state of Sao Paulo (Brazil). *J Med Genet.* 1997; 34(10):877.
24. Marostica PJ, Raskin S, Abreu-e-Silva FA. Analysis of the delta F508 mutation in a Brazilian cystic fibrosis population: comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(4):529-32.
25. Cabello GM, Moreira AF, Horovitz D, Correia P, Santa RA, Llerena J, Jr., et al. Cystic fibrosis: low frequency of DF508 mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro, Brazil. *Hum Biol.* 1999; 71(2):189-96.
26. Bernardino AL, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CE, Nakaie CM, Gomes CE, et al. Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. *Genet Test.* 2000; 4(1):69-74.
27. Moura Costa FM, Santana MA, Lemos AC, Galvao-Castro B, Acosta AX. Low frequency of the deltaAF508 mutation of the CFTR gene in a highly admixed population in Bahia, Brazil. *Hum Biol.* 2007; 79(3):293-7.

28. Raskin S, Pereira-Ferrari L, Caldeira RF, Abreu F, Marostica P, Rozov T, et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros*. 2008; 7(1):15-22.
29. Okay TS, Oliveira WP, Raiz-Junior R, Rodrigues JC, Del Negro GM. Frequency of the deltaF508 mutation in 108 cystic fibrosis patients in Sao Paulo: comparison with reported Brazilian data. *Clinics*. 2005; 60(2):131-4.
30. Faucz FR, Gimenez J, Ramos MD, Pereira-Ferrari L, Estivill X, Raskin S, et al. Cystic fibrosis in a southern Brazilian population: characteristics of 90% of the alleles. *Clin Genet*. 2007; 72(3):218-23.
31. Macri CN, de Gentile AS, Manterola A, Tomezzoli S, Reis FC, Largo G, I, et al. Epidemiology of cystic fibrosis in Latin America: preliminary communication. *Pediatr Pulmonol*. 1991; 10(4):249-53.
32. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005; 352(19):1992-2001.
33. Accurso FJ, Sontag MK. Gene modifiers in cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 2008; 118(3):839-41.
34. Sontag MK, Accurso FJ. Gene modifiers in pediatrics: application to cystic fibrosis. *Adv Pediatr*. 2004; 51:5-36.

35. Kerem E, Kerem B. Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1996; 22(6):387-95.
36. De BK, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax.* 2006; 61(7):627-35.
37. Silva Filho LV, Bussamra MH, Nakaie CM, Adde FV, Rodrigues JC, Raskin S, et al. Cystic fibrosis with normal sweat chloride concentration--case report. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2003; 58(5):260-2.
38. Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Cystic fibrosis at a Brazilian center of excellence: clinical and laboratory characteristics of 104 patients and their association with genotype and disease severity. *J Pediatr (Rio J).* 2004; 80(5):371-9.
39. Akata D, Akhan O. Liver manifestations of cystic fibrosis. *Eur J Radiol.* 2007; 61(1):11-7.
40. Ribeiro JD, Ribeiro MA, Ribeiro AF. [Controversies in cystic fibrosis--from pediatrician to specialist]. *J Pediatr (Rio J).* 2002; 78 Suppl 2:S171-S186.
41. Della MT, Setian N, Rodrigues JC. Cystic fibrosis-related diabetes: a frequent co-morbidity. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008; 52(2):188-97.

42. Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H. Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1992;303(18):1187-91.
43. Oliveira MC, Reis FJ, Oliveira EA, Colosimo EA, Monteiro AP, Penna FJ. Prognostic factors in cystic fibrosis in a single center in Brazil: A survival analysis. *Pediatr Pulmonol.* 2002; 34(1):3-10.
44. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr.* 1998; 132(4):589-95.
45. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics.* 1959; 23(3):545-9.
46. LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ, Jr. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. *J Pediatr.* 2007; 151(1):85-9.
47. Coles EC, Dodge JA, Morison S. Cystic fibrosis identified by neonatal screening: incidence, genotype, and early natural history. *Arch Dis Child.* 1993; 69(4):470.
48. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168(8):918-51.

49. Coakley RD, Grubb BR, Paradiso AM, Gatzky JT, Johnson LG, Kreda SM, et al. Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(26):16083-8.
50. Quinton PM. Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet*. 2008; 372(9636):415-7.
51. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2003; 361(9358):681-9.
52. Koehler DR, Downey GP, Sweezey NB, Tanswell AK, Hu J. Lung inflammation as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 31(4):377-81.
53. Doring G, Albus A, Hoiby N. Immunologic aspects of cystic fibrosis. *Chest*. 1988; 94(2 Suppl):109S-15S.
54. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med*. 2007; 13(6):231-40.
55. Boucher RC. Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. *J Intern Med*. 2007; 261(1):5-16.
56. Boucher RC. An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; 54(11):1359-71.
57. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med*. 2007; 58:157-70.

58. Matsui H, Wagner VE, Hill DB, Schwab UE, Rogers TD, Button B, et al. A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(48):18131-6.
59. Sriramulu DD, Lunsdorf H, Lam JS, Romling U. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol*. 2005; 54(Pt 7):667-76.
60. Zach MS. Pathogenesis and management of lung disease in cystic fibrosis. *J R Soc Med*. 1991; 84 Suppl 18:10-7.
61. Koehler DR, Downey GP, Sweezey NB, Tanswell AK, Hu J. Lung inflammation as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 31(4):377-81.
62. Greally P, Hussein MJ, Cook AJ, Sampson AP, Piper PJ, Price JF. Sputum tumour necrosis factor-alpha and leukotriene concentrations in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1993; 68(3):389-92.
63. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152(6 Pt 1):2111-8.
64. Strieter RM. Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283(4):L688-L689.

65. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 2003; 544(1-3):129-32.
66. Teichgraber V, Ulrich M, Endlich N, Riethmuller J, Wilker B, De Oliveira-Munding CC, et al. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med.* 2008; 14(4):382-91.
67. Dakin CJ, Numa AH, Wang H, Morton JR, Vertzyas CC, Henry RL. Inflammation, infection, and pulmonary function in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165(7):904-10.
68. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151(4):1075-82.
69. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med.* 2004; 10(5):487-93.
70. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168(8):918-51.
71. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2):194-222.

72. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 1996; 60(3):539-74.
73. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG, et al. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA.* 2005; 293(5):581-8.
74. LiPuma JJ. Update on the *Burkholderia cepacia* complex. *Curr Opin Pulm Med.* 2005; 11(6):528-33.
75. Martins KM, Fongaro GF, Dutra Rodrigues AB, Tateno AF, Zuz-Chernishev AC, Oliveira-Garcia DD, et al. Genomovar status, virulence markers and genotyping of *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from Brazilian cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2008 Feb 1.
76. Wat D, Gelder C, Hibbitts S, Cafferty F, Bowler I, Pierrepoint M, et al. The role of respiratory viruses in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2008; 7(4):320-8.
77. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154(5):1229-56.
78. Blouquit S, Regnier A, Dannhoffer L, Fermanian C, Naline E, Boucher R, et al. Ion and fluid transport properties of small airways in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174(3):299-305.

79. Zapletal A, Desmond KJ, Demizio D, Coates AL. Lung recoil and the determination of airflow limitation in cystic fibrosis and asthma. *Pediatr Pulmonol.* 1993; 15(1):13-8.
80. Schidlow DV. "Maintaining the horizontal line": early intervention and prevention of CF lung disease. *J Cyst Fibros.* 2004; 3(2):63-6.
81. Corey M, Edwards L, Levison H, Knowles M. Longitudinal analysis of pulmonary function decline in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1997; 131(6):809-14.
82. Milla CE, Warwick WJ. Risk of death in cystic fibrosis patients with severely compromised lung function. *Chest.* 1998; 113(5):1230-4.
83. Kosorok MR, Zeng L, West SE, Rock MJ, Splaingard ML, Laxova A, et al. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatr Pulmonol.* 2001; 32(4):277-87.
84. Milla CE. Association of nutritional status and pulmonary function in children with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2004; 10(6):505-9.
85. Milla CE, Warwick WJ, Moran A. Trends in pulmonary function in patients with cystic fibrosis correlate with the degree of glucose intolerance at baseline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162(3 Pt 1):891-5.

86. Peterson ML, Jacobs DR, Jr., Milla CE. Longitudinal changes in growth parameters are correlated with changes in pulmonary function in children with cystic fibrosis. *Pediatrics*. 2003; 112(3 Pt 1):588-92.
87. Milla CE, Billings J, Moran A. Diabetes is associated with dramatically decreased survival in female but not male subjects with cystic fibrosis. *Diabetes Care*. 2005; 28(9):2141-4.
88. Milla CE. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1999; 27(2):71-3.
89. Doring G, Hoiby N. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros*. 2004; 3(2):67-91.
90. Konstan MW, Butler SM, Wohl ME, Stoddard M, Matousek R, Wagener JS, et al. Growth and nutritional indexes in early life predict pulmonary function in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2003; 142(6):624-30.
91. Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, Pasta DJ, Craib ML, Silva SJ, et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2007; 151(2):134-9, 139.
92. Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ, Jr., Willey-Courand DB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176(10):957-69.

93. Wagener JS, Headley AA. Cystic fibrosis: current trends in respiratory care. *Respir Care*. 2003; 48(3):234-45.
94. Doring G, Elborn JS, Johannesson M, de JH, Griese M, Smyth A, et al. Clinical trials in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2007; 6(2):85-99.
95. Doring G, Hoiby N. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros*. 2004; 3(2):67-91.
96. Doring G, Conway SP, Heijerman HG, 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):749-67.
97. Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros*. 2005; 4(1):7-26.
98. Littlewood JM. European cystic fibrosis society consensus on standards--a roadmap to "best care". *J Cyst Fibros*. 2005; 4(1):1-5.
99. Littlewood JM. Good care for people with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2000; 1(2):179-89.
100. Hoiby N, Frederiksen B, Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros*. 2005; 4 Suppl 2:49-54.
101. Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17(1):57-71.

102. Saiman L, Siegel J. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003; 24(5 Suppl):S6-52.
103. da Silva Filho LV, Tateno AF, Martins KM, Zuz Chernishev AC, Garcia DO, Haug M, et al. The combination of PCR and serology increases the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2007; 42(10):938-44.
104. da Silva Filho LV, Tateno AF, Velloso LF, Levi JE, Fernandes S, Bento CN, et al. Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. *Pediatr Pulmonol.* 2004; 37(6):537-47.
105. da Silva Filho LV, Velloso LF, Bento CN, Gytin E, Tateno AF, Levi JE, et al. Use of selective medium for *Burkholderia cepacia* isolation in respiratory samples from cystic fibrosis patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002; 44(4):203-8.
106. da Silva Filho LV, Levi JE, Bento CN, Rodrigues JC, da SR, Sr. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis outpatient clinic. *J Med Microbiol.* 2001; 50(3):261-7.

107. Adde FV, Rodrigues JC, Cardoso AL. Nutritional follow-up of cystic fibrosis patients: the role of nutrition education. *J Pediatr (Rio J)*. 2004; 80(6):475-82.
108. Almeida MB, Bussamra MH, Rodrigues JC. ABPA diagnosis in cystic fibrosis patients: the clinical utility of IgE specific to recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens. *J Pediatr (Rio J)*. 2006; 82(3):215-20.
109. de Almeida MB, Bussamra MH, Rodrigues JC. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in paediatric cystic fibrosis patients. *Paediatr Respir Rev*. 2006; 7(1):67-72.
110. Zapletal A, Houstek J, Samanek M, Vavrova V, Srajer J. Lung function abnormalities in cystic fibrosis and changes during growth. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1979; 15(4):575-92.
111. Zapletal A, Motoyama EK, GIBSON LE, Bouhuys A. Pulmonary mechanics in asthma and cystic fibrosis. *Pediatrics*. 1971; 48(1):64-72.
112. Jones JG, Fraser RB, Nadel JA. Effect of changing airway mechanics on maximum expiratory flow. *J Appl Physiol*. 1975; 38(6):1012-21.
113. Jones JG, Fraser RB, Nadel JA. Prediction of maximum expiratory flow rate from area-transmural pressure curve of compressed airway. *J Appl Physiol*. 1975; 38(6):1002-11.
114. Weinberger M. Airways reactivity in patients with CF. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2002; 23(1):77-85.

115. Zach MS, Oberwaldner B, Forche G, Polgar G. Bronchodilators increase airway instability in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 131(4):537-43.
116. Konstan MW, Butler SM, Schidlow DV, Morgan WJ, Julius JR, Johnson CA. Patterns of medical practice in cystic fibrosis: part II. Use of therapies. Investigators and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1999; 28(4):248-54.
117. Hordvik NL, Sammut PH, Judy CG, Colombo JL. Effectiveness and tolerability of high-dose salmeterol in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2002; 34(4):287-96.
118. Halfhide C, Evans HJ, Couriel J. Inhaled bronchodilators for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; (4):CD003428.
119. Hordvik NL, Sammut PH, Judy CG, Strizek SJ, Colombo JL. The effects of albuterol on the lung function of hospitalized patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154(1):156-60.
120. Hordvik NL, Konig P, Morris D, Kreutz C, Barbero GJ. A longitudinal study of bronchodilator responsiveness in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 131(6):889-93.
121. Avital A, Sanchez I, Chernick V. Efficacy of salbutamol and ipratropium bromide in decreasing bronchial hyperreactivity in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1992; 13(1):34-7.

122. Eggleston PA, Rosenstein BJ, Stackhouse CM, Mellits ED, Baumgardner RA. A controlled trial of long-term bronchodilator therapy in cystic fibrosis. *Chest*. 1991; 99(5):1088-92.
123. Sanchez I, De KJ, Holbrow J, Chernick V. The effect of high doses of inhaled salbutamol and ipratropium bromide in patients with stable cystic fibrosis. *Chest*. 1993; 104(3):842-6.
124. Serisier DJ, Coates AD, Bowler SD. Effect of albuterol on maximal exercise capacity in cystic fibrosis. *Chest*. 2007; 131(4):1181-7.
125. Salvatore D, D'Andria M. Effects of salmeterol on arterial oxyhemoglobin saturations in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002; 34(1):11-5.
126. Hordvik NL, Sammut PH, Judy CG, Colombo JL. Effectiveness and tolerability of high-dose salmeterol in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002; 34(4):287-96.
127. Konig P, Poehler J, Barbero GJ. A placebo-controlled, double-blind trial of the long-term effects of albuterol administration in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1998; 25(1):32-6.
128. Sanchez I, Holbrow J, Chernick V. Acute bronchodilator response to a combination of beta-adrenergic and anticholinergic agents in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 1992; 120(3):486-8.

129. Ziebach R, Pietsch-Breitfeld B, Bichler M, Busch A, Riethmuller J, Stern M. Bronchodilatory effects of salbutamol, ipratropium bromide, and their combination: double-blind, placebo-controlled crossover study in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2001; 31(6):431-5.
130. Gross NJ. Anticholinergic agents in asthma and COPD. *Eur J Pharmacol*. 2006; 533(1-3):36-9.
131. Restrepo RD. Use of inhaled anticholinergic agents in obstructive airway disease. *Respir Care*. 2007; 52(7):833-51.
132. ZuWallack AR, ZuWallack RL. Tiotropium bromide, a new, once-daily inhaled anticholinergic bronchodilator for chronic-obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2004; 5(8):1827-35.
133. Dahl R, Backer V, Ollgaard B, Gerken F, Kesten S. Assessment of patient performance of the HandiHaler compared with the metered dose inhaler four weeks after instruction. *Respir Med*. 2003; 97(10):1126-33.
134. Coulson FR, Fryer AD. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther*. 2003; 98(1):59-69.
135. Gross NJ. Tiotropium bromide. *Chest*. 2004; 126(6):1946-53.
136. Takahashi T, Belvisi MG, Patel H, Ward JK, Tadjkarimi S, Yacoub MH, et al. Effect of Ba 679 BR, a novel long-acting anticholinergic agent, on cholinergic neurotransmission in guinea pig and human airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150(6 Pt 1):1640-5.

137. Haddad EB, Landry Y, Gies JP. Muscarinic receptor subtypes in guinea pig airways. *Am J Physiol.* 1991; 261(4 Pt 1):L327-L333.
138. Haddad EB, Mak JC, Barnes PJ. Characterization of [3H]Ba 679 BR, a slowly dissociating muscarinic antagonist, in human lung: radioligand binding and autoradiographic mapping. *Mol Pharmacol.* 1994; 45(5):899-907.
139. van Noord JA, Smeets JJ, Custers FL, Korducki L, Cornelissen PJ. Pharmacodynamic steady state of tiotropium in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2002; 19(4):639-44.
140. Maesen FP, Smeets JJ, Sledsens TJ, Wald FD, Cornelissen PJ. Tiotropium bromide, a new long-acting antimuscarinic bronchodilator: a pharmacodynamic study in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Dutch Study Group. Eur Respir J.* 1995; 8(9):1506-13.
141. Calverley PM, Lee A, Towse L, van NJ, Witek TJ, Kelsen S. Effect of tiotropium bromide on circadian variation in airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2003; 58(10):855-60.
142. O'Connor BJ, Towse LJ, Barnes PJ. Prolonged effect of tiotropium bromide on methacholine-induced bronchoconstriction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154(4 Pt 1):876-80.
143. Casaburi R, Mahler DA, Jones PW, Wanner A, San PG, ZuWallack RL, et al. A long-term evaluation of once-daily inhaled tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2002; 19(2):217-24.

144. Donohue JF, van Noord JA, Bateman ED, Langley SJ, Lee A, Witek TJ, Jr., et al. A 6-month, placebo-controlled study comparing lung function and health status changes in COPD patients treated with tiotropium or salmeterol. *Chest*. 2002; 122(1):47-55.
145. Littner MR, Ilowite JS, Tashkin DP, Friedman M, Serby CW, Menjoge SS, et al. Long-acting bronchodilation with once-daily dosing of tiotropium (Spiriva) in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161(4 Pt 1):1136-42.
146. Vincken W, van Noord JA, Greefhorst AP, Bantje TA, Kesten S, Korducki L, et al. Improved health outcomes in patients with COPD during 1 yr's treatment with tiotropium. *Eur Respir J*. 2002; 19(2):209-16.
147. Brusasco V, Hodder R, Miravittles M, Korducki L, Towse L, Kesten S. Health outcomes following treatment for six months with once daily tiotropium compared with twice daily salmeterol in patients with COPD. *Thorax*. 2003; 58(5):399-404.
148. Tashkin D, Kesten S. Long-term treatment benefits with tiotropium in COPD patients with and without short-term bronchodilator responses. *Chest*. 2003; 123(5):1441-9.
149. O'Donnell DE, Lam M, Webb KA. Spirometric correlates of improvement in exercise performance after anticholinergic therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160(2):542-9.

150. Taube C, Lehnigk B, Paasch K, Kirsten DK, Jorres RA, Magnussen H. Factor analysis of changes in dyspnea and lung function parameters after bronchodilation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162(1):216-20.
151. Gross NJ, Skorodin MS. Role of the parasympathetic system in airway obstruction due to emphysema. *N Engl J Med.* 1984; 311(7):421-5.
152. Marin JM, Carrizo SJ, Gascon M, Sanchez A, Gallego B, Celli BR. Inspiratory capacity, dynamic hyperinflation, breathlessness, and exercise performance during the 6-minute-walk test in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(6):1395-9.
153. Celli B, Zuwallack R, Wang S, Kesten S. Improvement in resting inspiratory capacity and hyperinflation with tiotropium in COPD patients with increased static lung volumes. *Chest.* 2003; 124(5):1743-8
154. O'Donnell DE, Fluge T, Gerken F, Hamilton A, Webb K, Aguilaniu B, et al. Effects of tiotropium on lung hyperinflation, dyspnoea and exercise tolerance in COPD. *Eur Respir J.* 2004; 23(6):832-40.
155. Gross NJ, Bankwala Z. Effects of an anticholinergic bronchodilator on arterial blood gases of hypoxemic patients with chronic obstructive pulmonary disease. Comparison with a beta-adrenergic agent. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136(5):1091-4.

156. Khoukaz G, Gross NJ. Effects of salmeterol on arterial blood gases in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. Comparison with albuterol and ipratropium. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160(3):1028-30.
157. Mahler DA, Weinberg DH, Wells CK, Feinstein AR. The measurement of dyspnea. Contents, interobserver agreement, and physiologic correlates of two new clinical indexes. *Chest.* 1984; 85(6):751-8.
158. Witek TJ, Jr., Mahler DA. Meaningful effect size and patterns of response of the transition dyspnea index. *J Clin Epidemiol.* 2003; 56(3):248-55.
159. Witek TJ, Jr., Mahler DA. Minimal important difference of the transition dyspnoea index in a multinational clinical trial. *Eur Respir J.* 2003; 21(2):267-72.
160. Jones PW, Quirk FH, Baveystock CM, Littlejohns P. A self-complete measure of health status for chronic airflow limitation. The St. George's Respiratory Questionnaire. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145(6):1321-7.
161. Jones PW. Health status measurement in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2001; 56(11):880-7.
162. *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD*, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2007. Disponível em: <<http://www.goldcopd.org>>. Acesso em 10 jun 2008.

163. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157(5 Pt 1):1418-22.
164. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2002; 57(10):847-52.
165. Niewoehner DE, Rice K, Cote C, Paulson D, Cooper JA, Jr., Korducki L, et al. Prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease with tiotropium, a once-daily inhaled anticholinergic bronchodilator: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2005; 143(5):317-26.
166. van Noord JA, Aumann JL, Janssens E, Verhaert J, Smeets JJ, Mueller A, et al. Effects of tiotropium with and without formoterol on airflow obstruction and resting hyperinflation in patients with COPD. *Chest.* 2006; 129(3):509-17.
167. Shwachman H, Kulczycki LL, Khaw KT. A report on sixty-five patients over 17 years of age. *Pediatrics.* 1965 Nov; 36(5):689-99.
168. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J.* 2005; 26(2):319-38.

-
169. Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, et al. General considerations for lung function testing. *Eur Respir J.* 2005; 26(1):153-61.
170. Wanger J, Clausen JL, Coates A, Pedersen OF, Brusasco V, Burgos F, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J.* 2005; 26(3):511-22.
171. Polgar G. Pulmonary function tests in children. *J Pediatr.* 1979; 95(1):168-70.
172. Quanjer PH, Stocks J, Polgar G, Wise M, Karlberg J, Borsboom G. Compilation of reference values for lung function measurements in children. *Eur Respir J Suppl.* 1989; 4:184S-261S.
173. Tiddens HA. Detecting early structural lung damage in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2002; 34(3):228-31.
174. Casaburi R, Porszasz J. Reduction of hyperinflation by pharmacologic and other interventions. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3(2):185-9.
175. Gross NJ, Skorodin MS. Anticholinergic, antimuscarinic bronchodilators. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 129(5):856-70.
176. Gross NJ. Ipratropium bromide. *N Engl J Med.* 1988; 319(8):486-94.
177. Everard ML, Bara A, Kurian M, Elliott TM, Ducharme F, Mayowe V. Anticholinergic drugs for wheeze in children under the age of two years. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; (3):CD001279.

178. Rodrigo GJ, Castro-Rodriguez JA. Anticholinergics in the treatment of children and adults with acute asthma: a systematic review with meta-analysis. *Thorax*. 2005; 60(9):740-6.
179. McDonald NJ, Bara AI. Anticholinergic therapy for chronic asthma in children over two years of age. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003; (3):CD003535.
180. O'Donnell DE, Hernandez P, Kaplan A, Aaron S, Bourbeau J, Marciniuk D, et al. Canadian Thoracic Society recommendations for management of chronic obstructive pulmonary disease - 2008 update - highlights for primary care. *Can Respir J*. 2008; 15 Suppl A:1A-8A.
181. Jardim J, Oliveira J, Nascimento O. II Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). *J Bras Pneumol*. 2004; 30: S1-S42.
182. Barnes PJ. Distribution of receptor targets in the lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2004; 1(4):345-51.
183. Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci*. 1993; 52:521-528.
184. Barnes PJ, Basbaum CB, Nadel JA. Autoradiographic localization of autonomic receptors in airway smooth muscle. Marked differences between large and small airways. *Am Rev Respir Dis*. 1983; 127(6):758-62.

185. Barnes PJ. The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med.* 2004; 117 Suppl 12A:24S-32S.
186. Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci.* 2003; 72(18-19):2101-9.
187. Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci.* 2008; 106(2):167-73.
188. Nomura J, Hosoi T, Okuma Y, Nomura Y. The presence and functions of muscarinic receptors in human T cells: the involvement in IL-2 and IL-2 receptor system. *Life Sci.* 2003; 72(18-19):2121-6.
189. Koyama S, Rennard SI, Robbins RA. Acetylcholine stimulates bronchial epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *Am J Physiol.* 1992; 262(4 Pt 1):L466-L471.
190. Sato E, Koyama S, Okubo Y, Kubo K, Sekiguchi M. Acetylcholine stimulates alveolar macrophages to release inflammatory cell chemotactic activity. *Am J Physiol.* 1998; 274(6 Pt 1):L970-L979.
191. Choi JY, Joo NS, Krouse ME, Wu JV, Robbins RC, Ianowski JP, et al. Synergistic airway gland mucus secretion in response to vasoactive intestinal peptide and carbachol is lost in cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 2007; 117(10):3118-27.

192. Wine JJ, Joo NS. Submucosal glands and airway defense. *Proc Am Thorac Soc.* 2004; 1(1):47-53.
193. Wine JJ. Parasympathetic control of airway submucosal glands: central reflexes and the airway intrinsic nervous system. *Auton Neurosci.* 2007; 133(1):35-54.
194. Tashkin DP, Cooper CB. The role of long-acting bronchodilators in the management of stable COPD. *Chest.* 2004; 125(1):249-59.
195. Chapman KR. Anticholinergic bronchodilators for adult obstructive airways disease. *Am J Med.* 1991; 91(4A):13S-6S.
196. Chapman KR. The role of anticholinergic bronchodilators in adult asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lung.* 1990; 168 Suppl:295-303.
197. Gross NJ, Co E, Skorodin MS. Cholinergic bronchomotor tone in COPD. Estimates of its amount in comparison with that in normal subjects. *Chest.* 1989; 96(5):984-7.
198. Disse B, Speck GA, Rominger KL, Witek TJ, Jr., Hammer R. Tiotropium (Spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease. *Life Sci.* 1999; 64(6-7):457-64.
199. Disse B. Antimuscarinic treatment for lung diseases from research to clinical practice. *Life Sci.* 2001; 68(22-23):2557-64.

200. Wright JL, Lawson LM, Pare PD, Kennedy S, Wiggs B, Hogg JC. The detection of small airways disease. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 129(6):989-94.
201. Lebecque P, Kiakulanda P, Coates AL. Spirometry in the asthmatic child: is FEF₂₅₋₇₅ a more sensitive test than FEV₁/FVC? *Pediatr Pulmonol.* 1993; 16(1):19-22.
202. Mellis CM, Landau LI. Ventilatory disturbance in children with obstructive lung disease. *Aust Paediatr J.* 1976; 12(2):77-82.
203. Lamarre A, Reilly BJ, Bryan AC, Levison H. Early detection of pulmonary function abnormalities in cystic fibrosis. *Pediatrics.* 1972; 50(2):291-8.
204. Gustafsson PM. Peripheral airway involvement in CF and asthma compared by inert gas washout. *Pediatr Pulmonol.* 2007; 42(2):168-76.
205. Gustafsson PM, De Jong PA, Tiddens HA, Lindblad A. Multiple-breath inert gas washout and spirometry versus structural lung disease in cystic fibrosis. *Thorax.* 2008; 63(2):129-34.
206. Gustafsson PM, Aurora P, Lindblad A. Evaluation of ventilation maldistribution as an early indicator of lung disease in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2003; 22(6):972-9.
207. Van MA, Baran D. Overall and peripheral inhomogeneity of ventilation in patients with stable cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2000; 30(1):3-9.

208. Landau LI, Taussig LM, Macklem PT, Beaudry PH. Contribution of inhomogeneity of lung units to the maximal expiratory flow-volume curve in children with asthma and cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1975; 111(6):725-31.
209. Kraemer R, Blum A, Schibler A, Ammann RA, Gallati S. Ventilation inhomogeneities in relation to standard lung function in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171(4):371-8.
210. Landau LI, Mellis CM, Phelan PD, Bristowe B, McLennan L. "Small airways disease" in children: no test is best. *Thorax.* 1979; 34(2):217-23.
211. Guyatt GH, Townsend M, Nogradi S, Pugsley SO, Keller JL, Newhouse MT. Acute response to bronchodilator. An imperfect guide for bronchodilator therapy in chronic airflow limitation. *Arch Intern Med.* 1988; 148(9):1949-52.
212. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J.* 2005; 26(5):948-68.
213. O'Donnell DE, Banzett RB, Carrieri-Kohlman V, Casaburi R, Davenport PW, Gandevia SC, et al. Pathophysiology of dyspnea in chronic obstructive pulmonary disease: a roundtable. *Proc Am Thorac Soc.* 2007; 4(2):145-68.

214. O'Donnell DE. Is sustained pharmacologic lung volume reduction now possible in COPD? *Chest*. 2006; 129(3):501-3.
215. O'Donnell DE. Hyperinflation, dyspnea, and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2006; 3(2):180-4.
216. O'Donnell DE, Laveneziana P. The clinical importance of dynamic lung hyperinflation in COPD. *COPD*. 2006;3(4):219-32.
217. O'Donnell DE, Webb KA. The major limitation to exercise performance in COPD is dynamic hyperinflation. *J Appl Physiol*. 2008; 105(2):753-5.
218. Maltais F, Hamilton A, Marciniuk D, Hernandez P, Scirba FC, Richter K, et al. Improvements in symptom-limited exercise performance over 8 h with once-daily tiotropium in patients with COPD. *Chest*. 2005; 128(3):1168-78.
219. O'Donnell DE, Fluge T, Gerken F, Hamilton A, Webb K, Aguilaniu B, et al. Effects of tiotropium on lung hyperinflation, dyspnoea and exercise tolerance in COPD. *Eur Respir J*. 2004; 23(6):832-40.
220. Peters MM, Webb KA, O'Donnell DE. Combined physiological effects of bronchodilators and hyperoxia on exertional dyspnoea in normoxic COPD. *Thorax*. 2006; 61(7):559-67.

221. O'Donnell DE, Voduc N, Fitzpatrick M, Webb KA. Effect of salmeterol on the ventilatory response to exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2004; 24(1):86-94.
222. Belman MJ, Botnick WC, Shin JW. Inhaled bronchodilators reduce dynamic hyperinflation during exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 153(3):967-75.
223. O'Donnell DE, Sciruba F, Celli B, Mahler DA, Webb KA, Kalberg CJ, et al. Effect of fluticasone propionate/salmeterol on lung hyperinflation and exercise endurance in COPD. *Chest*. 2006; 130(3):647-56.
224. O'Donnell DE, Hamilton AL, Webb KA. Sensory-mechanical relationships during high-intensity, constant-work-rate exercise in COPD. *J Appl Physiol*. 2006; 101(4):1025-35.
225. O'Donnell DE, Fluge T, Gerken F, Hamilton A, Webb K, Aguilaniu B, et al. Effects of tiotropium on lung hyperinflation, dyspnoea and exercise tolerance in COPD. *Eur Respir J*. 2004; 23(6):832-40.
226. Celli B, Zuwallack R, Wang S, Kesten S. Improvement in resting inspiratory capacity and hyperinflation with tiotropium in COPD patients with increased static lung volumes. *Chest*. 2003; 124(5):1743-8.
227. O'Donnell DE, Fluge T, Gerken F, Hamilton A, Webb K, Aguilaniu B, et al. Effects of tiotropium on lung hyperinflation, dyspnoea and exercise tolerance in COPD. *Eur Respir J*. 2004; 23(6):832-40.

228. Borrill ZL, Houghton CM, Tal-Singer R, Vessey SR, Faiferman I, Langley SJ, et al. The use of plethysmography and oscillometry to compare long-acting bronchodilators in patients with COPD. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65(2):244-52.
229. Borrill ZL, Houghton CM, Woodcock AA, Vestbo J, Singh D. Measuring bronchodilation in COPD clinical trials. *Br J Clin Pharmacol.* 2005; 59(4):379-84.
230. Bussamra MH, Cukier A, Stelmach R, Rodrigues JC. Evaluation of the magnitude of the bronchodilator response in children and adolescents with asthma. *Chest.* 2005; 127(2):530-5.
231. Karpel JP, Kotch A, Zinny M, Pesin J, Alleyne W. A comparison of inhaled ipratropium, oral theophylline plus inhaled beta-agonist, and the combination of all three in patients with COPD. *Chest.* 1994; 105(4):1089-94.
232. Chapman KR, Smith DL, Rebeck AS, Leenen FH. Hemodynamic effects of inhaled ipratropium bromide, alone and combined with an inhaled beta 2-agonist. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 132(4):845-7.
233. Sackner MA, Friedman M, Silva G, Fernandez R. The pulmonary hemodynamic effects of aerosols of isoproterenol and ipratropium in normal subjects and patients with reversible airway obstruction. *Am Rev Respir Dis.* 1977; 116(6):1013-22.

234. Sears MR, Taylor DR, Print CG, Lake DC, Li QQ, Flannery EM, et al. Regular inhaled beta-agonist treatment in bronchial asthma. *Lancet*. 1990; 336(8728):1391-6.
235. Taylor DR, Sears MR, Herbison GP, Flannery EM, Print CG, Lake DC, et al. Regular inhaled beta agonist in asthma: effects on exacerbations and lung function. *Thorax*. 1993; 48(2):134-8.
236. Georgopoulos D, Wong D, Anthonisen NR. Tolerance to beta 2-agonists in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest*. 1990; 97(2):280-4.