

Expertos Invitados

PESQUISA NEONATAL DE FIBROSIS QUISTICA: EVALUACION DEL PROTOCOLO TIR/ADN (ANALISIS DE LAS MUTACIONES MULTIPLES DEL GEN CFTR)/TIR EN UNA POBLACION DE MAS DE 250 000 NEONATOS



**Columnista Experta de SIIC
Dra. Rita Padoan**

Dirigente médico. Paediatrics. Cystic Fibrosis Centre , Pediatric Department, Brescia, Italia

Introducción

La fibrosis quística (FQ) es el trastorno autosómico recesivo más frecuente entre las personas de raza blanca, con una frecuencia en Italia de 1:4 231 nacidos vivos (datos del Registro Nacional).¹ Las mutaciones en el gen regulador de la conducción transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), localizado en el cromosoma 7, producen FQ.^{2,3} El gen codifica para una proteína que se expresa en la membrana apical de determinadas células epiteliales. El CFTR funciona principalmente como un canal de cloro regulado por AMPc.⁴ Desde que comenzó la clonación de genes se identificaron más de 1 000 mutaciones (que fueron notificadas al *CF Genetics Consortium*)⁵ con una gran variabilidad en los fenotipos.⁶ Además de la mutación delF508, responsable en gran proporción de los alelos mutados en la mayoría de las poblaciones, hay otras 15 a 20 mutaciones que comprenden del 2% al 15% de los alelos de la fibrosis quística, y se comprobó una gran variabilidad genética entre poblaciones.⁷ Esta enfermedad, potencialmente mortal, se distingue por una o más características de gravedad variable, tales como disminución progresiva de la función pulmonar secundaria a infecciones pulmonares crónicas, insuficiencia exocrina pancreática que determina desnutrición y retraso en el crecimiento, enfermedad hepática y disminución de la reabsorción de los iones cloruro del sudor.

A pesar de la relativa frecuencia de FQ en las poblaciones de raza blanca y los síntomas claros de la forma clásica de la enfermedad, puede producirse una demora en el diagnóstico que determine desnutrición grave o enfermedad pulmonar crónica en los primeros años de vida. Para realizar el diagnóstico y el tratamiento tempranos se implementaron programas de pesquisa neonatal desde comienzos de la década del '80, con diferentes estrategias en distintos países.^{8,9} Actualmente, se considera que la hipertripsinemia neonatal sumada a un análisis del gen CFTR mediante un gran panel de mutaciones¹⁰ constituye un buen método de pesquisa: sus ventajas son tanto su alta sensibilidad como su alto poder predictivo, lo cual junto con el diagnóstico temprano de FQ dentro del primer mes de vida, permite un mejor enfoque clínico. La derivación temprana para su tratamiento a un centro especializado¹¹ determina menor morbilidad, beneficios nutricionales, mejores funciones cognitivas y mayor expectativa de vida, así como el oportuno asesoramiento genético para la familia.¹²⁻¹⁶

Una consecuencia controvertida de los procedimientos genético-moleculares aplicados en los programas de pesquisa neonatal es la detección de portadores para las mutaciones del gen CFTR y la identificación de un gran número de niños con FQ heterocigotas detectados en el período neonatal, que constituye un gran desafío desde el punto de vista ético. En este grupo de pacientes puede ser difícil la confirmación o la exclusión de FQ, y casi siempre demanda tiempo; por ende, la dificultad diagnóstica puede provocar ansiedad, malentendidos y estrés familiar.

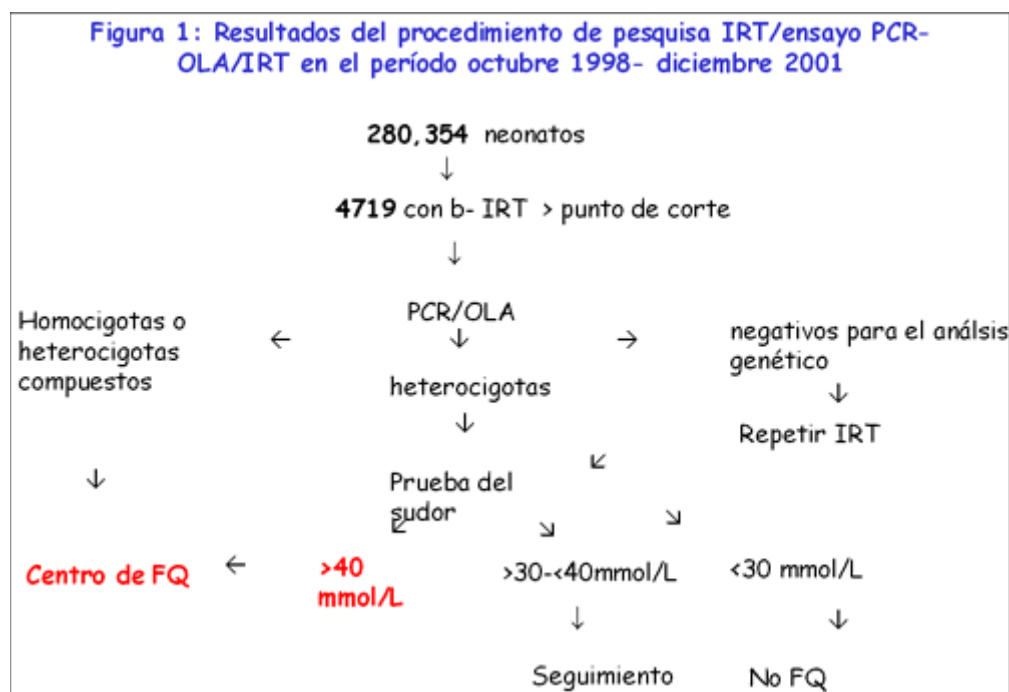
El programa de pesquisa neonatal para FQ se implementó en 1983 en la región de Lombardía (al noroeste de Italia), por medio de las determinaciones de tripsina inmunorreactiva (TIR-b) en las tarjetas de Guthrie, como un tercer programa adicional dentro del panel preexistente para

fenilcetonuria (PKU) e hipotiroidismo congénito. El programa de detección se revisó y perfeccionó con las estrategias subsecuentes, agregándose el análisis molecular (búsqueda de la mutación delF508) en 1993 a las determinaciones de TIR-b. La evaluación de estas estrategias (TIR aislado y TIR más la búsqueda de la mutación delF508) mostró un gran número de falsos negativos en el programa de pesquisa debido principalmente a la gran heterogeneidad genética de la FQ en la población italiana.¹⁷ Desde octubre de 1998 se agregó la búsqueda de 31 mutaciones del gen CFTR al programa de pesquisa (TIR/ADN/TIR) en un esfuerzo por mejorar su eficiencia. Además, y al igual que en nuestra experiencia previa, algunos niños fueron correctamente seleccionados por su hipertripsinemia neonatal persistente pero recibieron un diagnóstico tardío de FQ debido al resultado de una prueba del sudor que se consideró normal ($Cl^- < 60 \text{ mM/l}$) en los primeros meses de vida.¹⁸ A los niños que presentaron una prueba del sudor poco definitiva en los primeros tres meses de vida se les ofreció un amplio análisis genético del gen CFTR y un seguimiento clínico para excluir o confirmar el diagnóstico de FQ.

El objetivo del presente estudio fue evaluar nuestro programa de pesquisa en el período 1998-2001, su eficiencia, sensibilidad y especificidad, junto con los nuevos desafíos que presenta el análisis molecular: la detección de un gran número de portadores entre los recién nacidos hipertripsinémicos y las dificultades diagnósticas en presencia de una prueba del sudor con valores en el límite superior de lo normal.

Materiales y métodos

En el período comprendido entre el 1 de octubre de 1998 y el 31 de diciembre de 2001 se evaluaron 280 354 recién nacidos mediante la estrategia en dos etapas TIR/ADN (ensayo de mutaciones múltiples del gen CFTR - panel de 31 mutaciones)/TIR, como se informó previamente.¹⁹ La figura 1 muestra los pasos del procedimiento de pesquisa. Los recién nacidos con dos mutaciones en el gen CFTR fueron derivados directamente al centro de FQ, la prueba del sudor por iontoforesis con pilocarpina²⁰ se llevó a cabo inmediatamente en niños con una mutación detectada en el gen CFTR o con una segunda determinación de TIR por encima del valor de corte. Se consideró patológica una prueba del sudor con valores de cloruro superiores a 40 mmol/l.²¹ Un valor de cloruro en la prueba del sudor mayor de 30 mmol/l se considera en el límite y requiere mayores investigaciones.



En lactantes que presentan prueba del sudor positiva o en el límite, en los cuales ninguno o sólo un alelo CFTR fue identificado, se llevó a cabo un amplio análisis molecular por la técnica de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), como fuera previamente descrito.²² Se utilizó un estudio por PCR específico para alelos para distinguir los alelos 5T, 7T y 9T. Los productos de amplificación se visualizaron por una tinción en gel de agarosa con etilbromuro al 4%.

Se llevó a cabo una revisión de la base de datos de los pacientes con diagnóstico de FQ seguidos en el Centro de FQ de Milán, nacidos en el período 1998-2001, con resultados negativos en el

programa de detección neonatal. La misma información se solicitó al Registro Italiano de FQ, con respecto a los pacientes nacidos en esta región y seguidos en diferentes centros de FQ.

Resultados

En la región de Lombardía, en el período comprendido entre el 1 de octubre de 1998 y el 31 de diciembre de 2001, la tasa de cobertura del programa de pesquisa neonatal fue mayor al 99% de todos los nacimientos, y se evaluaron 280 354 neonatos. Se seleccionaron 4 719 recién nacidos hipertripsinémicos (1.68%) para el análisis de mutaciones, mediante un ensayo para mutaciones múltiples del gen CFTR.

Se detectó íleo meconial en 11 niños, todos con resultados positivos en el programa de pesquisa. Entre los pacientes hipertripsinémicos, 34 eran homocigotas o heterocigotas compuestas para las mutaciones del gen CFTR consideradas en el panel, por lo cual recibieron diagnóstico de FQ y derivación temprana a la clínica de FQ en el primer mes de vida.

Entre los individuos heterocigotas, se diagnosticó FQ en 32 niños con niveles de cloruro en el sudor > 40 mmol/l en forma persistente, por lo cual se derivaron al Centro de FQ para su evaluación clínica; mientras que los niños con valores de cloruro en el sudor en el límite de lo normal (> 30 mmol/l a < 40mmol/l) fueron derivados para análisis genético extenso con el fin de confirmar o excluir FQ. Entre ellos, se diagnosticaron 14 pacientes con formas atípicas de la enfermedad.

Los niños con hipertripsinemia sin mutaciones en el gen CFTR fueron sometidos a una segunda toma de muestra de TIR-b a los 20 a 30 días de vida; los niños con una segunda prueba por fuera del valor de corte fueron derivados para una prueba del sudor, y así se confirmó el diagnóstico de FQ en 5 niños.

La FQ se diagnosticó en un total de 85 pacientes en el período de 39 meses: 34 homocigotas o heterocigotas compuestas, 46 niños que presentaron al menos una mutación CFTR identificada por el panel de pesquisa y 5 pacientes que no presentaron mutaciones. Con relación al problema de los resultados negativos del programa de pesquisa, sólo a dos niños nacidos durante el período de observación se les realizó el diagnóstico de FQ leve por los síntomas: al primero, a los 20 meses por una alcalosis metabólica grave con hipocloremia durante el caluroso verano de 2003; mientras que al segundo, a los 3 años, por infecciones recurrentes de la vía aérea superior.

La incidencia global de FQ en esta región fue de 1:3 222 (CI 95% 1:2 653-1:4 102).

Tabla 1: Eficiencia del Protocolo TIR / ensayo de las mutaciones múltiples del gen CFTR/TIR

Período estudiado	1.10.1998-31.12.2001
Neonatos sometidos a pesquisa	280,354
% de niños hipertripsinémicos	1.68 %
Lactantes con FQ	85 (11 con íleo meconial)
Falso negativos	2
Incidencia	1:3222 (IC 95%:)
Portadores	286
Sensibilidad	98,1 %
Especificidad	98.4 %
Eficiencia	98.4%
Portadores/hipertripsinémicos	1:16

La tabla 1 muestra los resultados de la estrategia TIR/ADN (31 mutaciones)/TIR, en el período considerado. Los genotipos de los pacientes con FQ seleccionados por la pesquisa neonatal se muestran en la tabla 2: 16.6% son homocigotas, 24% heterocigotas compuestas y 54% heterocigotas. Así, alrededor del 95% de los pacientes con FQ presentan al menos un alelo CFTR que fue identificado por el ensayo de PCR/OLA (ensayo de ligadura de oligonucleótidos combinado con PCR). A los niños con FQ (con formas clásicas o atípicas de la enfermedad) que presentaban sólo una mutación o ninguna, se les realizó un análisis genético extendido por la técnica de DGGE y secuenciamiento, y las mutaciones en el gen CFTR identificadas se muestran en la tabla 3.

Tabla 2.

Genotipos de los pacientes con FQ identificados mediante el programa de pesquisa neonatal

Mutación principal	Mutación secundaria	Nº
Delta F508	Delta F508	10
	G542X	6
	N1303K	3
	R1162X	3
	R117H	2
	R334W, R553X, 2789+5G->A, 365delC, 3849+10kbC->T	1
	Desconocida	22
G542X	G542X	1
	Desconocida	5
1717-1G->A	1717-1G->A	1
	N1303K	1
	Desconocida	2
N1303K	N1303K	1
	Desconocida	1
R334W	R334W	1
	Desconocida	1
W1282X	Desconocida	1
G85E	Desconocida	2
R117H	Desconocida	1
2789+5G->A	Desconocida	1
R347P	Desconocida	2
R347H	Desconocida	2
R1158X	Desconocida	1
R553X	Desconocida	2
2183-AA->G	Desconocida	3
Desconocida	Desconocida	5

Además, con la presente estrategia, se identificó en forma efectiva un alto número de portadores: 286 niños entre los recién nacidos hipertripsinémicos (1/16).

Tabla 3.

Mutaciones en el gen CFTR identificadas después de un amplio análisis genético (DGGE) de 56 cromosomas

mutación	Nº	%
Desconocida	27	48
Alelo 5T	7	12
D1152H	5	9
L1077P	2	4
R1066H	2	4
D110E	2	4
D110H, R117L, G178R, R352Q, D579G, L997F, F1074L, V1153E	1	2
711+3G->A, 4382delA, G673X	1	2

Discusión

El programa de pesquisa neonatal de FQ en recién nacidos se implementó a partir de un protocolo previo durante el período 1998-2001 y se elaboró en vista de la alta heterogeneidad genética de esta población.²³ La estrategia de detección se basó en un protocolo TIR/ADN (ensayo para mutaciones múltiples del gen CFTR)/TIR, por lo cual el análisis molecular se extendió sustancialmente, con una cobertura cercana al 75% de los alelos mutados en esta población con FQ.

Los resultados muestran que casi la totalidad de los niños afectados por la forma clásica de la FQ nacidos en nuestra región se derivan correctamente y en tiempo (antes de las 4 semanas de edad) a un centro de FQ. Además, este protocolo permitió reconocer también formas leves o atípicas de

la enfermedad.

Los datos mostraron buenos resultados en términos de sensibilidad (98.1%), especificidad (98.4%) y eficacia (98.4%). Hasta el momento, sólo se diagnosticaron dos casos de FQ atípica, con resultados falsos negativos para el programa de pesquisa. De cualquier forma, la incidencia de FQ en el período examinado fue de 1:3 222, más elevada que la informada para el total de la población italiana.

La frecuencia observada de portadores fue de 1/16 en los recién nacidos hipertripsinémicos, mayor que el valor estimativo de 1/29. Estos datos confirman los hallazgos previos²⁴ acerca de una frecuencia aumentada de heterocigotas para mutaciones en el gen CFTR en neonatos con TIR positiva. En recién nacidos heterocigotas, la confirmación o exclusión de FQ se basa en la prueba de cloruro en el sudor; sin embargo, cierto número de pacientes mostró concentraciones elevadas de cloruro en el sudor, por encima del límite superior de lo normal. Los niveles anormales de cloruro en el sudor deben considerarse una manifestación fenotípica subclínica de FQ en los neonatos hipertripsinémicos portadores de una mutación para FQ. Además, cierto número de estos niños podría ser portador en el otro cromosoma de una segunda mutación leve en el gen CFTR,²⁵ y es bien sabido que los heterocigotas compuestos con alelos CFTR de gravedad y con infrecuentes mutaciones leves podrían no presentar una prueba de cloruro en el sudor diagnóstica al comienzo de su vida.¹⁸

De esta forma, se requiere perfeccionar el seguimiento diagnóstico de los neonatos con alteraciones bioquímicas (TIR-b y prueba del sudor) y moleculares (una mutación FQ), detectados por el programa de pesquisa de recién nacidos.

De acuerdo con nuestra experiencia podría lograrse mediante lo siguiente:

a) Centralizar la prueba del sudor que debe llevarse a cabo por personal altamente entrenado y experimentado, con establecimiento de los valores mínimos de referencia para lactantes. Para mejorar la eficacia del programa de pesquisa y para evitar un retraso diagnóstico en niños que presentan mutaciones raras, se modificó el valor superior normal de cloruros para el diagnóstico de FQ, descendiendo a 30 mmol/l. Los niños con valores superiores necesitan ser evaluados cuidadosamente en el Centro de FQ.

b) Un amplio estudio genético de la región codificadora para identificar una segunda mutación posible, principalmente en una población con alta heterogeneidad alélica como la italiana, donde la prueba de PCR/OLA es útil solamente para el 75% de los cromosomas FQ.

c) Una elevada colaboración entre el laboratorio y el centro clínico de FQ para el análisis de los casos atípicos. Es necesaria la evaluación completa de los portadores de FQ dentro del programa de pesquisa neonatal para FQ y el centro especializado en FQ debe hacerse cargo de estos pacientes, con visitas clínicas y asesoramiento genético ofrecidos por el equipo médico especializado. Deben llevarse a cabo investigaciones de laboratorio en búsqueda de malabsorción (elastasa fecal y esteatocrito) y Rx de tórax y evaluación microbiológica de las secreciones bronquiales en caso de síntomas respiratorios. Una estricta colaboración con los médicos de atención primaria es también fundamental en estos casos para evitar la información confusa. Este enfoque podría reducir el estrés de los padres, ofrecer un correcto asesoramiento genético y permitir, de ser necesario, el mejor tratamiento en forma temprana.

En conclusión, diversos factores nos llevaron a la obtención de buenos resultados: la eficacia del ensayo molecular aplicado al programa de pesquisa para identificar pacientes de alto riesgo, la mejoría en la seguridad analítica de la detección de TIR- b y en la realización de la prueba del sudor y una nueva definición de los valores normales de laboratorio. Asimismo, dado que la detección neonatal de FQ es un proceso complejo, la cooperación estrecha entre el centro de detección neonatal de FQ (personal del laboratorio de pesquisa, biólogos moleculares) y el centro de FQ clínica (pediatras) permite una derivación temprana de los niños seleccionados por el programa de pesquisa.

Más allá de los resultados, el monitoreo de este proceso requiere ser adecuadamente esquematizado para poder mejorar su rendimiento.

Los autores no manifiestan " conflictos de interés"

BIBLIOGRAFÍA

1. Bossi A, Casazza G, Padoan R, et al What is the incidence of cystic fibrosis in Italy? Data from the National Registry Human Biology 2004, 76(3):455-67.
2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of

3. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* 1989;245:1073-80.
4. Welsh MJ, Smith AE Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993 Jul 2;73(7):1251-4.
5. cystic fibrosis Genetic Analysis Consortium www.genet.sickkids.on.ca/cftr.
6. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67:117-33.
7. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP et al. 2002. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations: Correlation with incidence data and application to screening. *Hum. Mutation* 19:575-606.
8. Crossley JR, Elliott RB, Smith PA Dried blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet* 1979;1:472-74.
9. Wilcken D, Wiley V, Sherry G et al. Neonatal screening for cystic fibrosis. A comparison of two strategies for case detection in 1.2 million babies. *J Pediatr* 1995;127:965-70.
10. Wilcken B, Travert G. Neonatal screening for cystic fibrosis: present and future. *Acta Paediatr Suppl.* 1999 Dec;88(432):33-5.
11. Littlewood JM. Neonatal cystic fibrosis screening: a personal overview from the perspective of a pediatrician. In *Neonatal screening for cystic fibrosis. Proceedings of the international conference Caen, September 9-11 1998.* 1999 Presses Universitaires de Caen, pp309-24.
12. Wilcken B, Chalmers G. Reduced morbidity in patients with cystic fibrosis detected by neonatal screening *Lancet* 1985 Dec 14;2(8468):1319-21.
13. Farrell PM, Kosorok MR, Laxova A, et al. Nutritional benefits of neonatal screening for cystic fibrosis. Wisconsin cystic fibrosis Neonatal Screening Study Group. *N Engl J Med.* 1997 Oct 2;337(14):963-9.
14. Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, Laxova A, Zeng L, Lai HC et al. Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. *Pediatrics* 2001;107:1-13.
15. Kosciak RL, Farrell PM, Kosorok MR et al. Cognitive function of children with cystic Fibrosis: deleterious effect of early malnutrition *Pediatrics* 2004;113(6):1549-58.
16. Lai HC, Cheng Y, Cho H et al. Association between initial disease presentation, lung disease outcomes, and survival in patients with cystic fibrosis *Am J Epidem* 2004;159(6):537-46.
17. Padoan R, Genoni S, Moretti E, et al. Genetic and clinical features of infants false negative to neonatal screening program for cystic fibrosis *Acta Paediatr* 2002;91:82-7.
18. Padoan R, Bassotti A, Seia M, et al. Negative sweat test in hypertrypsinaemic infants with cystic fibrosis carrying rare CFTR mutations *Eur J Pediatr* 2002;161:212-5.
19. Corbetta C, Seia M, Bassotti A et al. Screening for cystic fibrosis in newborn infants: results of a pilot program based on a two tier protocol (IRT/DNA/IRT) in the Italian population *J Med Screen* 2002;9:60-3.
20. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilising pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959;23:158-61.
21. Farrell P, Kosciak R. Sweat chloride concentration in infants homozygous or heterozygous for $\Delta F508$ cystic fibrosis. *Pediatrics* Vol.97 No.4 April 1996.
22. Cremonesi L, Ferrari M, Belloni E, Magnani C, Seia M, Ronchetto P et al. Four new mutations of the CFTR gene (541delC, R347H, R352Q, E585X) detected by DGGE analysis in Italian CF patients, associated with different clinical phenotypes. *Hum Mutat.* 1992;1(4):314-9.
23. Rendine S, Calafell F, Cappello N, et al. Genetic history of cystic fibrosis mutations in Italy. I. Regional distribution. *Ann Hum Genet.* 1997 Sep;61 (Pt 5):411-24.
24. Laroche G, Travert G. Abnormal frequency of $\Delta F508$ mutation in neonatal transitory hypertrypsinaemia. *Lancet* 1991;337:55.
25. Boyne J, Evans S, Pollitt RJ, et al. Many $\Delta F508$ heterozygote neonates with transient hypertrypsinaemia have a second, mild CFTR mutation *J Med Genet* 2000 ;37(7):543-47.

TRATAMIENTO DEL SINDROME ASPIRATIVO RECURRENTE Y DEL REFLUJO GASTROESOFAGICO EN ENFERMOS CON PROCESOS RESPIRATORIOS DE REPETICION EN LA EDAD PEDIATRICA



Columnista Experto de SIIC
Dr. Antonio Salcedo Posadas

Jefe de la Sección de Neumología Pediátrica. Coordinador de la unidad de control y seguimiento de enfermedad pulmonar crónica secundaria a patología neonatal, Madrid, España

El síndrome aspirativo recurrente (SAR) y el reflujo gastroesofágico (RGE) asociados o no, son bastante más frecuentes en la edad pediátrica de lo que se cree.

Estas entidades generan patología broncopulmonar crónica o recurrente muy difícil de tratar, debido a la errática respuesta al tratamiento en muchos casos.

Los mecanismos protectores frente a las aspiraciones recurrentes son el reflejo laríngeo, el reflejo de la tos, el aclaramiento mucociliar y la acción de los macrófagos alveolares; cuando éstos fallan se produce el paso del contenido oral o esofagogástrico a las vías aéreas generando diferente tipo de patología, muy grave, en ocasiones.

Los mecanismos de producción de patología respiratoria en el RGE son la aspiración, con efecto directo sobre la vía aérea, y el mecanismo reflejo por afección del esófago inferior o de la vía aérea con estímulo de diversos receptores.

Por otro lado, las enfermedades respiratorias pueden a su vez favorecer el RGE debido a la hiperinsuflación con aplanamiento diafragmático y cambios en la presión intraabdominal o efectos secundarios a la fisioterapia respiratoria y medicación (teofilinas).

Es importante tener en cuenta, por lo tanto, que la relación entre RGE y sintomatología respiratoria no necesariamente implica aspiración.

La clínica de estos procesos puede ser muy abigarrada y, en muchas ocasiones, silente en individuos con ciertos factores predisponentes, aunque también puede tener lugar en niños sin patología previa. También complican la evaluación de estos procesos las situaciones de inmadurez para coordinar la succión, deglución y respiración que pueden aparecer en recién nacidos y sobre todo en prematuros o en enfermos neurológicos o neuromusculares, en los que la falta de coordinación de los músculos orofaríngeos permite la presencia de alteraciones deglutorias.

Además, en este tipo de pacientes existe un aumento de la prevalencia de RGE como productor de microaspiraciones o de fenómenos reflejos hacia la vía aérea que favorecen la hiperreactividad bronquial y síntomas y signos de obstrucción bronquial crónica.

Es esencial, por lo tanto, diseñar un protocolo terapéutico perfectamente estandarizado que minimice las importantes secuelas que en muchas ocasiones producen las microaspiraciones repetidas, el RGE o ambos en el aparato respiratorio, y que impida la realización de terapias sin fundamento.

Tratamiento

Lo más importante antes de decidir cualquier tipo de actitud terapéutica es diagnosticar la enfermedad de base y definir los factores predisponentes. De esta forma se podrá tratar la enfermedad subyacente con mayor o menor agresividad, según la intensidad y frecuencia de la sintomatología acompañante, y se podrán controlar los factores predisponentes.

Otra cuestión fundamental es realizar una adecuada profilaxis manteniendo una buena higiene oral, medidas físicas, nutrición óptima y antibioticoterapia si existe sospecha de infección. La rehabilitación y el control y seguimiento a través de un grupo de trabajo multidisciplinario son también básicos para una buena evolución.

No debemos olvidar que existe en muchos lactantes inmadurez fisiológica con retraso en la adquisición del desarrollo neuromuscular normal de la deglución, que se resuelve hacia el año de vida. En muchos de estos casos no es necesario instaurar tratamiento, sino ser cautos y realizar una espera activa sin agresiones terapéuticas, si no existe sintomatología importante o si no ceden estos síntomas con la manipulación de la densidad y cantidad de alimento y con tratamiento postural. La *disfunción leve de la deglución* se trata espesando la alimentación, reduciendo el volumen de la ingesta y con terapia postural. La *disfunción moderada* que no cede con espesamiento de las comidas puede necesitar sonda nasogástrica o nasoyeyunal o gastrostomía, con retirada posterior cuando el estudio demuestre ausencia de alteración en la deglución

mediante videofluoroscopia.

En el caso de *disfunción grave de la deglución*, tras falta de respuesta al tratamiento medicamentoso o debido a la presencia de alteraciones anatómicas, será necesario recurrir a la cirugía. La *aspiración recurrente de saliva* se debe tratar con antimuscarínicos en los casos leves, recurriendo a la ligadura de glándulas salivales y con traqueotomía con cirugía de desviación laringotraqueal o epiglotoplastia en casos graves o que no respondan a tratamiento médico.

En cuanto al *reflujo gastroesofágico*,¹ y como se comentó previamente, en el lactante dicho reflujo es frecuente y autolimitado, siendo una variante fisiológica de lo normal; por ello no precisa tratamiento, sino asesoramiento y educación sanitaria a la familia sobre el problema en cuestión, ya que está demostrado fehacientemente que con el conocimiento de la enfermedad se mejora la actuación familiar a todos los niveles. En el caso de que el RGE se complique estará indicado un tratamiento más o menos agresivo según las circunstancias.

Existe evidencia de beneficio terapéutico de los antagonistas de los receptores H₂ o inhibidores de la bomba de protones sobre esofagitis por reflujo, aunque su efectividad en la mejoría de la afección respiratoria secundaria no está bien documentada.^{1,2}

Por otra parte, existen datos que evidencian que la terapia antirreflujo mejora la sintomatología del niño asmático y reduce la necesidad de medicación antiasmática pero no mejora la función pulmonar.³⁻⁷ Por el contrario, en una revisión sistemática realizada recientemente no se observó mejoría tras diversas terapias antirreflujo en pacientes con asma; aunque estos enfermos no fueron reclutados por síntomas respiratorios relacionados con RGE, lo que podría indicar que existen diferentes subgrupos de pacientes asmáticos que responden o que no responden a la terapia antirreflujo⁸. No obstante, se necesitan más estudios controlados que determinen qué tipo de pacientes con asma requieren medición del pH o gammagrafía y cuáles se beneficiarán con una terapia antirreflujo exclusivamente.^{9,10}

Aun así, en los pacientes con asma o síntomas respiratorios recurrentes y sospecha de RGE está indicada una terapia supresora de la acidez durante al menos tres meses. Hay autores que opinan que existe un mayor beneficio si se utilizan los inhibidores de la bomba de protones en dosis dobles.¹¹ Los antiácidos no deben ser utilizados crónicamente por sus efectos secundarios.

La terapia procinética –como el cisapride– se debe instaurar en pacientes seleccionados mayores de 2 años con asma, sin respuesta a terapias postural y antisecretora previas y con afección de la calidad de vida, con una adecuada monitorización (arritmias) y con dosis correcta (0.2 mg/kg/dosis 4 veces al día).¹ En cambio, para otros autores, no es aconsejable utilizar dicha medicación.¹² Se pueden emplear otros procinéticos diferentes si se considera conveniente.

Otros tratamientos sin evidencias serias de beneficio terapéutico, consisten en el cambio del estilo de vida con elevación de la cabecera de la cama (decúbito lateral izquierdo en niños y adolescentes), disminución del consumo de grasas, chocolate, alcohol, café, ajo y cebolla, dejar el tabaco y evitar el decúbito supino hasta tres horas luego de la ingesta.

Para otros grupos es conveniente ensayar una o dos semanas de terapia con fórmula hipoalérgica o espesar la leche o utilizar fórmulas especiales antirreflujo.¹³

El *broncoespasmo* por reflejo secundario a RGE mejora con el tratamiento con bloqueantes H₂. Sin embargo, en el broncoespasmo secundario a aspiración pura, el mejor tratamiento suele ser el quirúrgico. La cirugía mejora espectacularmente los síntomas, aunque no hay estudios de índice riesgo-beneficio y costo-calidad de vida entre la terapia medicamentosa prolongada y el tratamiento quirúrgico. La cirugía antirreflujo se puede realizar mediante laparoscopia,¹⁴ ya que es segura y efectiva en reducir el reflujo y la aspiración. Es más efectiva que el tratamiento médico para el control de los síntomas respiratorios asociados al reflujo.¹⁵ Se están investigando nuevas técnicas quirúrgicas endoscópicas que todavía deben ser consideradas experimentales.^{12,16,17}

En pacientes con *neumonía aspirativa de repetición* que no responde al tratamiento puede ser necesaria también traqueotomía con cirugía de desviación laringotraqueal o epiglotoplastia.¹⁸⁻²¹

Por lo tanto, se debe ser cuidadosos en la indicación de cirugía a todos estos pacientes, ya tengan SAR secundario a alteraciones en la deglución o por microaspiraciones, o tengan RGE. Este tipo de terapia se debe llevar a cabo en centros especializados, sobre enfermos seleccionados, cuando los síntomas respiratorios sean graves o en los que no responden a la terapia postural, dietética y farmacológica, tras una adecuada revisión de las pruebas diagnósticas realizadas (radiología, LBA, medición del pH y dinámica deglutoria). Muchos pacientes incluso con pH normal pueden beneficiarse del tratamiento quirúrgico, habiéndose observado que es más efectivo en niños que en adultos.^{22,23}

El autor no manifiesta "conflictos de interés".

BIBLIOGRAFÍA

1. Rudolph CD, Mazur LJ, Liptak GS, Baker RD, Boyle JT, Colletti RB, et al; North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Guidelines for evaluation and treatment of gastroesophageal reflux in infants and children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32 Suppl 2:S1-S31.
2. Richter JE. Medical management of patients with esophageal or supraesophageal gastroesophageal reflux disease. *Am J Med* 2003; 115 Suppl 3A:179S-187S.
3. Tucci F, Resti M, Fontana R, Novembre E, Lami CA, Vierucci A. Gastroesophageal reflux and bronchial asthma: prevalence and effect of cisapride therapy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17:265-70.
4. Eid NS, Shepherd RW, Thomson MA. Persistent wheezing and gastroesophageal reflux in infants. *Pediatr Pulmonol* 1994; 18:39-44.
5. Khoshoo V, Thao Le, Haydel RM Jr, Landry L, Nelson C. Role of gastroesophageal reflux in older children with persistent asthma. *Chest* 2003; 123:1008-13.
6. Field SK, Sutherland LR. Does medical antireflux therapy improve asthma in asthmatics with gastroesophageal reflux? A critical review of the literature. *Chest* 1998; 114:275-83.
7. Khoshoo V, Le T, Haydel RM Jr, Landry L, Nelson C. Role of gastroesophageal reflux in older children with persistent asthma. *Chest* 2003; 123:1008-13.
8. Gibson PG, Henry RL, Coughlan JL. Gastro-oesophageal reflux treatment for asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*; 2003; (2); CD001496.
9. Harding SM, Guzzo MR, Richter JE. 24-h esophageal testing in asthmatics: respiratory symptom correlation with esophageal acid events. *Chest* 1999; 115:654-9.
10. Thomas EJ, Kumar R, Dasan JB, Kabra SK, Bal CS, Menon S, Malhotra A. Gastroesophageal reflux in asthmatic children not responding to asthma medication. A scintigraphic study in 126 patients with correlation between scintigraphic and clinical findings of reflux. *Clin Imaging* 2003; 27:333-6.
11. Kiljander TO. The role of proton pump inhibitors in the management of gastroesophageal reflux disease-related asthma and chronic cough. *Am J Med* 2003; 115 Suppl 3A:65S-71S.
12. Moss SF, Armstrong D, Arnold R, Ferenci P, Fock KM, Holtmann G, et al. GERD 2003 - a consensus on the way ahead. *Digestion* 2003; 67:111-7.
13. Vanderhoof JA, Moran JR, Harris CL, Merkel KL, Orenstein SR. Efficacy of a pre-thickened infant formula: A multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled parallel group trial in 104 infants with symptomatic gastroesophageal reflux. *Clinical Pediatrics* 2003; 42: 483-95.
14. Powers CJ, Levitt MA, Tantoco J, Rossman J, Sarpel U, Brisseau G, et al. The respiratory advantage of laparoscopic Nissen fundoplication. *J Pediatr Surg* 2003; 38:886-91.
15. Oelschlager BK, Pellegrini CA. Surgical treatment of respiratory complications associated with gastroesophageal reflux disease. *Am J Med* 2003; 115 Suppl 3A:72S-77S.
16. Oleynikov D, Oelschlager B. New alternatives in the management of gastroesophageal reflux disease. *Am J Surg* 2003; 186:106-11.
17. Neuhauser B, Bonatti H, Hinder RA. Treatment strategies for gastroesophageal reflux disease. *Chirurg* 2003; 74:617-25.
18. Yamana T, Kitano H, Hanamitsu M, Kitajima K. Clinical outcome of laryngotracheal separation for intractable aspiration pneumonia. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001; 63:321-4.
19. Wang D, Dulguerov P. Laryngeal diversion and tracheotracheal speech fistula for chronic aspiration. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109:602-4.
20. Remacle M, Marza L, Lawson G. A new epiglottoplasty procedure for the treatment of intractable aspiration. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1998; 255:64-7.
21. Takamizawa S, Tsugawa C, Nishijima E, Muraji T, Satoh S. Laryngotracheal separation for intractable aspiration pneumonia in neurologically impaired children: Experience with 11 cases. *J Pediatr Surg* 2003; 38:975-7.
22. Ahrens P, Heller K, Beyer P, Zielen S, Kühn C, Hofmann D, et al. Antireflux surgery in children suffering from reflux-associated respiratory diseases. *Pediatr Pulmonol* 1999; 28:89-93.
23. Allgood PC, Bachmann M. Medical or surgical treatment for chronic gastroesophageal reflux? A systematic review of published evidence of effectiveness. *Eur J Surg* 2000; 166:713-21.

HEPATOMETRIA ULTRA-SONOGRÁFICA EM CRIANÇAS: PROPOSTA DE NOVO MÉTODO - SÍNTESE COMENTADA E ESTUDO DE REPRODUTIBILIDADE INTER-OBSERVADORES



Columnista Experta de SIIC
Dra. Silvia Maria Sucena da Rocha

Médica Assistente do Setor de Diagnóstico por Imagem do Instituto da Criança "Prof. Pedro de Alcântara" do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Campo de especialização Diagnóstico por Imagem. San Pablo, Brasil

Introdução

O aumento do fígado é um achado clínico comum na infância, podendo ser decorrente de doença hepática intrínseca ou de alterações sistêmicas.¹ A determinação do tamanho do fígado é, portanto, procedimento de rotina no exame clínico de crianças.

O método clínico de biometria hepática, contudo, apresenta limitações, decorrentes de variações na forma, eixo e posição do fígado,^{2,3} de suas relações com estruturas vizinhas^{2,4} e da técnica empregada,^{5,6} sendo operador dependente.⁷

A hepatometria "in vivo" pode, ainda, ser realizada por métodos de diagnóstico por imagem, tais como: radiografia,^{9,10-14} cintilografia,^{3,15-20} ultra-sonografia^{15,20-38} e tomografia computadorizada,³⁹ que, por sua vez, procuram oferecer subsídios mais concretos, com melhor reprodutibilidade, com o objetivo, tanto de complementar a avaliação clínica, como de minimizar o fator operador-dependência deste procedimento.

Dentre os métodos de imagem, a ultra-sonografia apresenta vantagens, sobretudo na avaliação do paciente pediátrico, por tratar-se de método totalmente não invasivo, não utilizar radiação ionizante e não exigir sedação, além de permitir o estudo minucioso do parênquima e estruturas hepáticas. Assim, a ultra-sonografia é, de modo geral, o primeiro exame de imagem solicitado para esclarecimento diagnóstico, quando há suspeita clínica de hepatomegalia e o exame de escolha no monitoramento de alterações do tamanho do fígado, que possam ocorrer na evolução natural de doenças ou em consequência a terapia.

O método ultra-sonográfico, no entanto, tem como limitações o fator operador-dependência e as barreiras à progressão do feixe sonoro, representadas pelo ar e estruturas ósseas. As barreiras ao som assumem especial relevância no que se refere ao estudo do fígado, devido a sua localização, uma vez que, o acesso ao órgão pode ser prejudicado pela interposição dos arcos costais e porção variável de parênquima pulmonar que se insinua entre o fígado e a parede abdominal.

A forma do fígado constitui outro fator de dificuldade para a padronização de medidas, pois, sendo bizarra, grosseiramente semelhante a uma cunha e com ampla superfície superior, arredondada, exige definição de pontos de referência precisos quando se pretende padronizar uma técnica com boa reprodutibilidade.

No que se refere à hepatometria ultra-sonográfica em crianças, há multiplicidade de métodos propostos,^{21,24-26,28,33,35} o que, a nosso ver, revela a falta de um, que atenda às necessidades do examinador, isto é, um método preciso, reprodutível e de fácil execução.

Com o intuito de determinarmos um método que atendesse a essas prerrogativas, realizamos estudo de mensuração do fígado de crianças, entre 0 e 6 anos de idade,⁴⁰ em que avaliamos diversos parâmetros de hepatometria, quanto à reprodutibilidade inter-observador e quanto às dificuldades técnicas para sua obtenção. Nesse trabalho foi realizada, ainda, a análise de correlação dos diversos parâmetros entre si.

Método

Propomos método de biometria hepática baseado em dois planos seccionais longitudinais, estabelecidos pela inter-relação de reparos anatômicos intra- abdominais, intra e extra-hepáticos. Para a avaliação do tamanho do fígado são utilizados dois parâmetros: a) o diâmetro crânio-caudal do lobo hepático esquerdo, medido na linha médio esternal (LME), tendo como reparo anatômico intra-hepático a veia hepática esquerda e b) o diâmetro crânio-caudal posterior do lobo hepático direito, na linha hemi-clavicular (LHC), tendo como reparo anatômico intra-hepático o ramo portal direito (figuras 1, 2 e 3).

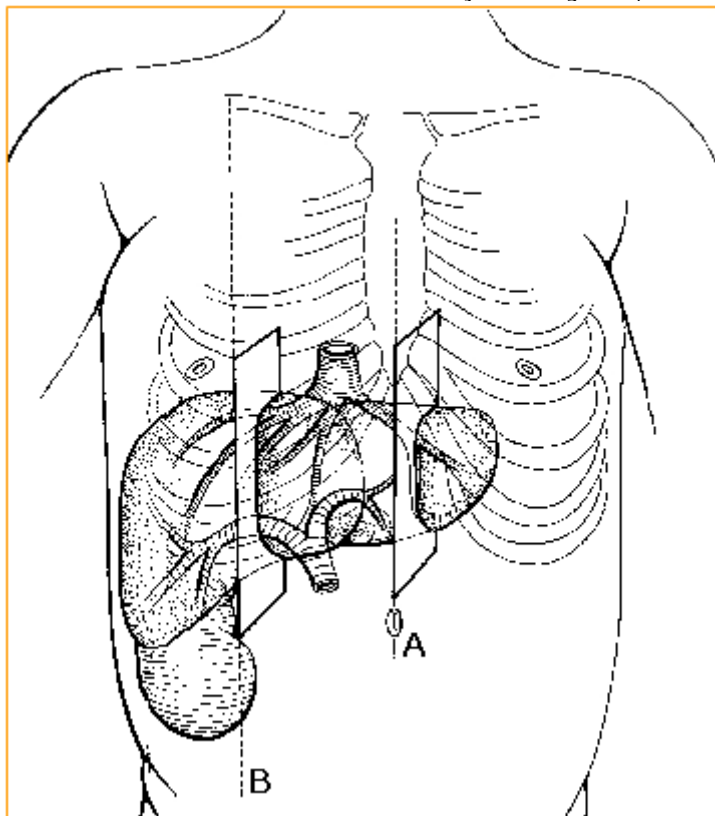


Figura1. Representação esquemática dos planos de corte para a hepatometria em crianças, estabelecidos pelas linhas de orientação externas: **A** (linha médio-esternal, para a medida do lobo hepático esquerdo) e **B** (linha hemi-clavicular, para a medida do lobo hepático direito).

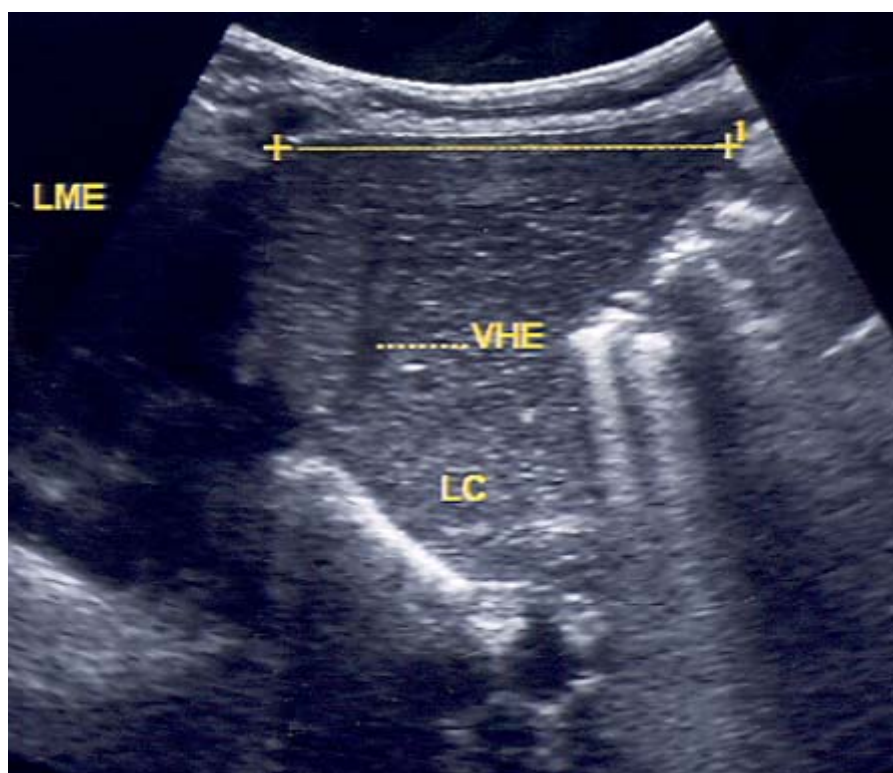


Figura 2. Medida do diâmetro crânio-caudal do lobo hepático esquerdo na linha médio-esternal (LME), tendo como reparo anatômico intra-hepático a veia hepática esquerda (VHE). Ressalta-se que a veia cava inferior não deve ser incluída na imagem. LC: lobo caudado.

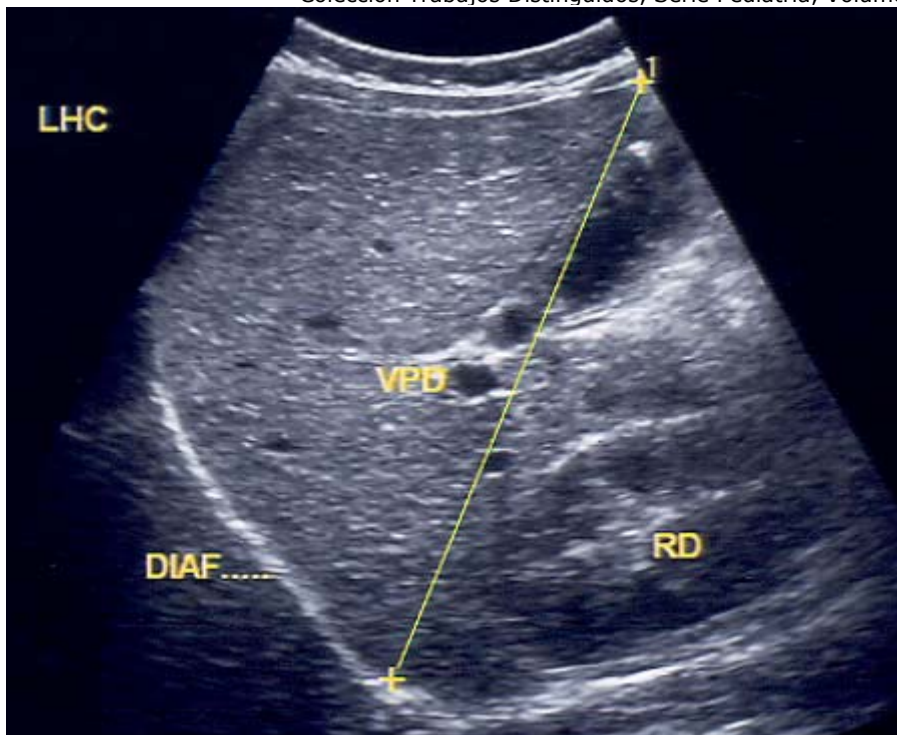


Figura 3. Medida do diâmetro crânio-caudal posterior do lobo hepático direito, medido na linha hemi-clavicular (LHC), tendo com reparo anatômico intra-hepático a veia porta direita (VPD), em corte transversal. Reparos anatômicos intra-abdominais extra-hepáticos: rim direito (RD) e ampla visualização do diafragma.

Comentários

O método proposto foi composto pelos parâmetros que apresentaram menores dificuldades técnicas e altos índices de correlação positiva com os demais parâmetros estudados, de forma a poderem representá-los. Ressalta-se que o diâmetro antero-posterior do lobo hepático esquerdo não apresentou correlação com qualquer dos parâmetros analisados.

O método se mostrou reprodutível por um mesmo observador e a introdução de reparos anatômicos intra-hepáticos resultou proveitosa, permitindo definição mais precisa dos planos de corte para aferição das medidas, minimizando o fator operador-dependência.

Estudo da variabilidade inter-observador

No período entre Agosto e Outubro de 2002 foi realizado estudo com o objetivo de testar a reprodutibilidade inter-observador do novo parâmetro introduzido (diâmetro crânio-caudal posterior na linha hemi-clavicular - CCPLHC) e do parâmetro classicamente utilizado para a medida do lobo hepático direito (diâmetro crânio-caudal anterior na linha hemi-clavicular - CCALHC).

População de estudo e metodo

Três examinadores independentes realizaram a biometria hepática em 31 crianças, com idades entre 0 e 6 anos, aplicando método ultra-sonográfico padronizado. Todas as crianças haviam sido encaminhadas para exame de ultra-sonografia abdominal no Setor de Diagnóstico por Imagem do ICR devido a suspeitas diagnósticas diversas. Foram excluídas da amostra crianças com doenças crônicas hepáticas ou das vias biliares.

Os exames de ultra-sonografia foram realizados em Modo-B, com equipamento ATL modelo APOGEE 800 PLUS e Aloka modelo SS-2000, utilizando-se transdutor convexo de 5.0 MHz.

A biometria hepática foi realizada separadamente por cada um dos examinadores (observador 1, 2 e 3), sem uma ordem pré-definida. Foram medidos os diâmetros CCPLHC e CCALHC.

A variabilidade inter-observadores foi testada utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson e o modelo de regressão linear.

Resultados

Os valores das medidas dos diâmetros CCPLHC e CCALHC obtidos pelos observadores 1, 2 e 3 são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – VALORES DAS MEDIDAS DOS DIAMETROS CCPLHC E CCALHC AFERIDAS PELOS OBSERVADORES 1, 2 E 3 (n=31)

	CCPLHC				CCALHC		
OBS 1	OBS 2	OBS 3		OBS 1	OBS 2	OBS 3	
96	85	92		57	55	55	
60,27	66,48	70,91		31,01	32,38	19,65	
92,11	83,37	92,3		43,5	44,78	40,42	
93	88	89		49	47	44	
107	114	102		74	66	59	
75	86	74		58	60	49	
62,4	75,27	78,54		63,91	45,87	58,16	
76,16	74,1	75,3		54,85	42,06	43,32	
64,45	72,12	75,99		36,79	46,5	49,65	
107,5	113,4	111,6		63,04	54,94	53,14	
91,02	84,3	83,18		51,67	48,02	40,59	
85,01	86,08	89,55		62,39	45,49	56,98	
77,87	81,55	81,99		58,39	61,59	60,28	
53,44	54,3	47,29		37,93	42,58	39,11	
122	115	130		78	68	87	
96	97	100		59	47	61	
101	99	100		47	47	54	
55,43	54,51	57,61		40,12	48,07	44,91	
55,26	53,54	50,13		42,25	44,72	37,76	
59,64	58,05	59,95		36,46	35,5	35,97	
104	101	107		73	75	83	
113,4	130,1	122,2		63,71	95,45	77,03	
60,67	72,45	65,23		34,54	40,26	33,11	
65,45	68,52	65,4		45,17	46,92	37,15	
64,08	64,93	60,74		46,1	55,28	56,14	
99,97	109,8	100,6		60,28	65,76	72,87	
60,68	53,22	57,25		46,1	51,68	44,75	
70	83	77		56	51	50	
81	89	90		55	53	61	
59	53	66		36	29	35	
114,6	116,7	116,7		65,48	50,16	78,88	

Os resultados do estudo de correlación mostraron que houve correlación positiva e significativa entre os valores das medidas obtidas polos três observadores para ambos os parâmetros analisados, ou seja, para um mesmo parâmetro, quanto maior o valor obtido por um observador, maior o valor obtido pelo outro.

Aplicando-se o modelo de regressão observou-se que os observadores 1, 2 e 3 reproduziram os valores de CCPLHC, enquanto que não houve reprodução dos valores de CCALHC por qualquer dos observadores.

Nos gráficos 1 a 6 são apresentados os coeficientes de correlação de Pearson (r), o nível de significância (p) e os modelos de regressão linear para os valores de CCPLHC (gráficos 1, 2 e 3) e CCALHC (gráficos 4, 5 e 6).

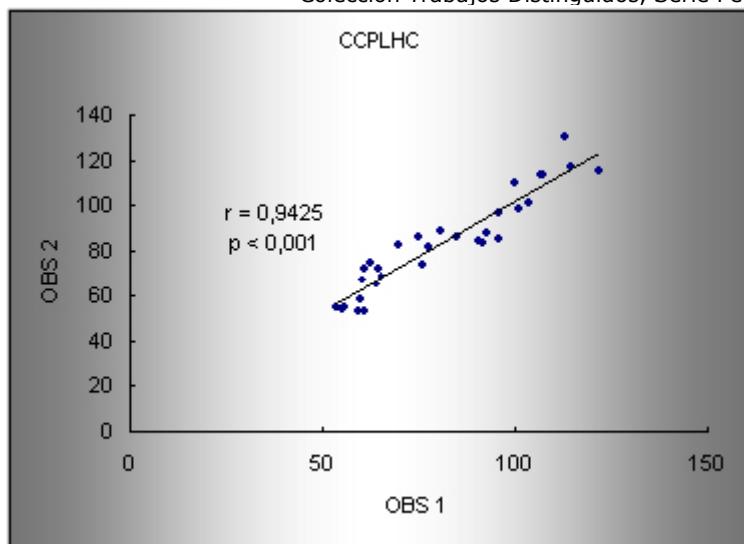


Gráfico 1. Regressão para os valores de CCPLHC entre os observadores 1 e 2. r: coeficiente de correlação de Pearson. Modelo de regressão: $obs1 = 5.65 + 0.91 (obs2)$.

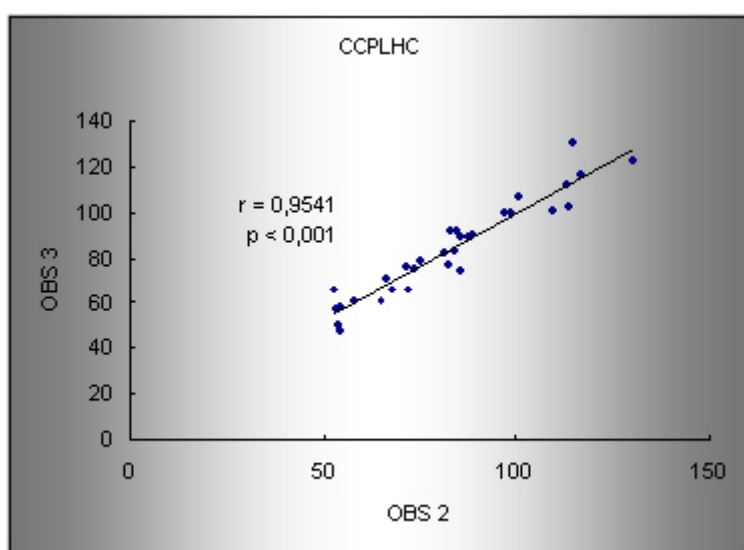


Gráfico 2. Regressão para os valores de CCPLHC entre os observadores 2 e 3. r: coeficiente de correlação de Pearson. Modelo de regressão: $obs2 = 3.26 + 0.96 (obs3)$.

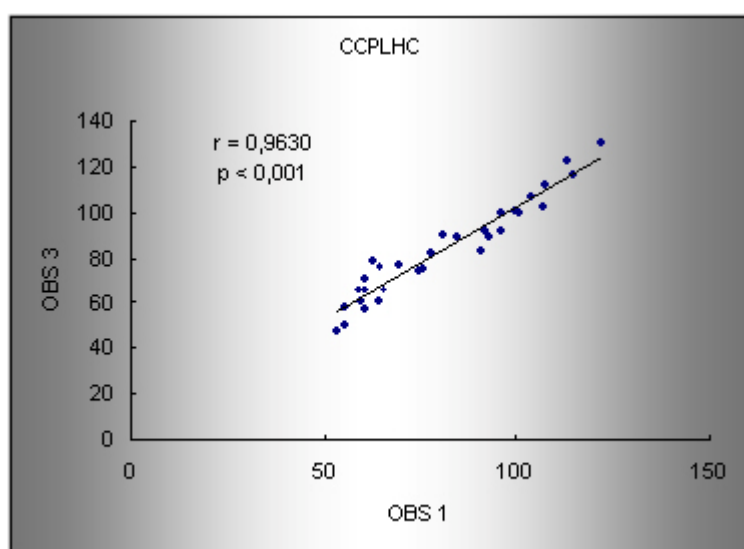


Gráfico 3. Regressão para os valores de CCPLHC entre os observadores 1 e 3. r: coeficiente de correlação de Pearson. Modelo de regressão: $obs1 = 3.45 + 0.93 (obs3)$.

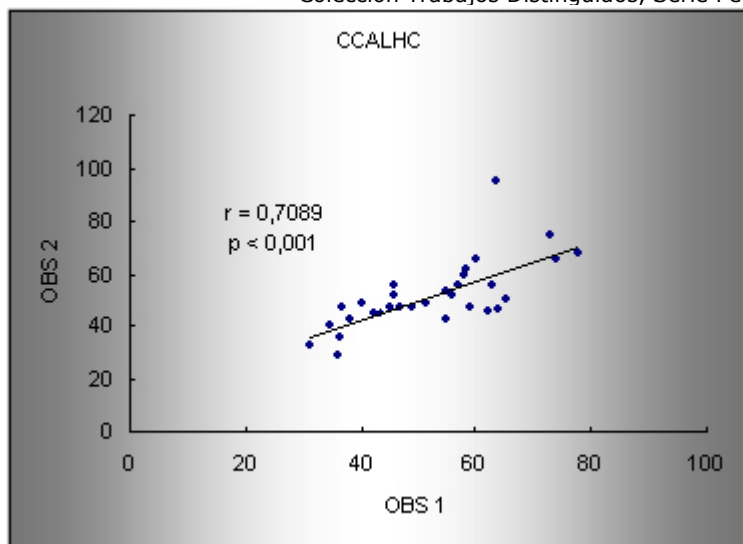


Gráfico 4. Regressão para os valores de CCALHC entre os observadores 1 e 2. r: coeficiente de correlação de Pearson. Modelo de regressão: $obs1 = 17.52 + 0.68 (obs2)$.

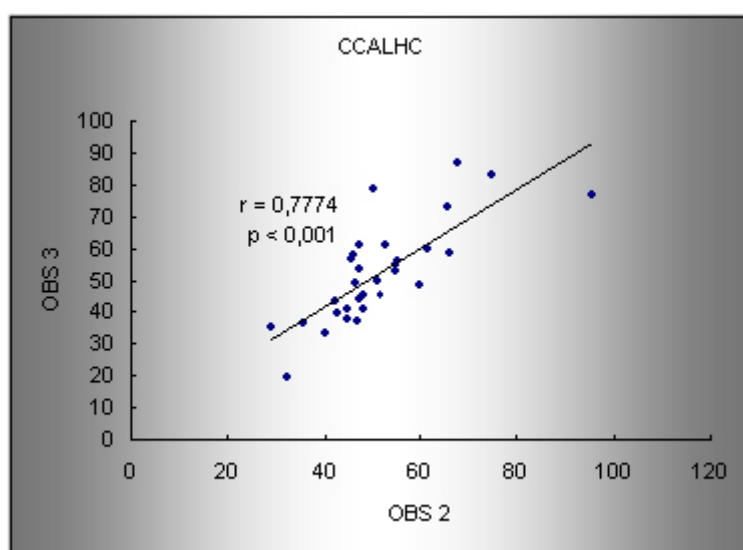


Gráfico 5. Regressão para os valores de CCALHC entre os observadores 2 e 3. r: coeficiente de correlação de Pearson. Modelo de regressão: $obs2 = 17.82 + 0.64 (obs3)$.

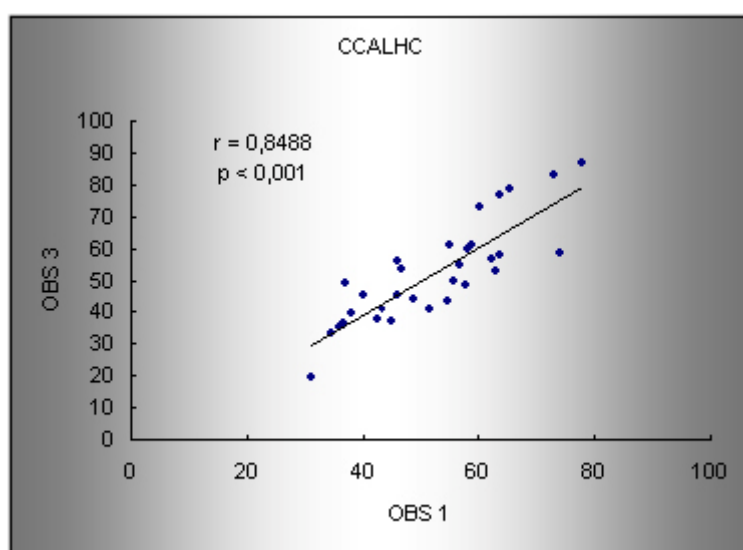


Gráfico 6. Regressão para os valores de CCALHC entre os observadores 1 e 3. r: coeficiente de correlação de Pearson. Modelo de regressão: $obs1 = 17.27 + 0.63 (obs3)$.

Discussão

A maioria dos estudos de biometria hepática em crianças^{21,24- 26,33,34} propõe como parâmetro para avaliação do tamanho do lobo hepático direito a medida do comprimento da borda anterior do

fígado na linha hemi-clavicular ("liver span"), que denominamos CCALHC. Esse parâmetro, no entanto, utiliza a interface hepato-diafragmática anterior como um dos reparos anatômicos. A falta de definição dessa interface, pela interposição de arcos costais e/ou parênquima pulmonar, pode comprometer a precisão da medida e resultar em discrepâncias ao se tentar reproduzi-la.¹⁵ Em estudo realizado anteriormente⁴⁰ comprovamos a reprodutibilidade de CCALHC por um mesmo observador. No presente estudo, porém, os resultados não mostraram reprodutibilidade deste parâmetro por observadores diferentes.

O novo parâmetro que introduzimos para avaliação do comprimento hepático na linha hemi-clavicular (CCPLHC), tem como referência a interface hepato-diafragmática posterior. Esta interface, pela ausência de interposição de parênquima pulmonar, mostra-se nítida, permitindo definição precisa dos limites do órgão. CCPLHC mostrou-se reprodutível, tanto em estudo de variabilidade intra-observador,⁴⁰ como neste de variabilidade inter-observadores, devido à definição precisa de seus pontos de referência.

Conclusão

Pelo apresentado, concluímos que o novo parâmetro de hepatometria em crianças é reprodutível por observadores diferentes, indicando que pode ser utilizado na determinação das dimensões do fígado em crianças e apresenta vantagens em relação ao parâmetro majoritariamente utilizado em outros métodos.

Presentemente estamos realizando estudo populacional para a determinação ultra-sonográfica dos valores normais do tamanho do fígado de crianças em idade pré-escolar na cidade de São Paulo (Brasil) aplicando o método testado.

Los autores no manifiestan "conflictos de interés"

BIBLIOGRAFÍA

1. Walker WA, Mathis RK. Hepatomegaly. *Pediatric Clin North Am*, v. 22, p. 929- 42, 1975.
2. Bricks LF, Kobinger ME, Raña W. Hepatoesplenomegalia In: Marcondes E. *Pediatric Básica 8ª ed.* São Paulo, Savier, 1991, p. 193-197.
3. Sullivan S, Krasner N, Williams R. The clinical estimation of liver size: a comparison of the techniques and an analysis of the source of error. *British Medical Journal*, v. 2, p. 1042-3, 1976.
4. Lawson EE, Grand RJ, Neff RK, Cohen LF. Clinical estimation of liver span in infants and children. *Am J Dis Child*, v. 132, p. 474-6, 1978.
5. Castell DO, O'Brien KD, Munch H, Chalmers T. Estimation of liver size by percussion in normal individuals. *Ann Intern Med*, v. 70, p. 1183-1189.
6. Younoszai MK, Mueller S. Clinical assesment of liver in normal children. *Clin Pediatr*, v. 14, p. 378-80, 1975.
7. Weisman LE, Cagle N, Mathis R, Merenstein GB. Clinical estimation of liver size in the normal neonate. *Clin Pediatr (Phila)*, v. 21, p. 596-598, 1982.
8. Carpentieri U, Gustavson LP, Leach TM, Bruce H. Liver size in normal infants and children. *South Med J*, v. 70, p. 1096-1097, 1977.
9. Deligeorgis D, Yannakos D, Panatou P, Doxiadis S. The normal borders of the liver in infancy and childhood - clinical and x-ray study. *Arch Dis Child*, v. 45, p. 702-704, 1970.
10. Walk L. Roengenologic determination of the liver volume. *Acta Radiol*, v. 55, p. 49-56, 1961.
11. Walk L. Assessment of liver size. *Digestion*, v. 1, p. 289-295, 1968.
12. Walk, L. Quantitative method to determine liver size. *Radiologe*, v. 18, p. 354- 355, 1978.
13. Walk L. Normal liver size as determined with quantitative methods. *Radiologe*, v. 22, p. 188-189, 1982.
14. Walk L. Liver size in children determined with quantitative methods. *Radiologe*, v. 25, p. 221-223, 1985.
15. Holder LE, Strife J, Padikal TN, Perkins PJ, Kereiakes JG. Liver size determination in pediatrics using sonographic and scintigraphic techniques. *Radiology*, v. 117, p. 349-53, 1975.
16. Markisz JA, Treves ST, Davis RT. Normal hepatic and splenic size in children: scintigraphic determination. *Pediatr Radiol*, v.17, p. 273-276, 1987.
17. Naftalis J, Leevy CM. Clinical estimation of liver size. *Am J Diag Dis*, v. 8, p. 236-243, 1963.
18. Peternel WW, Schaefer JW, Shiff L. Clinical evaluation of liver size and hepatic scintiscan. *Am J Dis Child*, v. 11, p. 346-50, 1966.
19. Rosenfield AT, Scheider PB. Rapid evaluation of hepatic size on radioisotope scan. *J Nucl Med*, v.15, p. 237-240, 1974.
20. Skrainka B, Stahlhut J, Fullbeck CL, Knight F, Holmes RA, Butt JH. Measuring liver span: bedside examination versus ultrasound and scintiscan. *J Clin Gastroenterol*, v. 8, p. 267-270, 1986.
21. Assadamongkol K, Phuapradit P, Udompanich O, Varavithya W. Liver size and serum alkaline phosphatase in normal Thai school - aged children. *J Med Assoc Thai*, v. 72, supplement 1, p. 88-93, 1989.
22. Baddeley H, Benson M, Liefman G, Singcharoen T et al. Measurements of liver volume using water delay ultrasonography. *Diagn Imag Clin Med*, v. 55, p. 330- 336, 1986.
23. Carr D, Duncan JG, Railton R, Smith CB. Liver volume determination by ultrasound: a feasibility study. *Br J Radiol*, v. 49,

- p. 776-778, 1976.
24. Chen CM, Wang JJ. Clinical and sonographic assessment of liver size in normal chinese neonates. *Acta Paediatr*, v. 82, p. 345-347, 1993.
 25. Dittrich M, Milde S, Dinkel E, Baumann W, Weitzel D. Sonografic biometry of liver and spleen in children. *Pediatr Radiol*, v. 13, p. 349-353, 1983.
 26. Friis H, Ndhlovu P, Mduluzi T et al. Ultrasonographic organometry: liver and spleen among children in Zimbabwe. *Trop Med Int Health*, v. 1, p. 183-190, 1996.
 27. Gosink BB, Leymaster CE. Ultrasonic determination of hepatomegaly. *J Clin Ultrasound*, v. 9, p. 37-41, 1981.
 28. Haddad-Zebouni S, Hindy R, Slaba S et al. Évaluation échographique de la taille des reins, du foie et de la rate chez l'enfant. *Arch Pédiatr*, v. 6, p. 1266-1270, 1999.
 29. Hessel G. Hepatometria na infância - comparação entre o método clínico e ultra - sonográfico. Campinas, 1991. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - SP.
 30. Holmes JH, Sundgren C, Ilke D, Finch J. A simple ultrasonic method for evaluating liver size. *J Clin Ultrasound*, v. 5, p. 89-91, 1977.
 31. Jungthirapanich J, Kaewtubtim J, Poovorawan Y. A new reference line for measuring the liver size in healthy newborns. *J Assoc Thai*, v. 81, p. 038-043, 1998.
 32. Kardel T, Holm HH, Rasmussen SN, Mortensen T. Ultrasonic determination of liver and spleen volumes. *Scand. J Clin Lab Invest*, v.27, p. 123-128, 1971.
 33. Konus Ö, Özdemir A, Akkaya A, Erbas G, Celik H, Isik S. Normal liver, spleen, and kidney dimensions in neonates, infants, and children: evaluation with sonography. *A J R*, v. 171, p. 1693-1698, 1998.
 34. Niederau C, Sonnenberg A, Müller JE, Erckenbrecht JF, Scholten T, Fritsch WP. Sonographic measurements of the normal liver, spleen, pancreas, and portal vein. *Radiology*, v. 149, p. 537-540, 1983.
 35. Phuapradit P, Assadamongkol K, Udompanich O, Varavithya W. Liver size and serum alkaline phosphatase in normal Thai school - aged children. *J Med Assoc Thai*, v. 69, suplement 2, p. 69-76, 1986.
 36. Rasmussen, S N. Liver volume determination by ultrasonic scanning. *Dan Med Bull*, v. 25, p. 1-46, 1978.
 37. Rylance GW, Moreland TA, Cowan MD, Clark DC. Liver volume estimation using ultrasound scanning. *Arch Dis Child*, v. 57, p. 283-286, 1982.
 38. Wladimiroff JW, Sekeris A. Ultrasonic assessment of liver size in the newborn. *J Clin Ultrasound*, v. 5, p. 316-320, 1977.
 39. Jones JH, Robinson PJ. Organ volume determination by CT scanning: reduction of respiration induced errors by feed back monitoring. *J Comput Assist Tomogr*, v. 10, p. 167-171, 1986.
 40. Rocha SMS, Oliveira IRS, Widman A, Chisman BSK, Fukushima JT, Oliveira LAN, Cerri GG. Hepatometria ultra-sonográfica em crianças (proposta de novo método). *Radiol Bras*, v.36, p. 63-70, 2003.