

DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL: UM NOVO TESTE PARA DIAGNÓSTICO DE FIBROSE CÍSTICA*NASAL POTENTIAL DIFFERENCE: A NEW TEST FOR CYSTIC FIBROSIS DIAGNOSIS*

Elenara da Fonseca Andrade Procianoy

RESUMO

Introdução: Fibrose Cística (FC) é uma doença cujo diagnóstico é essencialmente clínico, confirmada por dosagem de cloro no suor acima de 60 mEq/L e/ou identificação das mutações do CFTR causadoras da doença nos dois alelos. Casos atípicos necessitam ser investigados através do exame da diferença de potencial nasal (DPN). Na FC a DPN é mais negativa, há maior despolarização com o amiloride e pouca resposta ao isoproterenol.

Objetivo: Determinar os valores da DPN para portadores de FC e grupos controle.

Métodos: A DPN foi medida em 24 portadores de FC, 19 portadores de outras doenças não FC e 18 saudáveis e foram determinadas a média e desvio-padrão da DPN máxima, Δ amil, ΔCl , Δiso , ΔCl , $\Delta\text{amil+iso}$ e index DPN.

Resultados: A média da DPN máxima foi -32 mV no grupo FC, -14 mV no grupo Não FC e -16 mV no grupo Sadio ($P < 0,0001$). No grupo FC a média do Δ amil foi -18 mV, no grupo Não FC -6 mV e no grupo Sadio -7mV ($P < 0,0001$). No grupo FC a média do ΔCl foi 4mV, 17mV no grupo Não FC e 11mV no grupo Sadio. A média do index Δ amil + iso foi -16mV e o index DPN foi 0,85 no grupo FC, comparado com -0,6 mV e 0,26 no grupo Não FC e -2mV e 0,23 no grupo Sadio.

Conclusões: O teste da DPN pode claramente diferenciar o grupo FC, com valores semelhantes aos descritos na literatura, possibilitando seu emprego futuro como teste diagnóstico complementar nos casos atípicos de FC.

Palavras-chave: Fibrose cística; canal de cloro; diferença de potencial

ABSTRACT

Background: Cystic Fibrosis (CF) is a disease whose diagnosis is essentially clinical, confirmed by measurement of sweat chloride above 60mEq / L and / or identification of CFTR mutations that cause disease in two alleles. Atypical cases need to be investigated by the nasal potential difference test (NPD). In CF the NPD is more negative, there is increased depolarization with amiloride (Δ amil) and a poor response to the isoproterenol (Δ iso).

Aim: To determine the values of NPD for CF patients and control groups.

Methods: DPN was measured in 24 CF patients, 19 carriers of other diseases non-CF and 18 healthy and the mean plus standard deviation of NPD maximum, Δ amyl, ΔCl , Δiso , ΔCl , Δ amil+iso and index NPD were determined.

Results: NPD maximum in the FC group was -32 mV, -14 mV In the non-CF and -16mV in healthy group ($p < 0.0001$). In the CF group the mean Δ amil was -18mV, -6mV in the non-FC group and -7mV in healthy ($p < 0.0001$). The ΔCl mean was 4mV in CF group, 17mV in non-CF and 11mV in healthy. The average of the index Δ amil+iso was -16mV and DPN index was 0.85 in FC group compared with -0.6 mV and 0.26 in non-CF and -2mV, and 0.23 in healthy.

Conclusions: The test of DPN can clearly distinguish the CF group, with values similar to those described in the literature, enabling their future use as a complementary diagnostic test in atypical cases of CF.

Keywords: Cystic fibrosis, chloride channel, potential difference

Rev HCPA 2011;31(2):125-130

O teste da medida da diferença de potencial nasal (DPN) mede *in vivo* a diferença de potencial existente entre o lado interno e externo da célula epitelial da mucosa nasal, o qual é comparável a diferença de potencial da mucosa brônquica (1,2). O valor encontrado relaciona-se ao transporte de íons através da membrana celular, em especial os íons sódio (Na^+) e cloro (Cl^-), sendo o lado mucoso mais negativo em relação ao interior celular. Valores normais situam-se em torno de -20 mV. Na fibrose cística (FC) o transporte do Cl^- afetado pelo defeito no canal CFTR (*Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator*) e a hiperabsorção do Na^+ pelos canais ENaC geram uma DPN mais negativa, cerca de duas vezes os valores normais. Esta característica tornou possível diferenciar os portadores de FC dos normais,

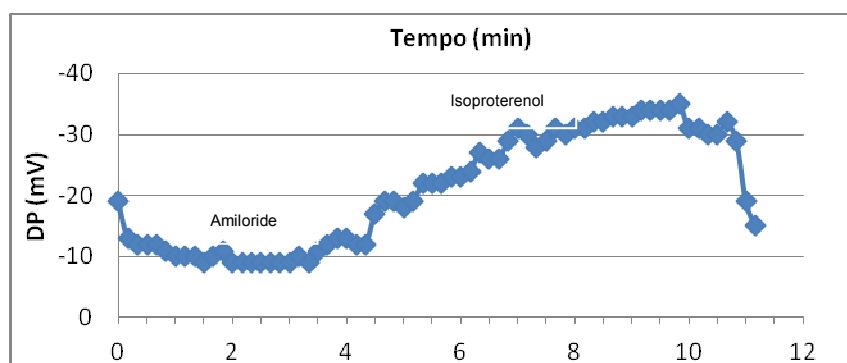
dos heterozigotos para mutações da FC e dos portadores de outras doenças respiratórias de forma que a medida da DPN passou a ser utilizada como um teste complementar no diagnóstico de FC (3).

O diagnóstico de FC é baseado em características clínicas distintas e dosagem de cloro no suor elevada ou identificação das mutações conhecidas da FC nos dois alelos. Considera-se elevada a dosagem de Cl^- no suor acima de 60 mEq/L e normal abaixo de 40 mEq/L. Valores entre 40 e 60 mEq/L são considerados limítrofes e deverão ser repetidos. A identificação das mutações associadas à FC em cada um dos genes da CFTR através de técnicas de biologia molecular pode concluir o diagnóstico, quando associado ao contexto clínico. Entretanto, o grande número de mutações descritas (mais de

1800), muitas com potencial patogênico incerto, e a variabilidade da frequência e distribuição das mutações entre populações diferentes dificultam seu uso. Desta forma, achado de uma ou nenhuma mutação no gene CFTR não exclui FC. Nestes casos, a determinação da anormalidade do transporte de íons mediado pelo CFTR através do exame da DPN é fundamental (4,5). Os achados esperados nos portadores de FC

são: DPN mais negativa, despolarização maior do potencial em resposta à perfusão do epitélio com uma solução contendo amiloride, droga bloqueadora do canal de Na^+ , e ausência ou menor hiperpolarização do potencial em resposta ao estímulo da secreção do Cl^- com o uso de potencializadores do AMPcíclico, como o isoproterenol (6) (figura 1).

a)



b)

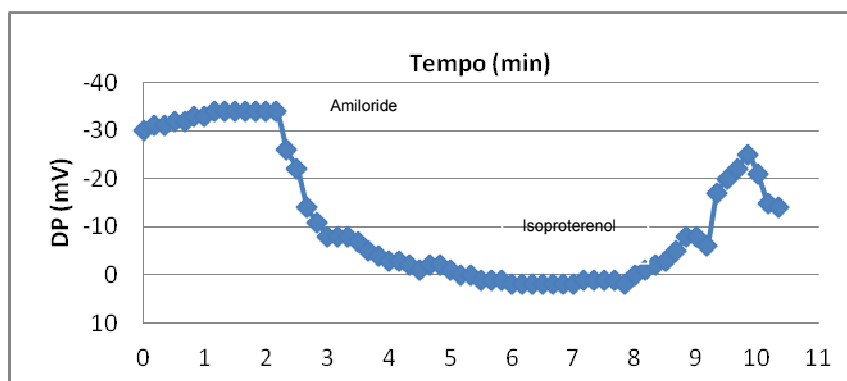


Figura 1- Curvas de resposta da DPN. 1a) curva normal; 1b) curva FC

As técnicas para realização da DPN diferem entre os centros. Tentativas para padronização do teste foram publicadas em 2004, com orientações quanto ao equipamento utilizado, drogas e soluções instiladas, técnica do exame e interpretação dos resultados da DPN (7,8). Entretanto, a maioria dos centros que realiza os testes incorporaram modificações sugeridas na literatura para adaptarem-se às condições locais, propiciar mais conforto ao paciente e praticidade ao executor do exame (9,10), mantendo a reprodutibilidade do método. O método clássico da medida da DPN utiliza o eletrodo de referência posicionado no tecido subcutâneo, enquanto os métodos modificados o utilizam sobre uma área da pele após remoção da camada córnea (escarificação). O método clássico posi-

ciona o paciente sentado para que as soluções instiladas na narina escoem para fora em um recipiente posicionado abaixo do seu queixo. O método modificado posiciona o paciente em posição reclinada para que as soluções instiladas na narina em fluxo reduzido possam ser deglutidas pelo paciente, sendo mais confortável para o paciente e mais higiênica. Ambos os métodos utilizam a perfusão sequencial de soluções eletrolíticas e com drogas para avaliação da resposta dos canais de sódio (ENaC) e do cloro (CFTR) aos diferentes estímulos (6).

Com o objetivo de determinar os valores e comparar os resultados realizamos a medida da DPN em pacientes portadores de FC e dois grupos controle: grupo de portadores de outras patologias e grupo de normais.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal onde a DPN foi medida em três grupos: I) grupo FC; II) grupo controle com doença (Não FC) e III) grupo controle sadio (Sadio). No grupo FC, foram incluídos pacientes em acompanhamento no ambulatório de FC do HCPA com diagnóstico estabelecido por critérios clínicos, dosagem de eletrólitos no suor elevada e/ou pesquisa genética positiva. No grupo Não FC foram incluídos pacientes em acompanhamento no HCPA por outras patologias, os quais haviam realizado dosagem de eletrólitos no suor para investigação diagnóstica com valores negativos. No grupo controle foram incluídos voluntários sem sintomas sugestivos da doença.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA e registrado no Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação sob nº 05-125. Todos os incluídos assinaram termo de consentimento por escrito. Não houve limite de idade, embora os testes tenham sido preferentemente realizados em maiores de seis anos, por razões práticas. Foram excluídas pessoas com rinite alérgica sintomática, polipose nasal, cirurgia nasal prévia ou que tiveram infecção viral das vias aéreas nas duas semanas anteriores. Testes que não obtiveram qualidade técnica foram excluídos da análise.

A técnica utilizada foi descrita por Leal (9).

Equipamento

Utilizou-se um voltímetro de alta impedância (10^8 a $10^{12} \Omega$) com capacidade de armazenagem para 100 dados (Knick Portamess 913[®], Elscolab) e eletrodos de Ag/AgCl. O voltímetro foi configurado para registro das leituras a cada 10 segundos. As medidas foram transferidas a um computador através de um cabo e armazenadas em um *software* específico do voltímetro. Para escarificação cutânea foi montado um aparelho portátil com uma broca dentária de ponta de diamante acoplada a um motor manual. O eletrodo de referência foi posicionado sobre a área escarificada com uma pequena camada de creme condutor (Signa Creme[®] Electrode Cream, Parker Laboratories Inc). O eletrodo de medida foi posicionado dentro do canal maior de uma sonda de Foley (Sonda Foley Siliconizada Rush Gold) que foi preenchida pelo mesmo creme condutor. A ponta desta sonda foi inicialmente posicionada abaixo da porção anterior do corneto nasal inferior e progredida para dentro da narina até obtenção do valor mais elevado da DPN. Este valor foi considerado como DPN máximo.

Soluções e drogas

As soluções eletrolíticas foram preparadas de forma padrão com os seguintes constituintes: solução A (solução com Cl⁻): NaCl 115,2 mM,

CaCl₂.6H₂O 1,2 mM, MgCl₂.6H₂O 1,2 mM, K₂HPO₄ 2,4 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM e NaHCO₃ 25 mM; solução B (solução sem Cl⁻): NaGluconato 115,2 mM, CaGluconato 1,2 mM, MgSO₄.7H₂O 1,2 mM, K₂HPO₄ 2,4 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM e NaHCO₃ 25 mM. O pH das soluções foi ajustado para 7,4, podendo variar entre 7 e 7,6. Amiloride a 100 μ M foi acrescentada à solução A e B e isoprenalina na dose de 10 μ M à solução B. As soluções foram mantidas em banho-maria para manter uma temperatura aproximada de 37°C. Após estabilização da DPN máxima as soluções foram instiladas na seguinte ordem: 1^o) solução A pura (solução A1); 2^o) solução A com amiloride (solução A2); 3^o) solução B com amiloride (solução B1) e 4^o) solução B com amiloride e isoproterenol (solução B2). As soluções foram instiladas na narina através da segunda via da sonda de Foley que estava acoplada à sonda. O fluxo utilizado foi 3ml/minuto e controlado por bomba de infusão. Cada fase durou aproximadamente 3 minutos. As soluções acumuladas na orofaringe do paciente podiam ser deglutidas, sendo que nestas doses os medicamentos são inteiramente desprovidos de qualquer efeito farmacológico ou tóxico sistêmico. Sempre que possível, as duas narinas foram examinadas.

As seguintes medidas da DPN foram registradas: (1) DPN máxima; (2) DPN basal: valor estável ao término da infusão da solução A1; (3) DPN pós-amiloride: DPN ao término da infusão da solução A2; (4) DPN pós-zero cloro: DPN ao término da solução B1; e (5) DPN pós-isoproterenol: DPN ao término da solução B2. Os valores do delta amiloride (Δ amil), delta zero cloro (Δ ØCl) e delta zero cloro+isoproterenol (Δ iso) foram calculados através da subtração dos valores. O delta cloro (Δ Cl) foi calculado pela soma do Δ ØCl + Δ iso. O valor do delta amiloride-isoproterenol (Δ amil + Δ iso) foi calculado pela soma dos valores. O índice DPN foi calculado pela fórmula = $e^{\frac{\Delta Cl}{\Delta amil}}$ (11).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada com o programa SPSS. Valores da média e desvio padrão (DP) foram calculados para todos os parâmetros da DPN: DPN máxima, Δ amil, Δ ØCl, Δ iso, Δ Cl, Δ amil+iso e índice DPN para cada grupo. Comparação entre os três grupos foi realizada separadamente para cada parâmetro usando métodos de comparação para um nível de significância de 0,05. Para comparações múltiplas, foi realizada análise de variância com o teste de Bonferroni.

RESULTADOS

Foram realizados testes em oitenta pacientes. Dez pacientes não foram incluídos: quatro por presença de alterações da mucosa nasal,

quatro por dificuldades técnicas durante a execução do exame e dois por não terem concluído o teste. Oito testes foram repetidos (um no grupo FC, dois no grupo Não FC e cinco no grupo Sadio). No grupo FC foram realizados trinta e nove testes em vinte e quatro pacientes (14 femininos: 10 masculinos; idade de 3 meses a 28 anos) - quatorze pacientes realizaram o teste nas duas narinas; dez em uma narina. No grupo Não FC foram realizados trinta e sete testes em dezenove pacientes (6 femininos:13 masculinos; idade de 4 a 97 anos) - dezesseis pacientes realizaram o teste nas duas narinas; três em uma narina. As doenças apresentadas neste grupo foram: bronquiolite obliterante: sete; cirrose: um; asma: um; hipotireoidismo: um; baixo peso: dois; diarreia crônica: seis e bronquiectasias: um. Um paciente com baixo peso e um paciente com diarreia crônica repetiram o exame. No grupo Sadio foram incluídos dezoito

pacientes (7 femininos:11 masculinos; idade de 5 a 33 anos), sendo realizados trinta e oito testes - quatorze pacientes realizaram o teste nas duas narinas; quatro pacientes realizaram em uma narina. O teste foi relativamente bem tolerado pelos pacientes, embora houvesse queixas sobre o gosto das soluções e um paciente tenha apresentado vômitos ao final do exame.

A média dos valores da DPN máxima foi -32 mV no grupo FC, -14 mV no grupo Não FC e -16 mV no grupo Sadio, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos FC e os controles Não FC e Sadios ($P < 0,0001$). Houve uma pequena sobreposição entre os grupos, mas nenhum controle apresentou valor acima de -30 mV. Quatro pacientes no grupo FC apresentaram DPN máxima abaixo de -20 mV (tabela 1).

Tabela 1 – Diferença de Potencial máxima e respostas às soluções (Δ) em portadores de fibrose cística (FC), portadores de doenças não fibrose cística (Não FC) e sadios (Sadios) - média \pm DP

	FC	Não FC	Sadios
N	39	37	38
Idade	3 meses a 28 anos	4 a 97 anos	5 a 33 anos
Patologias		BO, asma, cirrose, hipotireoidismo, baixo peso, diarreia crônica, bronquiectasias	
DPN*	-32 \pm 9	-14 \pm 4	-16 \pm 5
Δ amil*	-18 \pm 8	-6 \pm 4	-7 \pm 4
$\Delta\emptyset$ Cl*	3 \pm 5	11 \pm 8	7 \pm 7
Δ iso*	0,5 \pm 5	5 \pm 3	4 \pm 3
Δ Cl*	4 \pm 5	17 \pm 9	11 \pm 7
Δ amil + iso*	-16 \pm 10	-0,6 \pm 4	-2 \pm 5
Index DPN*	0,85 \pm 0,23	0,26 \pm 0,92	0,23 \pm 0,20

DPN: Diferença de potencial nasal; amil: amiloride; \emptyset Cl: zero cloro; iso: isoproterenol; Cl: cloro; BO: Bronquiolite obliterante. * $P < 0,0001$

Os valores do Δ amil e Δ Cl também foram estatisticamente diferentes no grupo FC ($P < 0,0001$). O Δ amil reflete a maior despolarização da DPN devido ao bloqueio da absorção aumentada de sódio pelo amiloride existente nos portadores de FC. No grupo FC a media foi -18 mV, no grupo Não FC -6 mV e no grupo Sadio -7 mV. Os valores do Δ Cl representam a hiperpolarização secundária ao movimento do Cl⁻ através da membrana apical das células do epitélio respiratório. No epitélio normal, este valor aumenta após indução de um gradiente elétrico ou químico nas células, através da per-

usão com soluções isentas de Cl⁻, na presença de amiloride, seguida de perfusão com agentes que aumentam o AMPc, como o isoproterenol. Nos portadores de FC, ao contrário, a hiperpolarização é menor ou não ocorre devido ao defeito do canal CFTR. Estes valores se relacionam com a gravidade do acometimento da função do canal. No grupo FC a resposta média foi 4 mV, 17 mV no grupo Não FC e 11 mV no grupo Sadio.

Wilschanski et al. (11) descreveram dois novos parâmetros que consideram tanto o transporte de Na⁺ quanto do Cl⁻ na diferença de po-

tencial para melhor diferenciação entre os casos de FC atípica e não fibrocísticos: index Δ amil + Δ iso e o index DPN. Entre os dois, o index DPN teve um poder maior sendo estabelecido valor $>$ de 0,70 para FC. No nosso estudo, ambos os indexes foram significativamente diferentes. A média do index Δ amil + Δ iso foi -16mV e o index DPN foi 0,85 no grupo FC, comparado com -0,6mV e 0,26 no grupo Não FC e -2 mV e 0,23 no grupo Sadio. Considerando o limite de 0,70 para o index DPN os nossos resultados mostraram uma sensibilidade de 92% e especificidade de 96%, as quais já estão presentes desde o index DPN=0,50.

Os parâmetros analisados foram semelhantes aos descritos em outros estudos, embora com valores inferiores (tabela 2).

Tabela 2 - Valores da DPN (mV) para FC no HCPA e nos estudos de Wilschanski e Standaert.

	HCPA	Wilschanski	Standaert
DPN	-32 \pm 9	-43 \pm 2	-45 \pm 11
Δ amil	-18 \pm 8	-26 \pm 2	30 \pm 11
$\Delta\emptyset$ Cl	3 \pm 5	5 \pm 1	2 \pm 2
Δ iso	0,5 \pm 5	1 \pm 1	1 \pm 2
Δ Cl	4 \pm 5	ND	3 \pm 3
Δ amil + iso	-16 \pm 10	-25 \pm 2	ND
Index DPN	0,85 \pm 0,23	0,83 \pm 0,04	ND

DPN: Diferença de potencial nasal; amil: amiloride; \emptyset Cl: zero cloro; iso: isoproterenol; Cl: cloro; ND: não determinado

DISCUSSÃO

Os valores do teste da DPN obtidos puderam claramente diferenciar os grupos. Considerando-se as características descritas para a FC, obtivemos DPN máxima mais negativa ($P < 0,0001$), em geral acima de -30 mV, resposta exagerada ao amiloride em valores absolutos ($P < 0,0001$), em geral maior de -10 mV, e resposta ausente ou menor ao isoproterenol ($P < 0,0001$). Esta é uma análise inicial dos nossos dados, a qual deve ser concluída assim que obtivermos os resultados da análise genética dos císticos, para proceder às correlações entre fenótipo, genótipo e DPN. Até o momento, somos um dos poucos centros no Brasil a realizar o teste da DPN.

O teste da medida da diferença de potencial mede a situação fisiológica *in vivo* do gradiente eletroquímico no epitélio em estudo. Ao ser realizado na narina, torna-se mais acessível. Porém, existem limitações como, por exemplo, a

alta variabilidade dos resultados entre os diferentes centros. Importantes considerações técnicas devem ser levadas em conta, como aparelhos validados e bem calibrados e soluções padronizadas (7,12,13). A temperatura e o pH das soluções testadas têm que ser controladas (14). O fato de ser realizado sem qualquer anestesia tópica ou sedação sistêmica, dificulta que seja realizado em crianças menores ou pacientes pouco colaborativos. Presença de patologia nasal, tal como rinite alérgica ou polipose nasal, mesmo quando pouco sintomática, dificulta a tolerância do paciente à introdução da sonda na narina, além de poder gerar resultados falso-negativos. Entretanto, tem a vantagem de ser um exame seguro, ter um custo inferior a uma pesquisa genética mais ampla e poder ser interpretado no momento da realização do exame.

A aplicação do teste da DPN tem sua maior importância no contexto da FC. O teste é dinâmico e representa um excelente complemento diagnóstico nos casos de FC atípicos com várias dosagens de eletrólitos no suor de valores intermediários e pesquisa de mutações do gene CFTR pouco esclarecedoras. Ao conseguir avaliar a função do canal de Cl⁻, o teste assume outro papel importante: identifica pacientes portadores de mutações no CFTR com função residual do canal, o que pode estar relacionado ao melhor prognóstico e possibilidade de tratamento com potencializadores ou corretores do CFTR ou mesmo sua reposição, como é o caso da terapia gênica. Atualmente, esta tem sido a área de maior interesse da aplicação do teste da DPN nos centros mais desenvolvidos.

Outras condições associadas ao CFTR, como a agenesia bilateral dos vasos deferentes, pancreatite recorrente e aspergilose broncopulmonar alérgica puderam ser mais bem compreendidas com a aplicação do teste da DPN.

Em conclusão, a realização deste estudo foi importante para identificação dos valores dos parâmetros do teste da DPN no grupo de portadores de FC já diagnosticados do HCPA e nos indivíduos normais ou com outras patologias. A partir de agora, sua aplicação como teste diagnóstico complementar nos casos atípicos torna-se possível, preenchendo uma grande lacuna existente na prática de atendimento destes pacientes, para no futuro podermos identificar e oferecer os novos tratamentos com fins curativos da FC no nosso meio.

Agradecimentos

À Dra Teresinha Leal pelo ensinamento da técnica do exame da DPN.

À Dra Ticiania Rodrigues pelo auxílio com a análise estatística.

Ao FIPE do HCPA pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1981; 305:1489-95.
2. Davies JC, Davies M, McShane et al. Potential Difference Measurements in the lower airway of children with and without cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:1015-9.
3. Delmarco A, Pradal U, Cabrini G, Bonizzato A, Mastella G. Nasal potential difference in cystic fibrosis patients presenting borderline sweat test. *Eur Respir J.* 1997;10:1145-9.
4. Rosenstein B.J et al. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr.* 1998;132:589-95.
5. Alton E.W.F.W et al. Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 1990;3:922-6.
6. Middleton P.G, Geddes D.M., Alton E.W.F.W. Protocols for in vivo measurement of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium. *Eur Respir J.* 1994;7:2050-6.
7. Standaert T.A et al. Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: an outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatr Pulmonol.* 2004;37:385-92.
8. Schuler D et al Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2004;151-5.
9. Leal T, Lebacq J, Lebecque, Cumps J, Wallemacq P. Modified method to measure nasal potential difference. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(1):81-7.
10. Alton E.W.F.W et al. Bioelectric properties of cystic fibrosis airways obtained at heart-lung transplantation. *Thorax,* 1992; 47:1010-4.
11. Wilschanski, Famini H, Strauss-Liviatan N et al. Nasal potential difference in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2001; 17:1208-15.
12. Ahrens R.C et al. Use of nasal potential difference and sweat chloride as outcome measures in multicenter clinical trials in subjects with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2002;33:142-50.
13. Hoffmann T et al. Conventional and modified nasal potential difference measurement in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;133:1908-33.
14. Boyle M.P et al. A multicenter study of the effect of solution temperature on nasal potential difference measurements. *Chest.* 2003;124:452-89.

Recebido: 01/06/2011

Aceito: 06/07/2011