

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
PNEUMOLÓGICAS

ELENARA DA FONSECA ANDRADE PROCIANOY

TESTE DA MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL
TRANSEPITELIAL

Porto Alegre

2014

ELENARA DA FONSECA ANDRADE PROCIANOY

TESTE DA MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL TRANSEPITELIAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutora em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Abreu e Silva

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

da Fonseca Andrade Procianoy, Elenara
Teste da Medida da Diferença de Potencial Nasal
Transeptelial / Elenara da Fonseca Andrade
Procianoy. -- 2014.
144 f.

Orientador: Fernando Antônio Abreu e Silva.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-
RS, 2014.

1. fibrose cística. 2. epitélio nasal. 3.
transporte de íons. I. Abreu e Silva, Fernando
Antônio, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ATA Nº 920

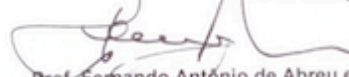
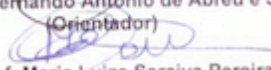
De acordo com o estabelecido previamente pela Comissão de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, realizou-se no dia três de outubro do ano de dois mil e quatorze, no Auditório Mario Rigatto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, das 14h. às 18h., a apresentação, arguição e defesa da Tese de Doutorado da Aluna Elenara da Fonseca Andrade Procianoy, intitulada " Teste da Medida da Diferença de Potencial Nasal Transepitelial". A Banca Examinadora foi presidida pelo Professor Fernando Antônio de Abreu e Silva, orientador da Doutoranda, e integrada pelos Professores Sérgio Luis Amantéa, da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Maria Luiza Saraiva Pereira e Paulo de Tarso Roth Dalcin, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Como de regulamento, no início da sessão, a autora dispôs de 60 minutos para expô-la, sendo, a seguir, argüido pelos membros da Banca Examinadora, à exceção do presidente, cabendo-lhe, após cada arguição, o tempo necessário para responder. Ao término da sessão foram enunciados os conceitos conferidos pelos examinadores:


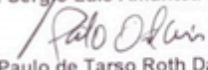
Prof. Sérgio Luis Amantéa
Profª Maria Luiza Saraiva Pereira
Prof. Paulo de Tarso Roth Dalcin

A
A
A

Foi franqueada à numerosa platéia a possibilidade de dirigir perguntas à autora, ao final de sua arguição pelos integrantes da Banca Examinadora, possibilidade essa que não chegou a ser utilizada.

Porto Alegre, 03 de outubro de 2014.


Prof. Fernando Antônio de Abreu e Silva
(Orientador)

Prof. Maria Luiza Saraiva Pereira


Prof. Sérgio Luis Amantéa

Prof. Paulo de Tarso Roth Dalcin

Aos meus pais e avós

In memoriam

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para realização deste projeto.

... ao meu orientador Professor Dr. Fernando Antônio de Abreu e Silva, minha grande inspiração como médico, professor e ser humano, capaz de mover montanhas por seus pacientes, alunos e colegas. Dono de uma cultura imensa e tamanha sensibilidade, soube me apoiar e incentivar na realização deste projeto, respeitando meu tempo e disponibilidade.

... ao meu marido Jairo pelo constante incentivo, apoio, amor e carinho incondicionais.

... ao meu doce filho Felipe pelas horas a menos de brincadeiras e “sessões de cinema”.

... à Dra. Teresinha Leal por ter me recebido no seu Laboratório de Química Especial da *Universite Catholique de Louvain - Cliniques Universitaires Saint-Luc*, em Bruxelas, Bélgica, e ter, inclusive, me hospedado em sua casa durante o treinamento prático da técnica de execução da diferença de potencial nasal.

... aos meus colegas da equipe de Pneumologia Infantil do Hospital de Clinicas de Porto Alegre pelo apoio durante a implementação e realização deste projeto.

... aos colegas médicos Bruno Rocha de Macedo, Joanine Andriguetti Sotilli e Juliana Szymanski que, enquanto acadêmicos, auxiliaram na realização dos testes e na coleta de dados dos pacientes.

... aos médicos residentes, estagiários, doutorandos e estudantes que aceitaram participar deste estudo como casos controle. Sem eles este projeto não teria sido possível.

... aos queridos pacientes que confiaram em mim e participaram deste estudo.

... ao Professor Dr. Paulo Dalcin por ter apoiado a participação dos seus pacientes adultos do ambulatório de Fibrose Cística do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

.. ao Professor Dr. Pedro Eduardo Fröhlich e ao pessoal do Laboratório de Produção de Padrões Secundários da Faculdade de Farmácia da UFRGS (LAPPS), em especial à farmacêutica Sirlei, pela manipulação e padronização das soluções eletrolíticas e solução de amiloride utilizadas neste projeto.

... ao Professor Mario Wagner e estatística Marilyn Agranonik pelas inúmeras consultas para análise estatística.

... ao pessoal do Serviço de Farmácia do HCPA, em especial à secretária Mery Rose, sempre muito gentil, pelo pronto fornecimento das ampolas de isoprenalina.

... às fontes financiadoras FIPE-HCPA e Empresa United Medical, pelos recursos cedidos a este projeto.

Enfim, a todos que acreditaram no potencial deste estudo e que incentivaram a sua realização, levando em consideração sua posterior aplicação na difícil tarefa de informar ao paciente e sua família a respeito do diagnóstico de Fibrose Cística.

RESUMO

O teste da diferença de potencial nasal (DPN) é um exame que mede a diferença bioelétrica através do epitélio nasal, a qual resulta do transporte iônico transepitelial dos íons sódio (Na^+), pelo canal ENaC (*Epithelial Na^+ Channel*), e cloro (Cl^-), pelo canal CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). DPN tem sido utilizada como teste de auxílio diagnóstico em doenças associadas à disfunção do CFTR, como a Fibrose Cística (FC). FC é uma doença genética autossômica recessiva causada por mutações que afetam o funcionamento do canal CFTR (e secundariamente do ENaC) e levam a manifestações em diversos órgãos. Normalmente a dosagem de cloro no suor acima de 60 mEq/L ou a identificação de mutações nos dois alelos confirmam diagnóstico de FC. Porém, existem casos atípicos com exames considerados inconclusivos onde as características eletrofisiológicas decorrentes da disfunção do CFTR devem ser demonstradas para estabelecimento do diagnóstico. A identificação correta destes casos é importante para instituição do tratamento adequado e definição do prognóstico. O objetivo principal deste trabalho foi padronizar a técnica da DPN para sua futura aplicação como ferramenta diagnóstica através da determinação dos seus valores de referência, de sensibilidade, de especificidade e de concordância entre os resultados das duas narinas. Secundariamente, objetivamos analisar as relações entre a presença de função residual do CFTR e a concentração de cloro no suor, fenótipo pancreático, presença de *Pseudomonas aeruginosa*, função pulmonar e genótipo na amostra de pacientes com FC. Foi realizado um estudo transversal com realização da DPN em um grupo de pacientes com FC (n=29, idade: 15±6 anos) e dois grupos controle: não-FC (n=19, idade: 15 ± 10 anos) e sadios (n=19, idade: 17 ± 8 anos). Os resultados demonstraram que os valores da DPN são significativamente diferentes no grupo FC (FC: DPNmax: $-34 \pm 9\text{mV}$, Δamil : $-20 \pm 9\text{mV}$, ΔCl : $4 \pm 5\text{mV}$, $\Delta\text{amil-iso}$: $-19 \pm 9\text{mV}$ e índiceDPN: 0.85 ± 0.23 ; não-FC: DPNmax: $-14 \pm 5\text{mV}$, Δamil : $-6 \pm 3\text{mV}$, ΔCl : $17 \pm 9\text{mV}$, $\Delta\text{amil-iso}$: $-1 \pm 4\text{mV}$ e índiceDPN: 0.11 ± 0.11) e sadios: DPNmax: $-15 \pm 4\text{mV}$, Δamil : $-6 \pm 3\text{mV}$, ΔCl : $11 \pm 7\text{mV}$, $\Delta\text{amil-iso}$: $-2 \pm 4\text{mV}$ e índiceDPN: 0.20 ± 0.14), com sensibilidade e especificidade de 95-96% e concordância de resultado entre as duas narinas maior para a DPNmax ($r=0,934$). A função residual da CFTR não mostrou relação com nenhum dos parâmetros fenotípicos avaliados. Somente mostrou relação com a gravidade do genótipo.

Entretanto, foi observada relação entre os parâmetros que avaliam a hiperfunção do ENaC existente na FC e o fenótipo. Concluímos com este trabalho que foi possível reproduzir e padronizar esta técnica da DPN e demonstrar que o fenótipo da FC está mais relacionado à alteração do transporte do íon sódio através do ENaC do que à presença de função residual da CFTR.

Palavras-chave: Diferença de potencial nasal. Fibrose cística. Fibrose cística atípica. CFTR. ENaC

ABSTRACT

Nasal potential difference test (NPD) is a test that measures the bioelectrical difference across the nasal epithelium, which results from transepithelial ion transport of sodium (Na^+), by ENaC channels (Epithelial Na^+ Channel) and chloride (Cl^-), by CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). NPD has been used as a diagnostic tool in CFTR related disorders, such as Cystic Fibrosis (CF). CF is an autosomal recessive genetic disease caused by mutations that affect the function of the CFTR channel (and secondarily of the EnaC) and lead to manifestations in various organs. Normally sweat chloride concentration $> 60 \text{ mEq / L}$ and identification of two CFTR mutations confirm the CF diagnosis. However there are atypical cases with inconclusive sweat chloride or genetic where the electrophysiological characteristics induced by CFTR dysfunction has to be demonstrated for diagnosis. The correct identification of these cases is important for institution of appropriate treatment and definition of prognosis. The objective of this study was to standardize the NPD for its future application as a diagnostic tool through the determination of reference values, sensibility and specificity and agreement of the results between both examined nostrils. Secondarily, we analyzed the relations between residual CFTR function and sweat chloride concentration, pancreatic phenotype, *Pseudomonas aeruginosa* positivity, pulmonary function and genotype in the sample of CF patients. It was a transversal study where the NPD was measured in a group of CF patients ($n = 29$, age: 15 ± 6 years) and two control groups: non-CF ($n = 19$, age: 15 ± 10 years) and healthy ($n = 19$, age: 17 ± 8 years). The results showed that NPD was significantly different in CF (NPDmax: $-34 \pm 9 \text{ mV}$, Δamil : $-20 \pm 9 \text{ mV}$, ΔCl : $4 \pm 5 \text{ mV}$, $\Delta\text{amilo-iso}$: $-19 \pm 9 \text{ mV}$ e NPDindex: 0.85 ± 0.23 ; non-CF: NPDmax: $-14 \pm 5 \text{ mV}$, Δamil : $-6 \pm 3 \text{ mV}$, ΔCl : $17 \pm 9 \text{ mV}$, $\Delta\text{amilo-iso}$: $-1 \pm 4 \text{ mV}$ and NPDindex: 0.11 ± 0.11) and healthy: NPDmax: $-15 \pm 4 \text{ mV}$, Δamil : $-6 \pm 3 \text{ mV}$, ΔCl : $11 \pm 7 \text{ mV}$, $\Delta\text{amilo-iso}$: $-2 \pm 4 \text{ mV}$ and NPDindex: 0.20 ± 0.14) with sensibility and specificity of 95-96% and agreement between both nostrils greater for NPDmax ($r=0.934$). The residual CFTR function did not show relation with all phenotypic parameters evaluated. It just showed relation with genotype severity. Indeed it was observed a relation between the parameters that assess the ENaC hyperfunction that occurs in CF and the phenotype. We concluded with this study that was possible to reproduce and to standardize the NPD and to demonstrate that the phenotype is

more related to sodium transport alterations through ENaC than to the presence of residual CFTR function.

Keywords: Nasal potential difference. Cystic fibrosis. Atypical cystic fibrosis. CFTR. ENaC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático sobre o potencial de membrana e transporte de íons no epitélio respiratório.....	26
Figura 2. Traçados da DPN em normais e portadores de FC.....	27
Figura 3. Modelo do transporte de eletrólitos no epitélio da via aérea normal e com FC	31
Figura 4. Localização e estrutura propostas da glicoproteína de membrana <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> (CFTR).....	33
Figura 5. Ilustração da biossíntese normal da proteína CFTR.....	36
Figura 6. Ilustração das seis classes de mutações CFTR.....	39
Figura 7. Algoritmo de diagnóstico estruturado proposto pelo Grupo Europeu sobre Diagnóstico de FC.....	63
Figura 8. Material e técnica do Teste da Medida da DPN no HCPA	83

FIGURAS DO ARTIGO 1

Figure 1 – Box plot for the different NPD parameters in cystic fibrosis (CF), non cystic fibrosis (non-CF) and healthy groups.	96
Figure 2 – Scatter diagram for correlation between right and left nostril values of nasal potential difference and Bland-Altan plots for distribution of differences between both nostrils and mean	97

FIGURAS DO ARTIGO 2

Figure 1. Box plot showing NPD and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> respiratory culture	113
Figure 2. Box plot showing NPD in three genotype groups	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Manifestações clínicas sugestivas de fibrose cística	62
Tabela 2 - Composição da solução de base (solução A1)	84
Tabela 3 - Composição da solução sem cloro (solução B1)	84
Tabela 4 - Medidas de referência da DPN no HCPA	124
Tabela 5 . Comparação entre os parâmetros da DPN no HCPA e publicados por Leal et. al e Bienvenu et al.	125

TABELAS DO ARTIGO 1

Table 1 – Subjects characteristics	93
Table 2 – Nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients and control groups	95
Table 3 – NPD parameters for CF diagnosis)	95

TABELAS DO ARTIGO 2

Table 1 – Clinical and genotype data of the CF patients	112
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

DPN	Diferença de Potencial Nasal
Na ⁺	Sódio
Cl ⁻	Cloro
ENaC	<i>Epithelial Na⁺ Channel</i> (canal epitelial de sódio)
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> (Regulador da Condutância Transmembrana da Fibrose Cística)
FC	Fibrose Cística
mEq/L	Milequivalentes por litro
DPNmax (NPDmax)	Diferença de Potencial nasal máxima
Δamil	Delta amiloride
ΔØCl	Delta zero cloro
ΔCl	Delta cloro
Δamilo-iso	Delta amiloride-isoproterenol
Índice DPN (NPDindex)	Índice da diferença de potencial nasal
mV	Milivolts
ACVDB	Ausência (agenesia) Congênita de Vasos Deferentes Bilateral
DP	Diferença de Potencial
AMPc (cAMP)	Adenosina Monofosfato Cíclica (<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>)
mmol/l	Milimol por litro
μmol/l	Micromol por litro
K ⁺	Potássio
ATP	Adenosina Trifosfato (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
<i>ABC ATP- binding cassette</i>)	Proteínas transportadoras de membrana acopladas a ATP
TMD	<i>Transmembrane Domain</i> (Domínio Transmembrana)
NBD	<i>Nucleotide Binding Domain</i> (Domínio de Ligação de Nucleotídeos)
R	Domínio citoplasmático regulador
PKA	Proteína quinase A

HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
ORCC	<i>Outwardly Rectifying Chloride Channel</i>
CaCC	Canais de Cálcio ativados pela Condutância do Cloro
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleíco)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucléico)
RE	Retículo Endoplasmático
mA	Miliampere
g/l	Gramas por litro
1g/m ² /min	Gramas por metro quadrado por minuto
Δ	Delta
∅	Zero
°C	Graus centígrados
ml/min	Mililitros por minuto
CFF	<i>Cystic Fibrosis Foundation</i>
MCI	Medida de Corrente Intestinal
VEF ₁ (FEV ₁)	Volume Expiratório Forçado no 1º segundo
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1.	POTENCIAL DE MEMBRANA	29
2.2.	CFTR	32
2.2.1.	A Proteína CFTR	32
2.2.2.	O Gene CFTR	35
2.2.3.	Mutações do Gene CFTR	37
2.3.	MEDIDAS FISIOLÓGICAS DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA	40
2.3.1.	Eletrólitos no Suor	40
2.3.1.a	Fisiologia da Glândula Sudorípara	43
2.3.2.	Diferença de Potencial Nasal	43
2.3.3.	Medida da Corrente Intestinal	58
2.4.	FIBROSE CÍSTICA	60
2.4.1.	Aparelho Digestivo	64
2.4.2.	Aparelho Respiratório	65
2.4.3.	Aparelho Genital	66
2.4.4.	Glândulas Sudoríparas	67
2.5	DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL E DIAGNÓSTICO DE FIBROSE CÍSTICA	68
2.6.	DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL E FENÓTIPO DA FIBROSE CÍSTICA	71
2.7	DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL E GENÓTIPO DA FIBROSE CÍSTICA	75
2.8	DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA REPARADORA DA CFTR	77
3.	OBJETIVOS	79
4.	MÉTODOS	80
4.1.	DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL	81
4.1.1.	Cuidados de antisepsia	83
4.1.2.	Composição das soluções	84
5.	ARTIGOS	85

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
Referências	128
Anexos	140
Anexo 1: Formulário de Informação e Consentimento	140
Anexo 2: Ficha da Medida da DPN	142

1. INTRODUÇÃO

O teste da diferença de potencial nasal (DPN) é um exame realizado na narina e que avalia *in vivo* a diferença bioelétrica existente entre os meios externo e interno das células, a qual é gerada pelo movimento de íons através da membrana celular (Knowles et al., 1981; Alton et al., 1990; Middleton et al., 1994). A medida da DPN é capaz de avaliar global e individualmente a magnitude do transporte dos principais íons através do epitélio nasal e o funcionamento dos seus canais, podendo ser utilizada como uma ferramenta para diagnóstico, previsão prognóstica e avaliação da resposta a terapêuticas reparadoras da disfunção dos canais iônicos (Sermet-Gaudelus et al., 2002; Ahrens et al., 2002; Fajac et al., 2004; De Boeck et al., 2006; Farrell et al., 2008; Beekman et al., 2014).

A principal aplicação da DPN é no diagnóstico de casos atípicos de Fibrose Cística (FC). FC é uma doença genética autossômica recessiva causada por mutações que codificam o gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), responsável pela produção da proteína CFTR. A apresentação clínica da FC é altamente heterogênea, devido, pelo menos em parte, ao grande número de mutações descritas no gene CFTR (Farrell et al., 2008). Das quase 2000 mutações descritas até o momento, as quais mostram mecanismos moleculares diferentes sobre a atividade da proteína CFTR, variando desde ausência completa de atividade até presença de função residual, somente 122 são descritas como causadoras de FC, enquanto algumas são consideradas com perfil clínico variável, pois foram identificadas em indivíduos com e sem FC, e a grande maioria como sem perfil estabelecido (http://www.cftr2.org/files/CFTR2_22July2013).

A proteína CFTR constitui o principal canal de transporte do íon cloro (Cl^-) para fora das células do epitélio exócrino. A ausência ou diminuição do funcionamento da CFTR causa alterações nos mecanismos celulares compensatórios para manutenção da neutralidade eletroquímica, levando à hiperabsorção de sódio extracelular (Na^+) pelos canais epiteliais de Na^+ (ENaC), também localizados na membrana apical, hiperpolarização da célula e consequente depleção do líquido da superfície epitelial, pois a água segue o gradiente osmolar (Boucher, 2007; Clunes & Boucher, 2007). A disfunção da CFTR ocorre em todas as

células epiteliais secretoras, mas sua maior expressão é no aparelho respiratório. Tanto que, na FC, a doença pulmonar é responsável por maior morbidade e mortalidade. No aparelho respiratório, a presença de secreções espessas desencadeia uma cascata fisiopatogênica onde a diminuição do *clearance* mucociliar leva à obstrução das vias aéreas, infecção, inflamação e destruição pulmonar. No pâncreas, obstrução canalicular leva à insuficiência pancreática com má absorção e baixo ganho de peso. No trato genital masculino, obstrução dos vasos deferentes leva à azoospermia obstrutiva. Nas glândulas sudoríparas, leva a produção de suor hiperosmolar com concentrações elevadas de Cl^- e Na^+ (Ramsey et al, 1995; Hodson, 1995).

Geralmente, a FC é uma doença facilmente diagnosticada por suas manifestações clínicas e pela dosagem de Cl^- no suor acima de 60 mEq/L, exame considerado padrão ouro para diagnóstico, ou pela presença de duas mutações associadas a FC no gene CFTR. Porém, em cerca de 5% a 10% dos casos o diagnóstico não é tão claro, seja por sintomas mais leves, dosagens de Cl^- no suor normal (abaixo de 40 mEq/L) ou limítrofe (entre 40 e 60 mEq/L) e/ou achado de mutações raras (Farrell et al., 2008). Casos atípicos podem apresentar doença respiratória com função pancreática suficiente para manter a digestão de alimentos normal ou manifestações em somente um sistema, como polipose nasal, pancreatite recorrente, azoospermia obstrutiva por agenesia congênita bilateral de vasos deferentes (ACVDB), aspergilose broncopulmonar alérgica ou doença pulmonar crônica inexplicada sem nenhum outro sinal de FC (Wilschanski et al., 2001). A identificação das mutações associadas à FC em cada um dos genes da CFTR através de técnicas de biologia molecular pode concluir o diagnóstico nestes casos, porém estas técnicas são complexas, demoradas e caras, identificando muitas vezes mutações raras ou mutações em íntrons ou regiões promotoras do gene não associadas à disfunção da CFTR. Além disto, a frequência e distribuição das mutações varia de acordo com a origem étnica do paciente e taxa de miscigenação, o que torna a heterogeneidade alélica do gene CFTR muito grande (Bobadilla et al., 2002).

Dentre os canais que a DPN consegue avaliar está o CFTR e o transporte de Cl^- através dele. Na FC, a alteração do fluxo de Cl^- para fora das células através

do CFTR torna a célula hiperpolarizada, ou seja, com uma diferença de potencial (DP) mais negativa, devido à hiperabsorção do Na^+ . Os defeitos de transporte iônico repercutem na maneira como a célula responde a estímulos diferentes, como ao bloqueio do canal de Na^+ por drogas bloqueadoras e ao estímulo do CFTR por drogas que ativam a adenosina monofosfato cíclica (AMPc) intracelular. A utilização de um protocolo de instilação sequencial de soluções eletrolíticas e fármacos, como o amiloride e o isoproterenol, e o registro contínuo das medidas da DP permite a demonstração gráfica dos resultados através de traçados que são característicos para indivíduos saudáveis e com FC e que identificam as três características bioelétricas principais da FC (Middleton et al, 1994, Kersting et al, 1998) (Figuras 1 e 2):

- 1) a DP basal é cerca de duas vezes mais negativa (normal entre -15 a -25 mV);
- 2) a DP torna-se menos negativa em resposta ao amiloride, droga que bloqueia o canal de Na^+ , devido a despolarização maior da célula;
- 3) a DP não volta a ser mais negativa, ou seja, não hiperpolariza, em resposta ao isoproterenol, droga que estimula a secreção de Cl^- pela CFTR

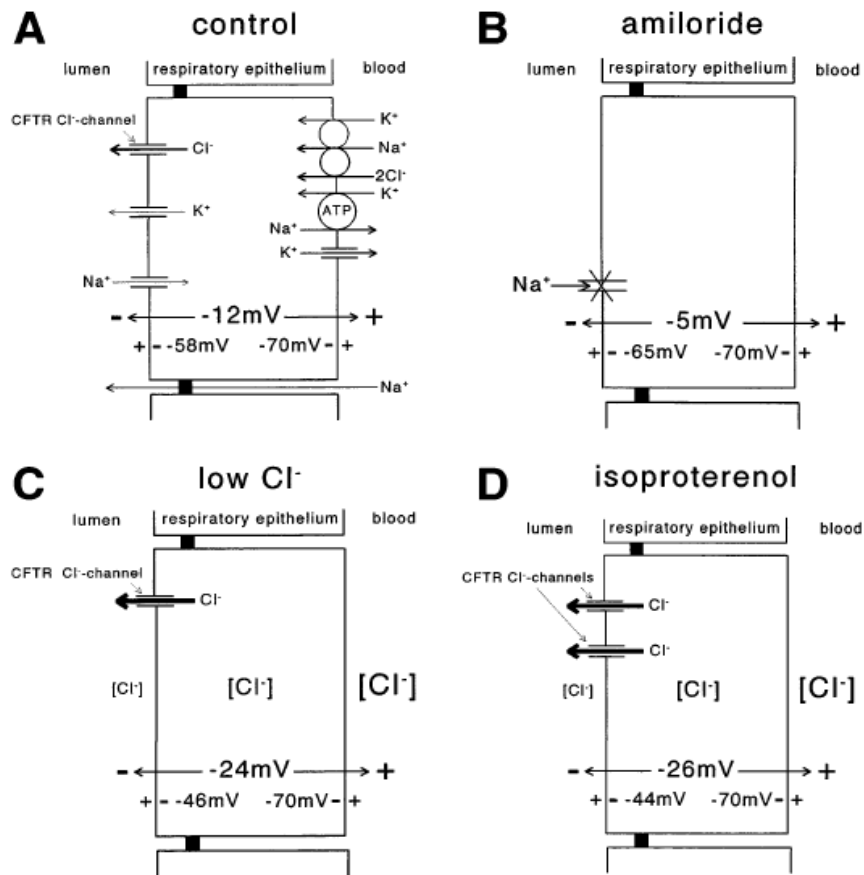


Figura 1. Desenho esquemático sobre o potencial de membrana e transporte de íons no epitélio respiratório. Em B – D somente o transporte dos íons afetados pelo protocolo experimental respectivo são demonstrados. O movimento da água não está representado. A. Perfusão com cloreto de sódio isotônico (controle). B. Aplicação de amiloride. C. perfusão com solução com baixa concentração de Cl^- (15 mmol/l Cl^-). D. adição de isoproterenol (10 $\mu\text{mol/l}$) a solução com baixa concentração de Cl^- . Extraído de Kersting U et al.

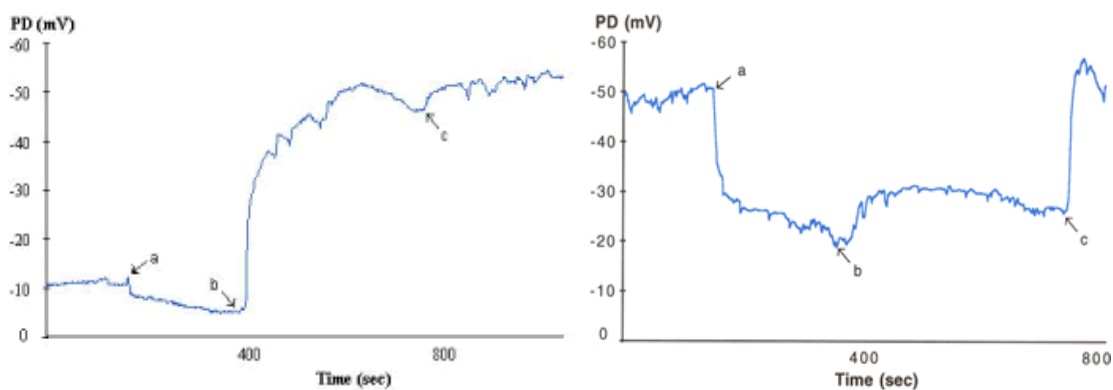


Figura 2. Traçados da DPN em normais (esquerda) e portadores de FC (direita).

Em condições técnicas ideais, o teste da DPN atinge sensibilidade e especificidade maiores de 90% (Hoffman et al, 1997). Para sua realização é importante considerar que a medida da DPN pode ser influenciada pela aparelhagem utilizada e por condições do paciente tais como presença de inflamação alérgica ou infecciosa nasal, variações hormonais, climáticas e ambientais e, principalmente, pela gravidade do defeito da CFTR (Boyle et al., 2003; Standaert et al, 2004; Schuler et al., 2004). Um estudo sobre a relação entre as mutações no gene CFTR e a DPN em homens normais, heterozigotos, portadores de ACVDB e com FC evidenciou que as anormalidades da DPN se correlacionam com o número e gravidade das mutações CFTR (Wilschanski et al., 2006). Outro estudo realizado em pacientes portadores de bronquiectasias difusas e eletrólitos no suor normais mostrou que os valores da DPN apresentam uma continuidade que se relaciona com a presença de zero, uma ou duas mutações no gene CFTR (Bienvenu et al, 2010).

Além de uma ferramenta de diagnóstico, a DPN pode também ser utilizada como um marcador de prognóstico, uma vez que o transporte iônico epitelial nasal parece estar relacionado à expressão clínica da FC. Fajac e colaboradores ao avaliarem adultos com FC encontrou relação entre suficiência pancreática e presença de função residual da CFTR medida pela resposta ao isoproterenol e entre a gravidade do distúrbio respiratório e a magnitude da DPN e resposta ao amiloride (Fajac et al., 2004).

Atualmente, existe um grande interesse em identificar um bom biomarcador para avaliação das novas terapias restauradoras da CFTR. A DPN é considerada a mais extensivamente validada e correlacionada aos desfechos respiratórios, embora sua reprodutibilidade e confiabilidade ainda devam ser melhor avaliadas (Beekman et al, 2014).

Nosso objetivo neste estudo é reproduzir e padronizar a técnica da DPN para sua posterior utilização como uma ferramenta de avaliação do funcionamento dos canais iônicos celulares através da determinação dos valores de referência, sensibilidade, especificidade e concordância entre os valores encontrados nas duas narinas do paciente. Para tanto, realizaremos uma avaliação prospectiva da DPN em três grupos populacionais: pacientes com diagnóstico de FC, pacientes portadores de outras doenças não FC e indivíduos saudáveis. Secundariamente, avaliaremos a relação entre a função residual da CFTR avaliada através da resposta da DPN à solução sem cloro e com isoproterenol (ΔCl) e marcadores fenotípicos da FC como dosagem de Cl^- no suor, insuficiência pancreática, positividade para *Pseudomonas aeruginosa*, função pulmonar e genótipo nos pacientes com FC.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. POTENCIAL DE MEMBRANA

Potencial de membrana (também chamado de potencial transmembrana ou voltagem de membrana) é a diferença do potencial elétrico entre o interior e o exterior da célula (Guyton et al., 2006) Este valor está relacionado às concentrações diferentes dos íons nos lados opostos da membrana. Esta concentração, por sua vez, é determinada pelas interações entre os canais e bombas de íons que estão localizadas na própria membrana. Os íons que mais participam são o Na^+ e Cl^- com maior concentração na região extracelular e íon potássio (K^+) na região intracelular (Knowles et al, 1981; Guyton et al, 2006).

A membrana plasmática envolve todas as células animais e é composta por uma camada dupla de lipídios contendo uma variedade de tipos de proteínas. A ação de dois tipos de proteínas transmembrana, as proteínas transportadoras de íons ou bombas de íons e as proteínas com função de canais de íons, são fundamentais para gerar o potencial de membrana. Proteínas transportadoras de íons ou bombas de íons movimentam ativamente os íons através da membrana para estabelecer um gradiente de concentração entre os dois lados da membrana e os canais de íons permitem que os íons se movimentem através da membrana a favor deste gradiente de concentração, num processo chamado de difusão facilitada (Guyton et al, 2006).

O potencial de membrana tem duas funções básicas. Primeiro, permite que a célula funcione como uma bateria, provendo energia para operar uma variedade de sistemas moleculares. Segundo, em células eletricamente excitáveis, como os neurônios e células musculares, é utilizado para transmitir sinais entre as diferentes partes da célula. O potencial de membrana da célula deriva fundamentalmente de dois fatores: força elétrica e difusão. A força elétrica surge da atração mútua entre as partículas com cargas elétricas opostas (positiva e negativa) e da repulsão mútua entre as partículas com mesmo tipo de carga (ambas positivas

ou ambas negativas). A difusão decorre da tendência das partículas se redistribuírem de regiões onde elas estão altamente concentradas para regiões onde a concentração é mais baixa.

Por convenção, o sinal do potencial de membrana é designado como a voltagem do lado de dentro da célula. Virtualmente todas as células eucarióticas mantêm um potencial transmembrana que é diferente de zero, em geral com uma voltagem negativa no interior da célula comparado com o exterior da célula. Os sinais são gerados pela abertura ou fechamento de canais de íons em algum ponto da membrana, produzindo uma alteração local no potencial que causa uma corrente elétrica que rapidamente afeta outros pontos da membrana.

Em células excitáveis ou não excitáveis o valor do potencial de membrana basal é relativamente estável e chamado de potencial de repouso. A abertura e fechamento dos canais de íons podem levar a alterações do potencial de repouso. Se a voltagem do interior da célula se tornar mais positiva chama-se de despolarização, ou seja, de -70 mV para -60 mV. Se a voltagem do interior da célula tornar-se mais negativa chama-se de hiperpolarização, ou seja, de -70 mV para -80 mV (Guyton et al, 2006).

O movimento dos íons pelo epitélio é vetorial e, dependendo do epitélio em estudo, pode assumir um caráter absorptivo ou secretor. No epitélio respiratório, o movimento dos íons regula a maior ou menor quantidade de líquido na superfície da via aérea. Quando há necessidade de absorver líquido é desencadeado um transporte ativo de Na^+ em direção à serosa, com subsequente transporte passivo de Cl^- por via paracelular para manter a neutralidade eletroquímica, e absorver água do líquido da superfície. A força para absorção do Na^+ é gerada pelas bombas basolaterais de Na^+ e K^+ dependentes de ATP (*Adenosine Triphosphate*) e o processo é controlado na membrana apical pelos canais ENaC. Ao contrário, quando o líquido da superfície da via aérea está diminuído, ocorre transporte ativo de Cl^- pelo CFTR em direção à mucosa, com movimento passivo do Na^+ e água seguindo o gradiente tanto eletroquímico quanto osmolar (Boucher, 2007; Clunes & Boucher, 2007).

Acredita-se que as anormalidades no transporte dos íons em consequência da ausência ou pouca função da CFTR presente na FC, não permitindo o movimento do Cl^- , leve à hiperabsorção de Na^+ e depleção de líquido da superfície da via aérea. Do ponto de vista eletrofisiológico, as alterações iônicas levam à hiperpolarização da membrana, com valores de potencial de membrana basal mais negativo que o normal, e do ponto de vista funcional leva a alteração do estado de hidratação das secreções e desencadeamento das anormalidades patológicas nos diversos órgãos acometidos na FC (Boucher, 2007)

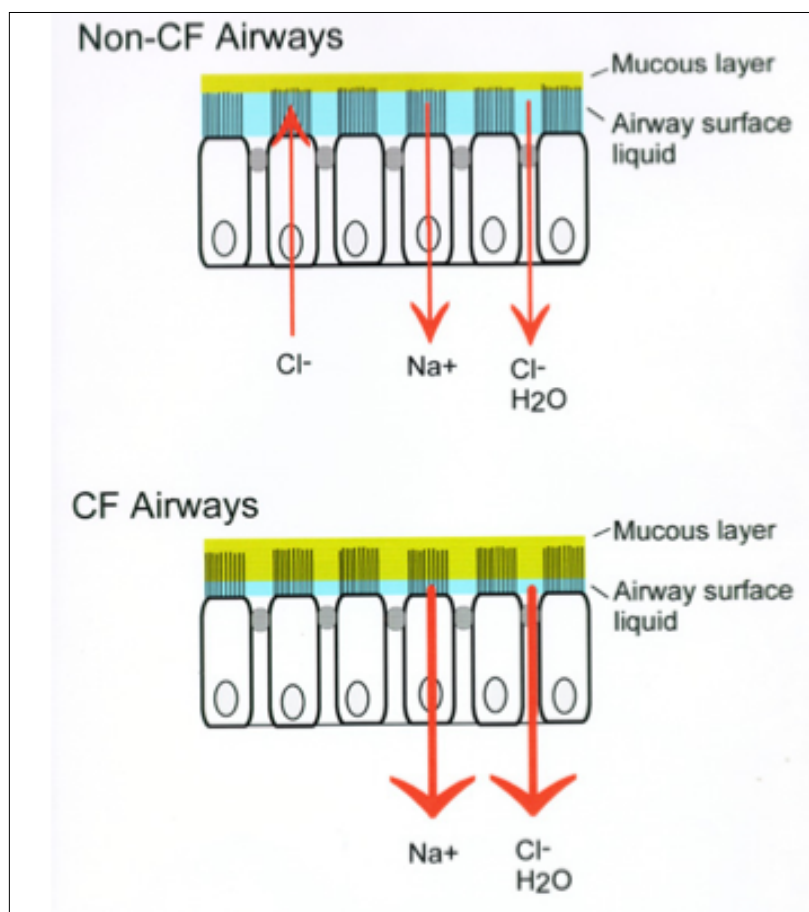


Figura 3. Modelo do transporte de eletrólitos no epitélio da via aérea normal e com FC. Extraído de Kunzelman K.

2.2. CFTR

2.2.1. A Proteína CFTR

CFTR é a sigla utilizada para denominar tanto o gene quanto a proteína *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (Riordan et al, 1989, Bear et al, 1992). A proteína CFTR é uma glicoproteína de membrana que funciona como um transportador de íons regulado pelo estado de fosforilação do AMPc e ATP. Esta proteína está localizada na membrana apical das células epiteliais, ocupando toda sua espessura, e tem uma ação importante na manutenção da homeostasia da água e do sal através dos epitélios uma vez que é responsável pela movimentação e regulação do fluxo do Cl⁻ através da célula (Welsh et al, 1993; Sheppard & Welsh, 1999, Kunzelman, 2003). Desta forma, a CFTR assume um papel central no transporte transepitelial dos sais para dentro e fora da célula, no fluxo de líquido e na concentração dos íons nos epitélios.

Estudos sobre as características estruturais da proteína CFTR através do sequenciamento de aminoácidos a classificaram como membro da família das grandes proteínas transportadoras de membrana acopladas a ATP (*ABC ATP-binding cassette*) (Sheppard & Welsh, 1999; Gadsby et al., 2006). Entretanto, existem pelo menos duas características da CFTR que a distinguem em relação aos outros membros da família ABC: 1^a) é a única a funcionar como um canal de íons e 2^a) é a única que possui cinco domínios (as demais possuem quatro), devido a presença do domínio regulador. A CFTR é constituída por 1480 aminoácidos que são dispostos em duas metades homólogas. Cada metade contém seis segmentos transmembrana que constituem um domínio transmembrânico hidrofóbico de cada lado (*Transmembrane Domain* - TMD1 e TMD2) e um domínio de ligação de nucleotídeos também de cada lado (*Nucleotide Binding Domain* - NBD1 e NBD2). As duas metades são ligadas pelo domínio citoplasmático regulador (R), o qual contém vários sítios alvos para fosforilação por proteínas cinases (Lubamba et al, 2012) (figura 4).

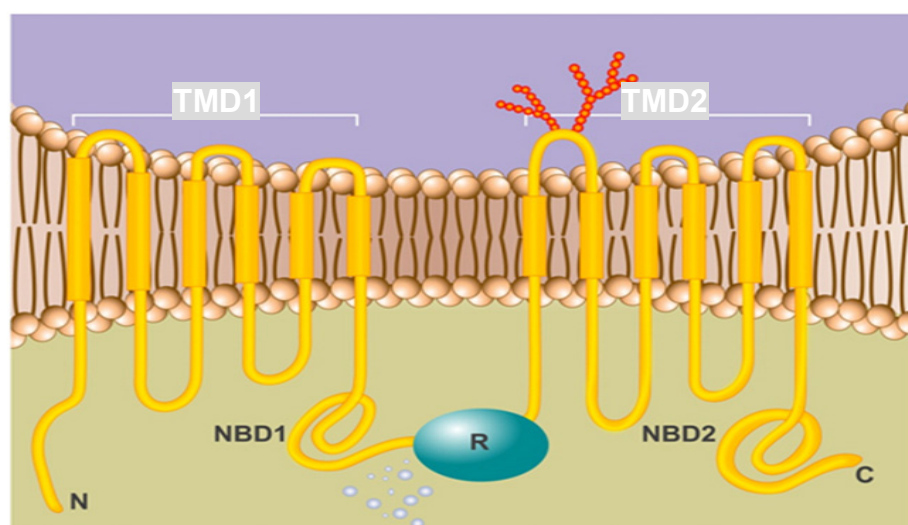


Figura 4. Localização e estrutura propostas da glicoproteína de membrana *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), composta de dois domínios transmembrana (TMD: *Transmembrane Domain*), dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBD: *Nucleotide Binding Domain*) e um domínio regulatório central (R). Cada TMD tem seis α -hélices hidrofóbicas. A porção extracelular da 4ª alça no TMD2 apresenta um sítio N-glicosilado. C: terminal C; N: terminal N. Extraído de Lubamba B, et al, 2012.

Experimentos sobre a estrutura tridimensional da CFTR evidenciaram que 77% da sua estrutura está no citoplasma, 19% nos segmentos transmembrana e 4% em alças extracelulares as quais, na maioria, são muito curtas. Algumas destas alças contêm sítios de glicosilação com função *in vivo*. Os domínios TMD1 e TMD2 estão alinhados em forma de poro ou conduto pelo qual o íon Cl^- é conduzido através da membrana e os domínios NBD1 e NBD2 são responsáveis pela ligação e pela hidrólise de ATP, fornecendo energia necessária para atividade do canal (Wang, 2011). O domínio regulatório modula a atividade da CFTR e pode ter um efeito inibitório ou estimulatório. Acredita-se que o movimento de íons pelo canal seja desencadeado pela fosforilação AMPc-dependente do domínio R pela proteína cinase A (PKA) e interação e hidrólise do ATP em sítios da NBD que induzem alterações na conformação da proteína permitindo a abertura ou fechamento do canal. Desta forma, ambos funcionam como um “portão” que se abre ou fecha quando ativado. Na CFTR, ao invés de transportar o soluto, o ATP é necessário para

ativar o canal (Serohijos et al, 2008). Modificação no domínio regulador por adição ou remoção de grupos químicos de fosfato, mediados pela PKA, aumenta a afinidade do CFTR pelo ATP, resultando em hidrólise do ATP e abertura do canal. A atividade do canal torna-se, desta forma, quantitativamente regulada pelo estado de fosforilação (Gadsby et al, 2006; Lubamba et al., 2012).

A CFTR localiza-se principalmente na membrana apical de células epiteliais, embora seja também encontrada em outras células como os miócitos cardíacos, células do músculo liso, eritrócitos e macrófagos (Lubamba et al., 2012). Quando existe disfunção da CFTR o transporte transepitelial dos íons e água se modifica resultando em alteração na homeostasia da superfície exócrina epitelial. Esta alteração leva a acúmulo de macromoléculas nas secreções, as quais alteram a hidratação e o estado físico das secreções. Isto ocorre na maioria dos tecidos exócrinos, mas com consequências mais graves nas vias aéreas pulmonares, no pâncreas, nas glândulas sudoríparas, no intestino e no canal deferente. Nas vias aéreas, o acúmulo de muco viscoso e colonização por microrganismos causam uma resposta inflamatória com dano e perda de função pulmonar. No pâncreas, a secreção das enzimas pancreáticas e de fluido rico em bicarbonato torna-se prejudicada acarretando má digestão e absorção dos nutrientes. Nas glândulas sudoríparas, a falta da CFTR funcionando bloqueia a reabsorção dos sais, tornando a concentração dos eletrólitos no suor elevada. A presença destas alterações em graus variados de intensidade representam as manifestações clínicas da FC

Além do transporte do cloro, a CFTR também tem um papel importante na secreção de bicarbonato (HCO_3^-). A manifestação clínica mais importante da perda desta função é a alteração da secreção pancreática de HCO_3^- nos portadores de FC. A CFTR também influencia a atividade de outros canais e transportadores, tais como os canais ENaC que regulam a absorção epitelial do sódio, outros canais de cloro (*Outwardly Rectifying Chloride Channel – ORCC*) e canais de cálcio ativados pela condutância do cloro (CaCC), entre outros em estudo (Riordan, 2008; Lubamba et al., 2012)

A possibilidade de que a CFTR esteja diretamente envolvida na função das células imunes e inflamatórias também tem sido especulada, uma vez que foi detectada em neutrófilos e outras células hematopoiéticas. Entretanto, não está

claro se as alterações inflamatórias presente nos tecidos dos pacientes com FC antes da infecção é inerente às alterações das células inflamatórias por si ou se é uma reação ao estado alterado da superfície epitelial que apresenta alterações de íons, fluidos e muco (Riordan, 2008).

2.2.2. O Gene CFTR

O gene CFTR é responsável pela produção da glicoproteína CFTR e localiza-se no braço longo do cromossomo 7, lócus q31, apresenta 180.000 pares de bases e 27 éxons. O processo que leva à produção e ativação da proteína a partir do cromossomo é complexo e envolve uma jornada desde a transcrição do DNA para o RNA mensageiro, tradução do RNA mensageiro para peptídeos, processamento e glicosilação até o transporte e sua inserção na membrana apical celular (Riordan et al, 1989; Rogan et al, 2011).

A transcrição do DNA para RNA mensageiro ocorre no núcleo da célula. Após, o RNA mensageiro migra até o ribossomo no citoplasma, onde é traduzido para sequência de aminoácidos, configurando a CFTR imatura. Maturação da proteína por glicosilação ocorre entre o retículo endoplasmático (RE) e o complexo de Golgi. Pelo fato da proteína CFTR ser muito longa ocorre um processo de dobradura para que seu tamanho seja reduzido e possa trafegar pelas organelas celulares. O processo de dobradura e empacotamento ocorre no RE e somente as proteínas devidamente “empacotadas” são liberadas para o complexo de Golgi. Proteínas incompletamente dobradas são retidas no RE e posteriormente degradadas (Younger et al., 2006). O processo de dobramento é surpreendentemente ineficiente, com desdobramento ocorrendo em mais da metade das CFTR imaturas (Ward et al, 1994). As proteínas são encaminhadas para maturação no complexo de Golgi pela coordenação de uma série de chaperomas citoplasmáticos.

No complexo de Golgi, as proteínas adequadamente dobradas são processadas e liberadas para membrana plasmática, onde rapidamente sofrem endocitose pelas vesículas subapicais. As vesículas subapicais trafegam até a

superfície celular onde a CFTR é ativada. Na membrana apical ocorre novo controle de qualidade e proteínas pouco funcionantes são descartadas (Kerem, 2005; Okiyonedá et al., 2010). Uma vez situada na membrana plasmática a CFTR torna-se ativa numa velocidade de 10% por minuto, assim como fazem a maioria das proteínas da membrana plasmática, e tem uma meia-vida de aproximadamente 12 a 24 horas (Ward et al., 1994).

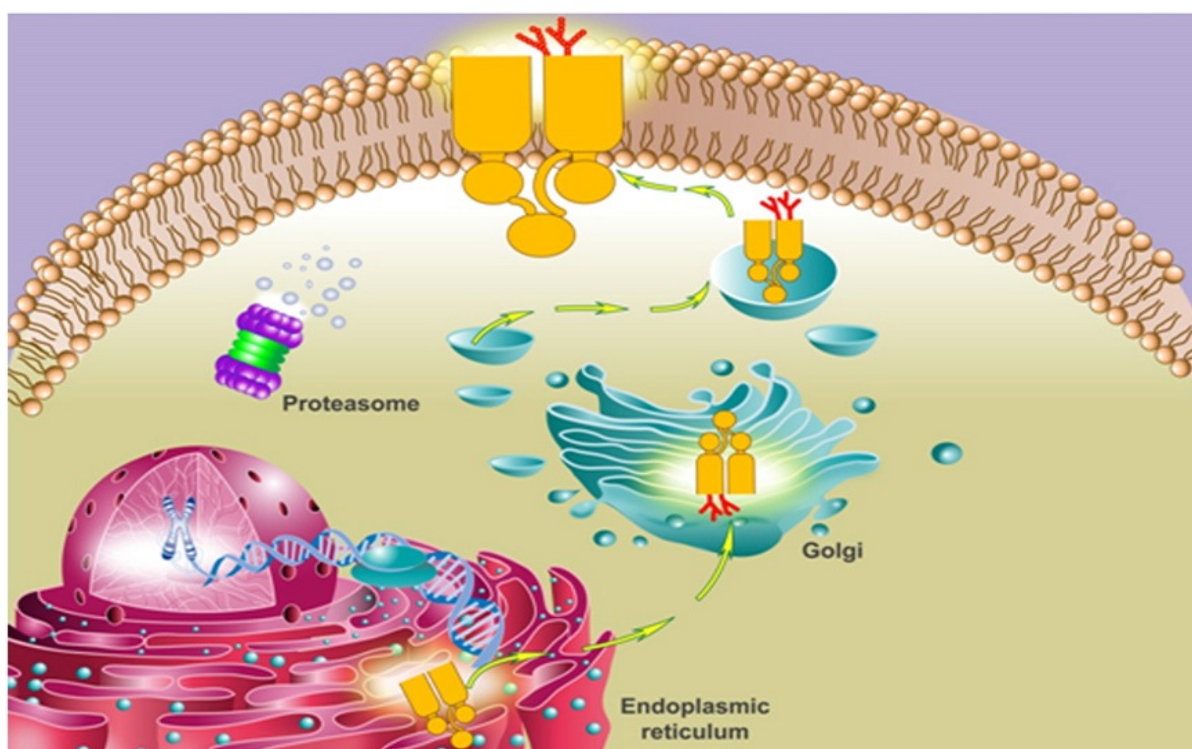


Figura 5. Ilustração da biossíntese normal da proteína CFTR: a transcrição do DNA para RNA mensageiro inicia no núcleo da célula, passa pelo ribossoma e chega no retículo endoplasmático como uma forma imatura da proteína. O processo de maturação até a forma completamente glicosilada ocorre entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. No complexo de Golgi as proteínas maduras e adequadamente formadas são liberadas em direção à membrana plasmática. Extraído de Lubamba B, et al, 2012.

2.2.3. Mutações do Gene CFTR

A grande maioria (97,5%) das mutações descritas no CFTR envolve um ou poucos nucleotídeos. O restante das mutações (2,5%) envolve um grande número de nucleotídeos, tais como deleções de todo um éxon ou de múltiplos exons do gene. Mutações do tipo *missense*, ou seja, aquelas que modificam ou alteram o sentido devido à substituição de aminoácidos, são as mais comuns e representam cerca de 40% das mutações relatadas. Mutações do tipo *frameshift*, ou seja, aquelas que desviam ou alteram o quadro de leitura, representam cerca de 16% das mutações, enquanto as mutações do tipo *splicing* (que impedem o correto processamento (corte e emenda) do RNA mensageiro) e *nonsense* (que causam o término da cadeia) representam 12% e 8,5% das mutações, respectivamente. Mutações que envolvem a inserção ou deleção de nucleotídeos em múltiplos de três e que deixam a *reading frame* intacta são incomuns (cerca de 2%). Entretanto, entre estas mutações *in-frame* está a mutação p.Phe508del (também conhecida como deltaF508), que causa a deleção de um par de três bases e que resulta na ausência da fenilalanina na posição 508 da proteína. Esta mutação costuma ser a mais frequente entre os pacientes, chegando a até 70% dos alelos afetados na população caucasiana. A falta da fenilalanina prejudica o correto dobramento da proteína, que não passa no controle de qualidade do RE, sendo posteriormente degradada (Ferec & Cutting, 2012). O restante das mutações deletérias (2%) atinge a região do *promoter* do gene CFTR.

As mutações causam defeitos na produção e função da CFTR por mecanismos moleculares diferentes. Mutações que introduzem um códon de terminação prematuro tais como *frameshift*, *nonsense* e *splicing* são expressas como deletérias; mutações que levam à alteração na sequência codificadora e que alteram somente um aminoácido podem ou não afetar a função da proteína. Até julho de 2013 cerca de 2000 mutações no gene CFTR foram catalogadas no banco de dados das mutações da FC (CFTR2: www.cftr2.org/files/CFTR2_22July2013). Cerca de 82% destas mutações têm efeitos deletérios, enquanto 14 % parecem ser variações de sequência sem consequências funcionais e os 4% restante são de efeito desconhecido (Ferec & Cutting, 2012).

As mutações no gene CFTR podem ser teoricamente divididas em 6 classes de acordo com a alteração sobre a função da CFTR (Welsh et al, 1993; Zielenski, 2000). Mutações classe I – causam defeito na síntese da proteína. Neste grupo estão as mutações do tipo *nonsense* que contém sinais de término prematuro da cadeia (*premature stop codon mutations*) e mutações que levam à produção de um RNA mensageiro instável ou produção truncada ou instável da proteína. Estas mutações produzem pouca ou nenhuma CFTR. Exemplo: G542X, R553X e W1282X. Mutações classe II – associadas ao bloqueio na biogênese da proteína (defeitos de emenda ou de tráfego). A proteína com defeito não progride pela rota biossintética sendo degradada. Conseqüentemente, não se detecta CFTR na superfície celular. Exemplo: p.Phe508del (Δ F508). Mutações classe III – associadas com defeito na regulação do canal do cloro. Mutações da classe III produzem proteínas CFTR que são transportadas para a membrana celular, mas não respondem à estimulação pelo AMPc. As mutações desta classe geralmente estão presentes nos NBD, interferindo na interação desses domínios com ATP intracelular e impedindo a regulação correta da abertura do canal de cloro, mesmo que quantidades normais da proteína estejam presentes na superfície da célula. Exemplo: p.Gly551asp (G551D), p.Ala455Glu (A455E). Mutações desta classe podem estar associadas a fenótipos graves ou leves. Mutações classe IV – associadas à redução da condutividade do cloro pelo canal, ou seja, à diminuição do fluxo de cloro pelo canal. Exemplo: R334W. Mutações classe V – associadas à diminuição da síntese de CFTR funcionalmente normal. Exemplo: 3272-26A>G. Mutações classe VI – associadas a diminuição da estabilidade da CFTR funcionalmente normal. Exemplo: (Figura 6).

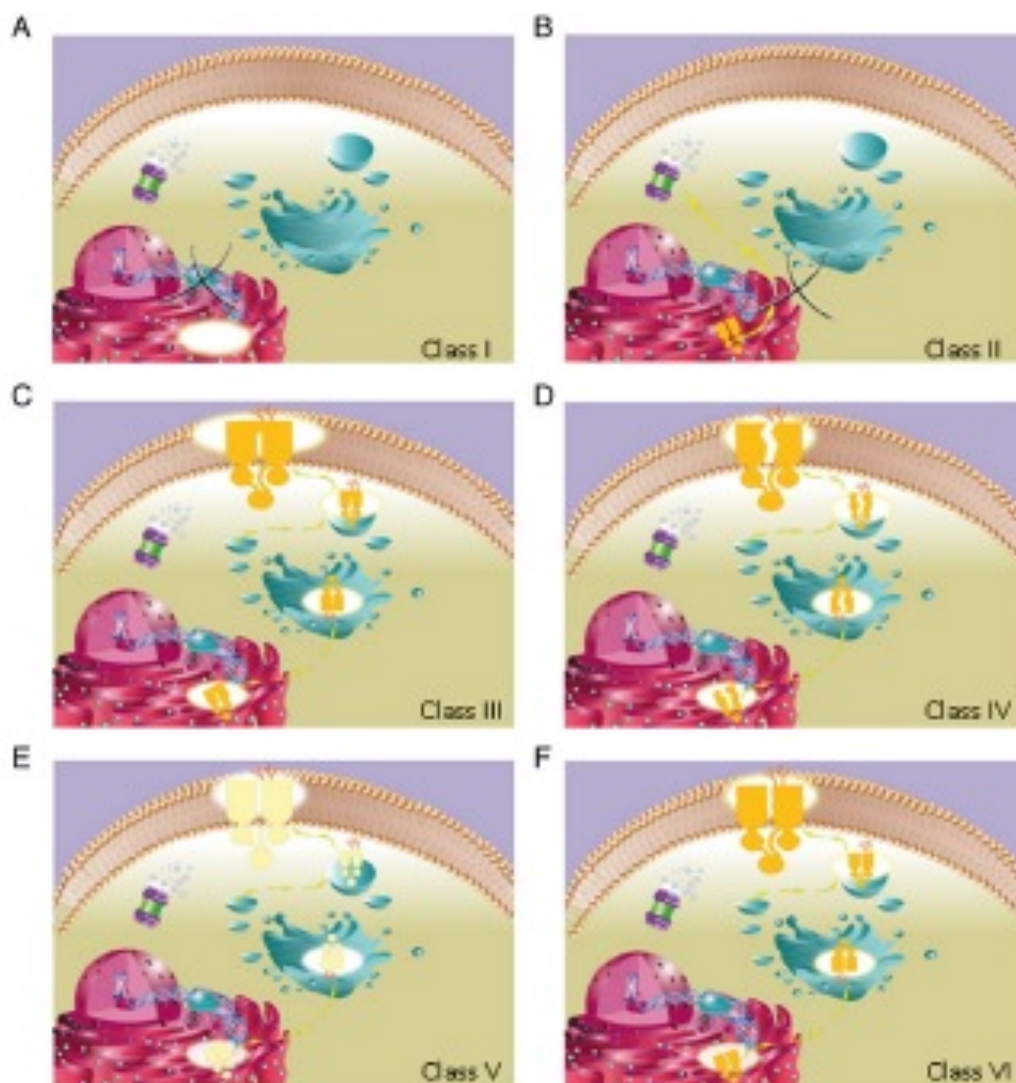


Figura 6. Ilustração das seis classes de mutações CFTR: A) Mutações classe I – causam defeito na síntese da proteína. B) Mutações classe II - associadas ao bloqueio na biogênese da proteína (defeitos de emenda ou de tráfego). A proteína com defeito não progride pela rota biossintética sendo degradada. Consequentemente, não se detecta CFTR na superfície celular. A mutação deltaF508 é desta classe. C) Mutações classe III – produzem proteínas CFTR que são transportadas para a membrana celular, mas não respondem à estimulação pelo AMPc. D) Mutações classe IV – associadas à redução da condutividade do cloro pelo canal, ou seja, à diminuição do fluxo de cloro pelo canal. E) Mutações classe V – associadas à diminuição da síntese de CFTR funcionalmente normal. F) Mutações classe VI – associadas a diminuição da estabilidade da CFTR funcionalmente normal. Extraído de Lubamba B, et al, 2012.

A frequência e a distribuição das mutações no CFTR variam de acordo com a origem étnica dos pacientes com FC e provavelmente refletem o efeito

fundador durante a migração e estabelecimento de grupos em diferentes áreas. Com relação a mutação deltaF508, por exemplo, observa-se um gradiente relativo entre os países do sudeste e noroeste da Europa, variando de 25% na Turquia a 82% na Dinamarca. Além disto, algumas mutações são específicas ou mais frequentes em determinados grupos étnicos, como a mutação p.Trp1282X (W1282X) em judeus Ashkenazi e a c.2988G>A em africanos. É a presença da mutação deltaF508 que aumenta a frequência de FC na população caucasiana em relação às outras raças (Ferec & Cutting, 2012; Lubamba et al, 2012).

O entendimento das implicações das mutações sobre a função da CFTR têm sido fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na FC. Os melhores resultados têm sido encontrados com substâncias que atuam como “corretores” das mutações, através do resgate da CFTR para superfície celular por defeitos de tráfego, e com substâncias que atuam como “potencializadores”, ou seja, que sobrepujam ou aumentam a atividade do canal de Cl⁻ defeituoso (Flume et al., 2012)

Os vários estudos realizados que correlacionaram a quantidade de atividade de CFTR com a gravidade da FC sugerem que o resgate da função da CFTR para níveis entre 10% a 35% da atividade celular é suficiente para impedir morbidade pulmonar significativa (Kerem, 2006).

2.3. MEDIDAS FISIOLÓGICAS DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA CFTR

2.3.1. Eletrólitos no Suor

FC foi primeiramente descrita como doença fibrocística do pâncreas pela Dra. Dorothy Andersen, em 1938, e seu caráter sistêmico foi posteriormente reconhecido por Farber, Shwachman e di Sant’Agnese, em 1943. A concentração elevada de sal no suor dos portadores de FC foi descrita somente alguns anos depois por Paul di Sant’Agnese, em 1953, após o relato de vários casos de prostração pelo calor em lactentes com antecedentes de doença fibrocística durante

uma onda de calor em Nova York em 1951 (Kessler & Andersen, 1951; di Sant'Agnesse et al., 1953). Este achado foi, sem dúvida, um dos principais avanços do conhecimento sobre FC nos anos 50. Os primeiros testes do suor conseguiam distinguir os portadores de FC, porém mostravam medidas não fisiológicas do Cl-. Em 1959, Gibson e Cooke descreveram uma técnica nova que utilizava o estímulo localizado da sudorese através da iontoforese com pilocarpina. Este método mostrou-se mais confiável, seguro e reprodutível tanto para estímulo da sudorese quanto para coleta do suor, facilitando a medida da concentração dos eletrólitos no suor (Gibson & Cooke, 1959). A análise quantitativa de eletrólitos no suor obtido através da iontoforese pela pilocarpina tornou-se a técnica padrão para diagnóstico de FC, sendo recomendada pelas principais diretrizes até os tempos atuais (LeGrys et al, 2007). Concentração do cloro no suor menor que 40 mEq/L é considerada normal, entre 40 e 59 mEq/L limítrofe ou suspeita e acima de 60 mEq/L anormal. Esta classificação foi estabelecida por Shwachman através dos resultados de 7.200 testes do suor realizados entre 1959 e 1966 (Shwachman & Mahmoodian, 1967). Recentemente, alguns trabalhos sugerem a diminuição do limite de normalidade para 30 mEq/L para lactentes até 6 meses de vida pela possibilidade de exclusão de falsos-negativos nesta faixa etária (Beauchamp & Lands, 2005; Farrel et al, 2008).

O teste do suor envolve três partes técnicas: a estimulação da sudorese, a coleta e a análise. A análise do suor é posteriormente seguida pela interpretação dos resultados. O local de preferência para coleta do suor é a superfície flexora do antebraço, embora outros locais como braço, coxa e panturrilha possam ser utilizados. A sudorese localizada é induzida pela iontoforese do nitrato de pilocarpina a 2,5g/l, que tem ação colinérgica, em solução aquosa ou em discos de gel sobre uma superfície localizada da pele. Neste local aplica-se uma corrente de até 4 mA através de eletrodos por 5 minutos para que a pilocarpina se mova para dentro da pele, aumentando o cálcio intracelular e estimulando a produção do suor através da abertura de canais de cloro ativados pelo cálcio. Após a estimulação, os eletrodos são removidos e a pele é limpa. Imediatamente coloca-se uma gaze ou papel filtro previamente pesados ou um aparelho de coleta em espiral (Macroduct®, da Wescor) sobre o sitio do eletrodo positivo. A gaze ou papel filtro permanecem sobre o local por 20 a 30 minutos, devendo estar bem vedados para evitar evaporação do suor. O volume mínimo de suor coletado deve ser calculado de acordo com o peso do

paciente em $1\text{g}/\text{m}^2/\text{min}$. A análise do suor deve ser quantitativa, medindo-se a concentração dos íons Cl^- e Na^+ . O Cl^- deve ser quantificado por colorimetria, coulometria ou por eletrodo íon seletivo; o Na^+ por fotometria de chama, espectrofotometria ou eletrodo íon seletiva. O Cl^- tem melhor poder diagnóstico que o Na^+ , mas este deve ser medido para assegurar a qualidade do exame, uma vez que discordância significativa, ou seja, maior que 15 mEq/L , entre as concentrações dos dois eletrólitos pode indicar erro técnico na coleção, análise ou ambas as partes do teste (Mishra et al, 2005; Collie et al, 2014). Augarten e colaboradores observaram que a relação entre Cl/Na no suor em indivíduos normais ou portadores de FC invariavelmente é maior que 1.0, embora uma relação menor que 1.0 não seja excludente para FC, uma vez que pacientes com FC portadores de mutações leves podem apresentar nível de Na^+ no suor maior do que do Cl^- (Augarten et al, 1995).

Aproximadamente 98% dos pacientes com FC têm concentrações de cloro no suor acima de 60 mEq/L . Entretanto, há uma variedade de outras condições, embora raras, que estão associadas a elevação dos eletrólitos no suor. Geralmente estas condições podem ser facilmente distinguidas da FC por suas manifestações clínicas e inclui: eczema atópico, doença de Addison, displasia ectodérmica, alguns tipos de doenças de depósito de glicogênio e hipotireoidismo não tratado. A medida dos eletrólitos no suor nas primeiras 24 horas de vida também pode ser transitoriamente elevada, com declínio após o segundo dia de vida. Por ser uma técnica trabalhosa e sujeita a interferências, resultados falso-positivos ou limítrofes normalmente decorrem de erros na coleta do suor realizado por laboratórios não qualificados. Resultado de cloro no suor acima de 160 mEq/L é fisiologicamente inexplicável e sugere erro laboratorial ou síndrome de Munchausen (incluindo *by proxy*). Erros técnicos como evaporação e contaminação da amostra tendem a produzir resultados falso-positivos. A causa mais importante de resultado falso-negativo é edema, o qual pode ser secundário à insuficiência pancreática da FC. Repetição do exame após resolução do edema pode definir o resultado. Uso de mineralocorticoides também pode diminuir a concentração de eletrólitos no suor (Mishra et al., 2005; Collie et al, 2014).

Métodos de análise indireta da concentração dos eletrólitos no suor, os quais determinam níveis aproximados dos eletrólitos no suor, como a osmolaridade

e condutividade, têm sido sugeridos como alternativas mais simples para o teste do suor. Porém, as diretrizes atuais os posicionam como exames de triagem e não como exames confirmatórios do diagnóstico por serem mais sujeitos a erros (Collie et al, 2014).

a) Fisiologia da Glândula Sudorípara:

De acordo com a teoria da formação de fluidos exócrinos, o suor é primeiramente secretado como um fluido isotônico pela porção acinar da glândula sudorípara. À medida que o suor passa pelo ducto glandular, o Cl^- é reabsorvido pela CFTR e o Na^+ pelos canais ENaC tornando o produto a ser excretado na pele com concentração hipotônica em relação ao plasma (valores inferiores a 40 ou 20 mEq/L). Na FC, devido à disfunção da CFTR, os eletrólitos não são reabsorvidos ao nível do ducto glandular e o suor excretado apresenta concentrações hipertônicas em relação ao plasma (Taylor et al, 2009).

Quinton realizou um estudo utilizando microperfusão de ductos de glândulas sudoríparas de controles e portadores de FC e evidenciou a impermeabilidade ao Cl^- no ducto sudoríparo na FC, levando a pouca reabsorção tanto do Cl^- quanto do Na^+ no ducto e assim à alta concentração dos eletrólitos no suor (Quinton, 1983). A descoberta de Quinton foi considerada um dos grandes avanços na história da FC, possibilitando o entendimento do defeito básico no transporte de eletrólitos na membrana celular.

2.3.2. Diferença de Potencial Nasal

A evolução do teste da DPN acompanhou a história da FC. A sua utilização foi fundamental para o conhecimento das bases eletrofisiológicas que levam à produção de secreções exócrinas espessas e viscosas na FC. Durante décadas, várias foram as hipóteses lançadas sobre a causa básica da FC, em uma época que as conclusões eram baseadas mais em observações do que em pesquisas científicas.

Até o início dos anos 80 acreditava-se que as anormalidades no conteúdo de eletrólitos do suor e no conteúdo de água das secreções das vias aéreas, intestinal, do trato reprodutivo e do pâncreas presentes na FC fossem secundárias a uma disfunção epitelial generalizada, causada por algum fator humoral circulante. Acreditava-se que a absorção excessiva de sal e talvez de líquido da superfície epitelial respiratória fosse a explicação para a patogênese da doença pulmonar na FC, mas sua causa básica não era conhecida, nem explicava porque o conteúdo de sal no suor estava elevado (Knowles et al., 1983).

Sabendo-se que o volume e a composição das secreções das vias aéreas são regulados, pelo menos em parte, por mecanismos de transporte ativo de íons através do epitélio respiratório, que a absorção de íons de Na^+ parece ser a força dominante e que este transporte contribui para as propriedades bioelétricas do epitélio, Bromberg e Boucher estudaram a DP no epitélio da via aérea de animais e de humanos *in vitro* e *in vivo* e demonstraram que as medidas são semelhantes entre animais e humanos e que são sempre negativas do lado luminal (Bromberg et al., 1979; Boucher et al., 1981). Os valores encontrados considerados normais variaram de -15 a -20 mV. Em 1981, Knowles e colaboradores da Universidade de Carolina do Norte, EUA, descreveram a técnica da medida da DP nasal e demonstraram que a medida da DP realizada na narina é paralela à das vias aéreas inferiores (Knowles et al., 1981b). A técnica descrita mediu a DP em várias regiões do epitélio nasal, incluindo a ponta anterior do corneto inferior, a superfície medial do corneto inferior, o assoalho da cavidade nasal e a superfície inferior do corneto inferior, através de eletrodo de medida de calomelano balanceado e um eletrodo de referência posicionado no subcutâneo em ponte com um voltímetro de alta impedância. O eletrodo de medida era perfundido através de um cateter com uma solução de Ringer a 0,2ml/min e o eletrodo de referência posicionado no subcutâneo com uma agulha fina preenchida por solução de Ringer em ágar a 4%. Os valores da DP basal foram medidos em dez pontos e a média dos valores considerada como a DPN basal. Para avaliação da resposta da DP à perfusão de drogas e soluções, um segundo cateter foi colocado em paralelo ao eletrodo de medida e posicionado abaixo do corneto inferior. As soluções foram instiladas e as variações da DP registradas. Durante o exame a cabeça do paciente era posicionada com o queixo para baixo de forma que as soluções escoassem da narina em um recipiente.

Knowles e colaboradores, ainda em 1981, demonstraram que a DP bioelétrica nasal medida através da técnica descrita pelo seu grupo estava aumentada no epitélio respiratório de portadores de FC, sendo a média da DP basal maior do que três desvios-padrão da média dos valores normais ($-53.0 \pm 1.8\text{mV}$ nos FC, $-24.7 \pm 0.9\text{mV}$ nos controles saudáveis e $-20.5 \pm 1.3\text{mV}$ nos controles doentes). Também demonstraram que ocorria uma redução maior da DP nos portadores de FC após perfusão do epitélio com amiloride, um inibidor da absorção de Na^+ ($73 \pm 3\%$ nos pacientes FC e $53 \pm 4\%$ nos controles) (Knowles et al., 1981a). Valores encontrados em pais e irmãos de portadores de FC (heterozigotos) não foram diferentes do grupo controle. Não foram encontradas diferenças com relação ao sexo ou idade. O registro contínuo da DP ao longo do corneto nasal, desde a porção anterior, onde o epitélio é escamoso, e em diversos sítios localizados até três centímetros para o interior da narina, abaixo do corneto inferior, onde o epitélio é colunar ciliado, demonstrou que as medidas na porção anterior são menores e similares entre normais e portadores de FC, aumentando de magnitude ao longo do corneto inferior, até um valor máximo a cerca de dois centímetros do interior da narina em ambos os grupos, sendo mais negativas nos portadores de FC. A magnitude da DPN estava relacionada a maior densidade de células ciliadas, sendo que na mucosa nasal abaixo da superfície inferior do corneto o epitélio é ciliado e morfologicamente similar ao epitélio das vias aéreas inferiores. A população de células da cavidade nasal de pacientes com FC não foi diferente da previamente relatada para indivíduos saudáveis (Knowles et al., 1981b). Medidas realizadas após abrasão da mucosa nasal aboliram a DP. Knowles et al. concluíram que a DPN aumentada e a maior redução da diferença de potencial em resposta ao amiloride encontrada nos portadores de FC deviam ser uma anormalidade epitelial inerente da FC mais do que consequência da doença crônica, visto ser detectada mesmo nos pacientes mais jovens. Não parecia estar relacionada à infecção, pois a mucosa nasal dos pacientes não estava infectada e a DPN não estava maior nos pacientes controles portadores de infecção pulmonar crônica. Outra conclusão dos pesquisadores foi que a DP maior na FC decorre de maior velocidade do transporte do Na^+ , uma vez que reflete a magnitude da corrente iônica e a condutância passiva do íon. Por sua vez, a corrente iônica está ligada ao transporte ativo permitindo, assim, que a magnitude da DP ajude a identificar a direção do transporte iônico. Correlação direta entre a velocidade de absorção de Na^+ e a DP foi observada em

alguns epitélios absorvedores de Na^+ e uma relação similar no epitélio respiratório de cães (Boucher et al., 1981). Consequentemente, como o Na^+ é o principal íon ativamente absorvido no epitélio nasal e das vias aéreas em humanos relacionou-se o aumento da DPN em pacientes com FC com o maior transporte de Na^+ .

A maior resposta da DP ao amiloride, um antagonista da absorção de Na^+ , sustentou esta conclusão. A resposta ao amiloride foi entre 25% a 30% do valor da DPN basal nos normais, sendo maior na FC. Uma simples redução na condutância iônica passiva da barreira do epitélio afetado pela FC não explicaria o achado, porque, de acordo com a lei de Ohm, a resposta da DP ao amiloride em pacientes e controles deveria ser proporcional, uma vez que diminuição equivalente ao fluxo ativo foi induzido em ambos os grupos. Desta forma, a ação aumentada do amiloride na FC implica em hiperabsorção do Na^+ na gênese da DP aumentada na FC. Embora as conclusões de Knowles et al fossem consistentes com o achado de quantidade diminuída de água nas secreções das vias aéreas na FC, eles não explicaram a presença da infecção pulmonar por bactérias específicas e nem a alteração nas glândulas sudoríparas (Knowles et al., 1981b).

Através deste estudo, Knowles foi pioneiro em sugerir que o teste de medida da DPN fosse empregado como teste diagnóstico para casos de FC não confirmados pela dosagem de eletrólitos no suor e considerar que a ação do amiloride poderia ter implicação terapêutica.

Estudo de Quinton sobre as propriedades elétricas das glândulas sudoríparas foi fundamental no conhecimento da patogênese da FC. Quinton identificou a incapacidade da membrana celular do epitélio do ducto sudoríparo reabsorver o Cl^- através da medida do potencial elétrico das glândulas sudoríparas em oito pacientes com FC e sete voluntários normais. A média do potencial elétrico em 47 glândulas sudoríparas de pacientes foi superior a encontrada em 39 glândulas dos controles (-66.3 ± 2.1 mV nos pacientes e -29.8 ± 3.2 mV nos controles normais ($P < 0,001$)), sendo possível calcular que a reabsorção de Cl^- e Na^+ nas glândulas sudoríparas dos pacientes é mais baixa do que nos controles e que a reabsorção do Cl^- é mais afetada do que a do Na^+ . O estudo sugeriu que a diminuição da permeabilidade epitelial ao Cl^- fosse a principal explicação para as alterações características do suor na FC e que esta poderia ser uma anormalidade

generalizada na doença (Quinton & Bijman, 1983). A partir de então, impermeabilidade ao Cl⁻ foi também demonstrada no epitélio da via aérea, no pâncreas, intestino delgado, cólon e reto.

Hay e Geddes demonstraram que a medida da DPN estável mais negativa na porção distal do corneto inferior é a que melhor discrimina o grupo de portadores de FC, com 67% dos valores da DPN acima da maior DP dos normais. Entretanto, foi observada uma pequena sobreposição de valores entre os grupos normais e FC, a qual não havia sido relatada por Knowles. Presença de patologia nasal ou posicionamento inadequado do eletrodo de medida na narina e dificuldades técnicas para realização do exame poderiam ter sido responsáveis por estas medidas. Desta forma o valor da DPN como teste diagnóstico foi questionado e considerado que a DPN não deveria substituir a dosagem de eletrólitos no suor para diagnóstico de FC (Hay & Geddes, 1985).

Gowen e colaboradores demonstraram que as alterações eletrofisiológicas da DPN estão presentes em recém-nascidos com FC submetidos ao teste após 48 horas de vida e que são similares aos valores obtidos em lactentes maiores (2 a 24 meses), crianças (> 6 anos) e adultos com FC. Os achados reforçaram a hipótese de que as alterações da DPN representam uma anormalidade intrínseca da função do epitélio respiratório na FC (Gowen et al., 1986).

Sauder e colaboradores conseguiram reproduzir os achados de Knowles e também sugeriram que a DP *in vivo* pudesse ser um instrumento adicional no diagnóstico de casos de FC. Contudo, algumas limitações foram descritas, como a influência da infecção das vias aéreas superiores e rinite alérgica aguda na medida da DPN, as quais podem abolir a DPN (DPN= zero) e a presença de cirurgia nasal prévia, a qual pode gerar valores da DPN menores, sugerindo que resultados falso-negativos podem surgir na presença destas situações. Resultados falso-positivos, porém, não foram relatados. Além disto, posicionamento adequado do eletrodo de medida na narina pode ser limitante nos pacientes pouco colaborativos. Os pesquisadores sugeriram que padronização do sistema de medida através do uso de eletrodos comercialmente disponíveis poderia melhorar a reprodutibilidade do teste e que cada laboratório deveria estabelecer seus próprios valores de referência para que o teste pudesse ser utilizado como ferramenta diagnóstica (Sauder et al., 1987).

Em 1987, Alton e colaboradores acrescentaram modificações na técnica da DPN para facilitar seu aprendizado e melhorar a tolerância dos pacientes ao teste. Os pesquisadores substituíram o cateter de duplo lúmen por uma sonda de Foley, a qual é mais macia e flexível, e posicionaram sua ponta no assoalho da narina, demonstrando que as medidas da DPN em portadores de FC eram significativamente diferentes e que adultos portadores de bronquiectasias e síndrome de Young tinham valores comparáveis aos descritos na população normal. A técnica foi considerada mais simples que a de Knowles e foi relatada melhor tolerância ao exame (Alton et al., 1987).

Wood e colegas realizaram a medida da DP brônquica no pulmão transplantado de pacientes com FC e outras patologias e observaram que a DP era similar entre os grupos em locais de medida equivalentes, mostrando que os defeitos epiteliais que levam à DP aumentada na FC não ocorrem no pulmão transplantado. Entretanto, na narina, a DP dos pacientes com FC permaneceu aumentada (Wood et al., 1989).

Em 1990, Alton e demais acrescentaram outras modificações para que o exame fosse melhor executado em crianças e adultos. O estudo foi realizado em 145 controles normais ou portadores de outras doenças e 60 portadores de FC. A nova técnica utilizava a sonda urinária de Foley para montagem do eletrodo de medida, preenchida por um gel condutor, e eletrodos de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) ligados a um voltímetro de alta impedância. A sonda era posicionada sem visualização direta ao longo do assoalho nasal, entre o septo nasal e a borda medial do corneto inferior. A novidade foi criar um local de potencial zero para o eletrodo de referência através de uma pequena abrasão na superfície epidérmica do antebraço usando um aparelho manual construído com uma broca dentária com ponta de diamante. O procedimento durava cerca de 5 segundos e não era doloroso. O eletrodo de referência contendo uma pequena quantidade de gel condutor era posicionado sobre esta área e fixado com fitas adesivas. Os valores da DPN máxima encontrados pela nova técnica no grupo controle tiveram distribuição normal, com média de -19 mV (variação de -2 a -36 mV). Nos portadores de FC a distribuição também foi normal com média de -46 mV (variação de -33 a -77 mV). A sensibilidade das medidas em comparação com os eletrólitos no suor foi 100% e

especificidade 99%. Nenhuma correlação foi encontrada entre os valores da DPN e o sexo, idade, medicações em uso ou concentração de Cl^- no suor. Medidas de gravidade da FC como função pulmonar e peso foram inversamente relacionados à DPN. Resultados normais foram descritos para portadores de bronquiectasias, portadores de síndrome de Young, asmáticos, hipertensos, portadores de sarcoidose, diabetes mellitus, doença celíaca, síndrome de Kartagener, rinite alérgica e heterozigotos para mutações da FC (Alton et al., 1990).

Alsuwaidan e colaboradores estudaram o efeito do exercício sobre a DPN através da realização de medidas da DPN antes, durante o exercício e após 20 minutos de repouso em indivíduos saudáveis e com FC e demonstraram que a DPN basal modifica-se em ambos os grupos, tornando-se mais negativa no grupo saudável e menos negativa no grupo FC ao término do exercício, de forma que os valores passam a ser semelhantes entre os grupos. Ao final do repouso, os valores retornaram ao normal, voltando a ser mais negativos no grupo FC. Entretanto, o mecanismo envolvido nestas alterações não foi bem esclarecido (Alsuwaidan et al., 1994).

O estudo de Middleton e colaboradores foi importante ao analisar e comparar os diferentes protocolos de avaliação dos defeitos de transporte iônico no epitélio nasal. Até então, os estudos haviam identificado que tanto a DPN basal quanto a despolarização do potencial (DP menos negativo) em resposta ao amiloride, droga bloqueadora do canal de Na^+ , são quantificadoras do distúrbio do transporte transmembrana de Na^+ . Porém, para avaliação da secreção de Cl^- via CFTR não havia uma definição. O estudo comparou três protocolos com soluções diferentes com o objetivo de demonstrar que o defeito da secreção do Cl^- é melhor mensurado na presença de uma solução com baixo conteúdo de Cl^- , com um bloqueador do Na^+ e com uma droga beta-agonista, que eleva o AMPc intracelular e ativa o funcionamento da CFTR. O uso de uma solução com baixo conteúdo de Cl^- e com amiloride gera um gradiente eletroquímico maior, induzindo o movimento do Cl^- através de canais abertos de Cl^- , uma vez que em situações normais a concentração de Cl^- extra e intracelular está em equilíbrio, resultando em otimização do efeito do beta-agonista sobre a CFTR. O protocolo 1 avaliou a resposta da DPN à solução eletrolítica de base com amiloride ($100\mu\text{M}$) e terbutalina ($10\mu\text{M}$), seguida

por solução com amiloride (100 μ M) e isoprenalina (10 μ M); o protocolo 2, a resposta do DPN à solução eletrolítica de base com amiloride (100 μ M) e isoprenalina (10 μ M), seguida por solução com amiloride (100 μ M) e terbutalina (10 μ M) e o protocolo 3 a resposta à solução eletrolítica com baixo conteúdo de Cl⁻ e amiloride (100 μ M), seguida por solução eletrolítica com baixo conteúdo de Cl⁻, amiloride (100 μ M) e isoprenalina (10 μ M). Os resultados mostraram que a hiperabsorção ao Na⁺ no epitélio nasal da FC pode confiavelmente ser avaliada pela DPN basal (DPN em não FC: -4 a -36mV e FC: -30 a -78mV, $p < 0,0001$) e pela variação absoluta da DPN em resposta à solução com amiloride (Δ amiloride não FC: -5 a -14mV e FC: -12 a -46mV, $p < 0,0001$) e que o protocolo 3 foi o melhor protocolo para avaliação da secreção de Cl⁻: $\Delta \emptyset \text{Cl} + \text{Iso}$ não FC: 20 a 40mV; na FC: -5 a 4mV, $p < 0,05$. Os autores concluíram que a realização da medida da DPN com instilação nasal sequencial de soluções com amiloride, sem cloro e isoproterenol é a mais apropriada para avaliação *in vivo* dos defeitos de transporte de Na⁺ e Cl⁻ na FC e que o defeito na secreção do Cl⁻ pode ser claramente mensurado pelo protocolo, podendo ser inclusive confiavelmente utilizado para avaliação da resposta aos novos tratamentos da FC, em especial a terapia gênica (Middleton et al., 1994).

Knowles e colaboradores fizeram uma revisão sobre as técnicas e protocolos da DPN para avaliação da eficácia da transplante genético na FC. Desde a clonagem do gene da FC em 1989 e o desenvolvimento de vetores de transferência genética o epitélio da via aérea havia se tornado alvo importante para o desenvolvimento dos primeiros ensaios clínicos sobre a terapia genética, sendo importante ter um teste da DPN padronizado. Com respeito aos aspectos técnicos da medida da DPN basal, tanto a ponte realizada em meio líquido quanto em ágar sólido foram considerados adequados, assim como o posicionamento do eletrodo de referência no subcutâneo ou sobre a pele escarificada. O uso de voltímetros comerciais de alta impedância foi considerado seguro e adequado. Fármacos e soluções de diferentes composições iônicas a serem instiladas na narina deveriam ser aquecidas a uma temperatura similar à temperatura corporal (entre 35-37°C) e a velocidade de infusão ser adequada. O fluxo empiricamente estabelecido em 5ml/min mostrou uma resposta máxima à secreção sem Cl⁻ em 3 minutos em pessoas normais. A localização anatômica de medida da DP na cavidade nasal mostrou influencia significativa sobre o valor encontrado, uma vez que a magnitude

da DPN basal parece estar diretamente relacionada à presença de células epiteliais colunares diferenciadas em maior densidade, ou seja, é maior na superfície inferior do corneto inferior (o epitélio nasal apresenta amplo espectro morfológico conforme a região da cavidade nasal e variabilidade na densidade de células epiteliais colunares, sendo a porção anterior do corneto inferior recoberta por um epitélio escamoso, a superfície medial do corneto inferior por um epitélio cuboidal, a superfície inferior por epitélio ciliado bem diferenciado e o assoalho do corneto por um epitélio de morfologia intermediária entre a superfície medial e inferior do corneto). Da mesma forma, a magnitude das respostas às drogas infundidas parece ser menor nas regiões nasais onde o epitélio é menos diferenciado. Além dos efeitos da morfologia sobre a DPN, o estado da mucosa nasal no momento do exame também influencia significativamente o resultado. Danos não específicos à mucosa aumentam a permeabilidade das rotas iônicas paracelulares, diminuindo todos os parâmetros bioelétricos, incluindo a DPN basal e a magnitude das respostas às drogas e/ou substituição de íons. Medidas da DPN basal em voluntários normais que receberam instilação nasal de rinovírus mostraram redução de cerca de 25% da medida após 48 horas da instilação do vírus, enquanto as medidas permaneceram iguais nos que receberam instilação de solução placebo. Assim, a sensibilidade da DPN basal na avaliação do transporte de Na^+ pareceu ser alta, mas sua especificidade foi relativamente baixa. A média da DPN basal de pacientes com FC é aproximadamente duas vezes maior que a DPN basal de controles e há relativamente pouca sobreposição dos valores entre normais e FC. Medidas realizadas em uma narina, mais do que a média das medidas de ambas as narinas, apresentam sobreposição maior, mas também discriminaram os portadores de FC (Knowles et al., 1995).

Segundo Knowles, a análise da variação absoluta da DPN em resposta à solução com amiloride é de valor na avaliação do transporte de Na^+ , embora lesão do epitélio também reduza a magnitude da resposta. Com relação à medida da permeabilidade basal do Cl^- , a resposta da DPN à solução sem Cl^- parece ser o melhor parâmetro de avaliação. Poucos pacientes com FC exibem hiperpolarização secundária à substituição luminal do Cl^- . Assim a ausência de resposta da DPN à solução sem Cl^- parece ser altamente sensível para FC. Entretanto, alguns indivíduos normais podem não apresentar hiperpolarização significativa tornando

esta resposta pouco específica. Regulação da secreção do Cl⁻ por beta-agonistas parece ser a melhor medida *in vivo* para esta análise, desde que realizada na presença de um gradiente eletroquímico gerado pela solução sem Cl⁻ associada ao amiloride. Hiperpolarização transitória do potencial após instilação de solução sem Cl⁻, com amiloride e isoproterenol pode ocorrer em alguns pacientes FC, devido ao fluxo do cálcio (Ca⁺⁺) intracelular induzido pelo AMPc. Esta resposta tipicamente inicia rápido e retorna ao basal em 2 a 3 minutos, à medida que os estoques de Ca⁺⁺ intracelular se esgotam. Em contraste, a secreção de Cl⁻ pelo CFTR em resposta ao isoproterenol tem um início mais lento e prolongado, sendo que a melhor discriminação entre FC e normal ocorre após 3 a 5 minutos da administração do isoproterenol. A soma da resposta à solução sem Cl⁻ e da resposta ao isoproterenol é a medida mais altamente discriminatória entre normais e FC, visto que é ampla e aditiva entre os normais e pequena e não aditiva entre os portadores de FC. Adição de ATP ao final do protocolo serve como um marcador útil para detectar a capacidade do tecido secretar Cl⁻, uma vez que o ATP estimula a secreção do Cl⁻ por canais alternativos. Esta resposta está aumentada nos portadores de FC, sendo aproximadamente a metade nos normais, podendo servir como um índice indireto do grau de restauração da função do CFTR mediada pela transferência genética (Knowles et al., 1995)

Delmarco e colaboradores estudaram a DPN basal através da técnica descrita por Alton em pacientes com manifestações clínicas compatíveis com FC, dosagem de eletrólitos no suor limítrofes e pesquisa genética não conclusiva. Delmarco relatou pesquisa genética falso-negativa em 10 a 30% dos casos dependendo da área geográfica estudada. Delmarco concluiu que a medida da DPN basal foi suficiente para definir o diagnóstico nestes pacientes e que os protocolos de resposta às soluções não seriam necessários, devendo ser destinados às pesquisas, justamente na monitorização da resposta à terapia gênica (Delmarco et al., 1997)

Hofmann e colaboradores avaliaram a DPN através do método modificado de Alton com eletrodo epicutâneo e mostraram que os resultados tinham utilidade diagnóstica similares à técnica convencional. A sensibilidade diagnóstica da medida da DPN em uma única narina foi 91,3% e a especificidade 96,4% (DPN normal

(média \pm DP): $-17,9 \pm 0,8$ mV; DPN FC: $-47,8 \pm 1,5$ mV). Segundo os autores o uso do eletrodo epicutâneo reduz o risco de infecção associado ao uso de eletrodo subcutâneo e melhor a cooperação do paciente no teste, o que permitiria repetir a DPN quando necessário comprovação. Porém, os achados sugeriram que a DPN não é um valor constante. Medidas repetidas da DPN mostraram modestas discrepâncias intra-sujeito, as quais poderiam resultar de dificuldades no posicionamento do eletrodo de medida ou traumatismos leves com repercussão na integridade da mucosa nasal. Inflamação alérgica ou infecciosa, variações hormonais, climáticas e do ambiente também poderiam influenciar na medida da DPN basal. Valores de DPN menos negativos em pacientes com suspeita de FC na presença de sintomas nasais devem ser confirmados e a interpretação do resultado ser cautelosa. Em casos cujos valores da DPN também foram duvidosos o exame deve ser repetido pelo menos duas vezes durante um período sem infecção ou inflamação presente. Nestas condições, a sensibilidade e especificidade do método são maiores de 90% (Hofmann et al., 1997).

Wilschanski e colaboradores estudaram a DPN em pacientes portadores de FC clássica, FC atípica e pacientes portadores de FC questionável. Os pacientes apresentavam somente características parciais da FC, em geral com doença pulmonar mais leve, suficiência pancreática, manutenção da fertilidade masculina e dosagens de eletrólitos no suor normais ou entre valores intermediários. A DPN foi realizada de acordo com a técnica de Knowles e foi utilizado o protocolo de Middleton. Os valores da DPN basal e da resposta ao amiloride dos pacientes com FC atípica foram normais ou intermediários (média \pm DP: -35 ± 16 mV e 25 ± 10 mV, respectivamente), mas a condutância ao Cl⁻ foi caracteristicamente anormal, mesmo que residual (0 ± 2 mV). O parâmetro que melhor discriminou os portadores de FC atípica foi o índice da exponencial entre a razão da resposta a solução sem Cl⁻ e isoproterenol sobre a resposta ao amiloride ($e^{(\Delta\emptyset_{Cl^-} + \Delta_{Iso}/\Delta_{amil})}$). O parâmetro levou em conta, portanto, tanto o transporte de Cl⁻, expresso pela soma da resposta a solução sem Cl⁻ e ao isoproterenol, quanto o de Na⁺, expresso pela resposta ao amiloride, sugerindo que o protocolo completo do teste deve ser realizado antes da FC ser excluída e confirmando que a resposta secretória do Cl⁻ tem alta sensibilidade e especificidade na diferenciação entre normais *versus* FC ou FC atípica, embora secreção residual possa estar presente. De acordo com a análise estatística, ponto

de corte da exponencial > 0.7 , que equivale a razão entre a resposta a solução sem Cl^- e isoproterenol, sem o exponencial > -0.35 , é diagnóstico de FC. A aplicação destes critérios ao grupo de pacientes com FC questionável conseguiu discriminar um grupo com valores semelhantes aos da FC atípica, porém significativamente diferentes dos da FC clássica. Este grupo de pacientes também mostrou valores de Cl^- no suor mais elevados e uma maior incidência da presença de duas mutações da CFTR. As conclusões do estudo foram que os valores dos parâmetros da DPN devem ser determinados em cada laboratório e que pacientes com suspeita de FC e DPN anormal devem ter FC atípica (Wilchanski et al., 2001).

Southern e grupo, com a colaboração de Knowles, descreveram uma técnica modificada para medida da DPN em lactentes. A técnica utilizava um cateter com calibre menor para montagem do eletrodo de medida (PE10 *versus* PE50), fluxos das soluções de teste mais lentos (0,2 - 1 ml/min *versus* 5 ml/min da técnica padrão) e um período menor de exposição às soluções testadas. A concentração das drogas nas soluções foi mantida (amiloride a 10^{-4} mol/L e isoproterenol a 10^{-5} mol/L), entretanto foi suprimida a fase da DPN que testa a resposta à solução sem Cl^- , com amiloride e sem isoproterenol para diminuir o tempo total do exame. As medidas foram realizadas com o bebê acordado, deitado de lado, envolto em uma coberta e, em geral, após uma mamada. Como o corneto inferior não está completamente desenvolvido nos lactentes menores de três meses, foi utilizada a margem lateral do assoalho nasal para posicionamento do cateter. Os resultados obtidos mostraram que as técnicas são comparáveis em diferenciar os portadores de FC, embora não houvesse poder estatístico para afirmar que fossem equivalentes. O teste foi bem tolerado pelos lactentes. Os autores sugeriram que a técnica modificada poderia ser utilizada em lactentes para diagnóstico de FC, justamente na fase onde a coleta de eletrólitos no suor pode ser difícil pela quantidade insuficiente de suor (Southern et al., 2002).

Gaillard e colaboradores, entretanto, descreveram que a medida da DPN realizada nas primeiras 24 horas de vida não têm valor diagnóstico. Exames realizados em 3 recém-nascidos no primeiro dia de vida mostraram valores elevados de DPN basal (-47 mV, -49 mV e -51 mV) e resposta a solução sem Cl^- menor que -5mV, em bebês que não apresentaram evolução clínica condizente com FC. Os

autores relataram que estes valores da DPN refletem alterações fisiológicas normais de adaptação da via aérea para respiração no meio gasoso, com atividade aumentada do canal de Na⁺ para absorção do líquido da via aérea. O transporte de íons na via aérea tem um papel crítico, uma vez que o crescimento do pulmão fetal é dependente da produção de líquido gerado através de secreção ativa de Cl⁻. No último trimestre da gestação, a produção de líquido diminui e no momento do nascimento ocorre uma reversão imediata de secreção para absorção do líquido pulmonar mediada pela absorção ativa de Na⁺ através dos canais ENaC. Desta forma, medidas da DPN nos primeiros dias de vida refletem a atividade aumentada do canal ENaC e a transição do epitélio de secretor para absorptivo, não significando disfunção permanente dos canais iônicos (Gaillard et al., 2002).

Comparação entre as técnicas de medida da DPN e de coleta de eletrólitos no suor em quatro centros diferentes foi realizada por Ahrens et al., visto que os testes estavam sendo utilizados para avaliação da eficácia dos novos tratamentos da FC. Os pesquisadores observaram variabilidade tanto nas medidas da DPN quanto no teste do suor, comprometendo a reprodutibilidade dos métodos e concluíram que os protocolos de medida deviam ser melhor padronizados, que os responsáveis pela realização dos testes deveriam ser melhor treinados e receber certificação para tal. Com relação à DPN, consideraram importante que a capacidade de impedância do voltímetro fosse padronizada, assim como a composição, velocidade de infusão e a temperatura das soluções (Ahrens et al., 2002).

Um método modificado da DPN, onde o paciente realiza o exame na posição supina e as soluções são instiladas na narina com um fluxo reduzido, sendo deglutidas pelo examinado, foi comparado com o método clássico por Leal e colaboradores. Os métodos se mostraram similares, sendo o modificado considerado mais prático, porque permitia sua execução mesmo em crianças pequenas, as quais eram posicionadas no colo dos pais, e higiênico, porque as soluções instiladas na narina eram deglutidas pelo próprio paciente, evitando contaminação do ambiente pelos microrganismos dos pacientes com FC. Embora a instilação nasal envolvesse a deglutição das drogas testadas, as doses empregadas foram consideradas farmacologicamente insignificantes, uma vez que a dose

empregada do amiloride equivale a 1/5 de comprimido, enquanto o isoproterenol é transformado em um derivado inativo através do mecanismo de primeira passagem na parede intestinal e no fígado. Entretanto, como as drogas podem cruzar a barreira placentária ou serem secretadas no leite materno, não se aconselhou realizar o teste em gestantes e lactantes. A DPN máxima obtida pelo método modificado em 21 pacientes portadores de FC ($-44,9 \pm 2,5$ mV) foi significativamente diferente dos grupos controles doentes ($-18,1 \pm 1,6$ mV) e sadios ($-17,2 \pm 1,1$ mV). Despolarização após amiloride também diferenciou os pacientes com FC ($25,9 \pm 1,4$ mV) dos controles ($10,5 \pm 0,9$ e $8,1 \pm 0,7$ mV) e marcada repolarização após isoprenalina em solução sem Cl⁻ e com amiloride foi vista nos grupos controle ($-15,7 \pm 1,1$ e $-15,3 \pm 1,1$ mV) (Leal et al., 2003).

Boyle e colaboradores realizaram um estudo multicêntrico para comparar o efeito da temperatura da solução sobre as medidas da DPN. Teoricamente, soluções instiladas na narina durante o teste numa temperatura próxima a corporal (37°C) maximizam a resposta do Cl⁻ AMPc mediada. Como a resposta ao Cl⁻ é um componente fundamental na avaliação da eficácia das terapias corretoras da CFTR, a qual se encontra entre valores tão baixos quanto 2 a 5 mV, técnicas que maximizam sua sensibilidade e reprodutibilidade são essenciais. O estudo foi realizado em trinta e dois voluntários sem FC, sem doença pulmonar ou sinusal, rinite aguda ou infecção prévia das vias aéreas inferiores no mês prévio e não gestantes. Cada participante foi submetido a medida da DPN nas duas narinas em duas ocasiões distintas no intervalo de duas semanas: em uma foi utilizada a solução a $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ e na outra solução a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados mostraram que a DPN basal, a resposta ao amiloride e a resposta a solução sem Cl⁻ não foram afetadas pelo aquecimento da solução. Em contraste, a resposta ao isoproterenol foi significativamente alterada: na temperatura ambiente a resposta ao isoproterenol foi $-6,9 \pm 6,4$ mV e com o aquecimento, $-13,3 \pm 8,8$ mV ($p < 0,01$). Este aumento resultou em significativa diferença da resposta total ao Cl⁻ ($-16,9 \pm 9,5$ mV VS $-21,3 \pm 11,9$ mV, $p=0,01$) representando aumento de 26%. Após este estudo, o aquecimento da solução passou a ser uma recomendação da *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) para padronização da DPN (Boyle et al., 2003).

Em 2004, um grupo de pesquisadores da Alemanha, França, Israel e Bélgica, acompanhados pelo norte-americano Knowles publicou um protocolo básico para medida da DPN, com dicas práticas para controle de qualidade e resolução de problemas. O grupo afirmou que a medida da DPN é possível em lactentes e crianças. O exame pode ser realizado com uso de eletrodos de Ag/AgCl ou de calomelano, os quais se mostraram equivalentes, conectados a um voltímetro de alta impedância e em ponte, sendo o eletrodo de medida posicionado na mucosa nasal, montado em cateter de duplo lúmen, e o eletrodo de referência posicionado no subcutâneo. A ponta do cateter para medida deve ser colocada abaixo do corneto inferior. As soluções para estudo da resposta podem ser aplicadas via cateter de medida. Para cada solução, a DPN deve ser medida por pelo menos 3 minutos pós-amilorida ou isoproterenol e por 5 minutos após troca para solução sem Cl⁻. Se uma leitura estável não for obtida durante este período deve-se prolongar o registro. Todas as soluções devem ser perfundidas a 5ml/min, embora fluxos menores possam ser utilizados, entre 1,5 e 5ml/min, mesmo que associados a maior variabilidade. O pH da solução deve ser de 7,4, podendo variar entre 7,0 e 7,6. As soluções eletrolíticas podem ser refrigeradas por três meses ou congeladas por até seis meses. As soluções com as drogas ativas devem ser preparadas até duas horas antes do exame. Antes do uso todas as soluções devem ser filtradas. Os dados devem ser registrados continuamente através de programas computadorizados. Antes do início do teste a voltagem do sistema deve ser zerada (*offset*) e checada ao final do exame. Se a voltagem tiver mais de 5 mV de diferença, o exame deve ser considerado inválido (Schuler et al., 2004).

Standaert e colaboradores avaliaram as diferenças entre as medidas da DPN executadas em oito centros americanos que utilizavam os procedimentos padronizados pela CFF para execução do teste em estudos colaborativos. As variáveis consideradas foram o tipo de voltímetro, o tipo de cateter de medida, os eletrodos e a composição das soluções, sequência e duração da perfusão para avaliar o transporte de Na⁺ e Cl⁻. Os autores concluíram que apesar de pequenas diferenças, o procedimento foi capaz de diferenciar os portadores de FC em todos os centros, que foi seguro e sensível, podendo ser facilmente implantado em diferentes centros desde que o operador seja treinado, tenha prática suficiente e a interpretação dos resultados seja rigorosa e padronizada. Variabilidade entre os

exames da narina direita e esquerda deve ser a mínima possível, embora assimetria da anatomia nasal seja comum e possa gerar valores diferentes (Standaert et al., 2004).

Yaakov e demais colaboradores avaliaram a reprodutibilidade da DPN em 68 pacientes com FC que realizaram medidas repetidas em um intervalo de 2 a 4 semanas. Eles encontraram valores similares da DPN basal, resposta ao amiloride e ao isoproterenol tanto em portadores de FC clássica quanto atípica. Os autores concluíram que há reprodutibilidade da DPN quando executada em um único centro. Como o período de tempo entre as medidas foi variável, o achado reforçou a reprodutibilidade do método (Yaakov et al., 2007)

2.3.3. Medida da Corrente Intestinal

Medida da corrente intestinal (MCI) em biópsias de reto por sucção ou por fórceps usando microcâmaras de Ussing foram introduzidas há cerca de duas décadas por alguns pesquisadores como um novo método diagnóstico *ex vivo* para FC. Assim como a DPN, o teste foi inicialmente empregado em pesquisas sobre a determinação da função da CFTR, por sua capacidade em avaliar as anormalidades no transporte de Cl⁻ através do epitélio intestinal (Taylor et al., 2009).

O principal papel do epitélio do trato intestinal é absorver os nutrientes, eletrólitos e água. Assim como transportam substâncias do lúmen para o sangue, as células epiteliais intestinais (enterócitos) também secretam eletrólitos, como Cl⁻ e HCO₃⁻, e água. O CFTR está presente em abundância no epitélio intestinal, localizado na membrana luminal dos enterócitos, incluindo as células crípticas do cólon distal, onde a proteína serve como a principal, se não for a única, via de efluxo eletrogênico dependente de AMPc para os íons Cl⁻. Na FC, a secreção do Cl⁻ está diminuída, enquanto a absorção de Na⁺ e de nutrientes ligados ao Na⁺ estão aumentadas. Como o mecanismo de secreção do Cl⁻ é eletrogênico sua atividade pode ser monitorada pelas modificações na medida da corrente intestinal transepitelial. No intestino da FC, sua atividade não é sujeita aos efeitos da

inflamação, hemorragia ou infecção como é visto na via aérea (De Boeck et al., 2011).

As medidas da corrente intestinal são realizadas no tecido da mucosa intestinal ou colônica obtidos por biópsia. O tecido é montado em uma câmara de Ussing e a atividade elétrica transepitelial é expressa como uma corrente de curto-circuito e a resposta a substâncias secretogogas podem ser testadas. O epitélio intestinal normal responde com aumento seguido de uma reflexão da corrente quando ocorre secreção de Cl⁻ estimulada pelos secretogogos. Na FC, esta resposta está alterada pela ausência do movimento do Cl⁻.

Desde sua descrição, a MCI tem se desenvolvido como mais uma ferramenta importante para auxílio diagnóstico nos casos de FC com sintomas leves e subclínicos e resultados no suor duvidosos e em pacientes com mutações da CFTR raras ou desconhecidas. A MCI também tem sido empregada em estudos sobre a correlação genótipo-fenótipo, para monitorar a ação dos genes modificadores no epitélio intestinal e para avaliar a eficácia e especificidade das novas terapêuticas direcionadas a correção da CFTR (De Boeck et al., 2011).

As vantagens da MCI em relação à DPN incluem a possibilidade da realização do exame em qualquer idade, permitindo seu uso em crianças identificadas pela triagem neonatal, a ausência de influência de processos virais, a facilidade para testar novas terapias direcionadas a CFTR no epitélio intestinal humano *ex vivo* sem riscos para o paciente e a habilidade de detectar quantidades muito baixas (entre 10-20%) de CFTR funcionalmente ativo. Por outro lado, casos com mutações CFTR associadas com perda de função menor podem não ser detectados pela MCI. Além disto, a MCI é menos empregada que a DPN e a técnica menos padronizada, com maior variabilidade entre os centros. O custo do procedimento é mais levado que a dosagem de eletrólitos no suor e a DPN. Estudo colaborativo entre os centros europeus e americanos em andamento deverá refinar a metodologia e padronizar as medidas de acordo com um protocolo comum para validação da MCI (Beekman et al, 2014)

2.4. FIBROSE CÍSTICA

Fibrose cística é uma doença genética autossômica recessiva causada pela mutação no gene CFTR responsável pela codificação da glicoproteína CFTR (Riordan et al., 1989; Bear et al., 1992; Kerem, 2005). É encontrada predominantemente em populações caucasianas de ancestralidade europeia. A incidência da FC nos Estados Unidos é de aproximadamente 1:3.500 recém-nascidos (Farrell et al., 2008). No Brasil, a incidência é variável conforme a região geográfica e grau de miscigenação das populações, sendo maior no estado do Rio Grande do Sul, cerca de 1: 1.600, e menor no estado de São Paulo, cerca de 1: 32.000 (Raskin et al., 2008). A FC tem evolução fatal, caso não seja devidamente tratada.

O fenótipo clínico da doença tem sido descrito como clássico ou atípico, e mais recentemente alguns casos, anteriormente considerados atípicos, têm sido descritos como doença associada ao CFTR. FC clássica é definida pela presença de doença pulmonar obstrutiva progressiva, insuficiência pancreática e suor salgado. Casos de FC atípicos não apresentam os sintomas clássicos em conjunto. Geralmente apresentam insuficiência pancreática, doença pulmonar leve ou ausente e níveis de cloro no suor normais ou limítrofes. Outros casos atípicos podem se apresentar pelo predomínio de uma única condição clínica, como por exemplo, anormalidades eletrolíticas, pancreatite, doença hepática, sinusite ou azoospermia obstrutiva. Nestes casos a demonstração das mutações associadas à FC nos 2 alelos ou a demonstração *in vivo* do transporte de íons anormal através do epitélio nasal pode ser de auxílio diagnóstico. FC atípica representa 2% a 10% de todos os casos de FC (Rosenstein & Cutting, 1998; Farrell et al., 2008; De Boeck et al., 2006).

A relação entre gravidade e progressão da doença e o genótipo é complexa e ainda não totalmente compreendida. Em geral, mutações da CFTR que preservam algum grau de função estão associadas a fenótipos mais leves ou apresentação clínica mais tardia, tendendo a proteger contra as consequências mais graves, especialmente insuficiência pancreática, íleo meconial, doença hepática, diabetes e em menor extensão contra doença pulmonar grave (Gilljam et al., 2004).

Na realidade, a expressão da doença pulmonar é a mais variável de todas as manifestações da doença devido a interações mais complexas entre gene e ambiente (Vanscoy et al., 2007). Mutações que afetam a síntese da CFTR, processamento ou ativação, como deltaF508, G542X e G551D, são classificadas como “graves” e estão associadas ao fenótipo clássico da FC.

Os sintomas da FC decorrem em sua maior parte das consequências produzidas pela obstrução dos ductos glandulares dos órgãos acometidos por secreções espessas produzidas pelo defeito da CFTR e podem estar presentes desde o nascimento ou mesmo antes, como no caso da obstrução intestinal fetal (Tabela 1). Cerca de metade dos casos são diagnosticados por queixas respiratórias: tosse, sibilância e/ou taquipnéia. O sintoma mais frequente é a tosse. A evolução da doença pulmonar é a principal causa de morbidade e mortalidade na FC. A maior parte dos casos é diagnosticada no 1º ano de vida; entretanto, em torno de 8% dos casos são diagnosticados somente após os 10 anos de idade e um número crescente de casos estão sendo diagnosticados em adultos. O diagnóstico da FC é essencialmente clínico, porém casos detectados pela triagem neonatal podem ser diagnosticados mesmo antes do início dos sintomas (Gibson et al., 2003).

O diagnóstico clínico da FC é baseado em uma combinação de características clínicas específicas associado à evidência da disfunção da CFTR, normalmente através da dosagem de eletrólitos no suor elevados (De Boeck et al., 2006). Quase todos os pacientes com FC têm doença sinusopulmonar crônica e os homens pós-púberes têm azoospermia obstrutiva. Aproximadamente 85% a 90% dos pacientes têm insuficiência pancreática exócrina (Rosenstein, 1998b).

Alguns grupos de estudo sobre o diagnóstico de FC têm proposto algoritmos para um processo diagnóstico estruturado, como por exemplo, o algoritmo do Grupo Europeu demonstrado na figura 7, onde o teste da DPN é fundamental para definição diagnóstica. O algoritmo inicia pela dosagem de eletrólitos no suor em pacientes com sintomas suspeitos de FC e finaliza em três possibilidades: FC improvável, Disfunção do CFTR (FC não clássica ou atípica) e FC clássica. Se os valores no suor forem normais ou limítrofes o processo diagnóstico deve ser mantido caso os sintomas persistirem ou forem altamente suspeitos como na pancreatite ou doença pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*. Sempre que o

algoritmo terminar em “FC improvável” recomenda-se investigar diagnósticos alternativos, tais como discinesia ciliar, imunodeficiência humoral e síndrome de Shwachman. Pacientes com identificação de disfunção da CFTR podem ter FC atípica ou não-clássica e devem seguir acompanhamento clínico (De Boeck et al., 2006).

Tabela 1 – Manifestações clínicas sugestivas de fibrose cística

Altamente sugestivas
Manifestações gastrointestinais Íleo meconial Insuficiência pancreática exócrina em crianças Manifestações sinusopulmonares Infecção respiratória persistente por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide Bronquiectasias em ambos os lobos superiores Infecção respiratória persistente por <i>Burkholderia cepacia</i> Pólipos nasais em crianças Outros Alcalose hipoclorêmica na ausência de vômitos Agenesia congênita de vasos deferentes bilateral
Sugestivas mas menos específicas
Manifestações gastrointestinais Deficit de crescimento Hipoproteinemia Deficiência de vitaminas lipossolúveis Síndrome da obstrução intestinal distal Prolapso retal Cirrose biliar Hipertensão porta Colelitíase em crianças sem doença hemolítica Colangite esclerosante primária Insuficiência pancreática exócrina em adultos Manifestações sinusopulmonares Infecção respiratória persistente ou recorrente por <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Achromobacter xylosoxidans</i> ou <i>Haemophilus influenzae</i> Evidências radiológicas de bronquiectasias, atelectasias, hiperinsuflação ou infiltrados pulmonares Hemoptise associada a doença pulmonar difusa, exceto tuberculose ou vasculite Tosse crônica e/ou produtiva Aspergilose broncopulmonar alérgica Pólipos nasais em adultos Evidencia radiológica de pansinusite crônica Outros Baqueteamento digital Osteopenia/osteoporose < 40 anos de idade Diabetes atípico

Extraída de De Boeck et al., 2006.

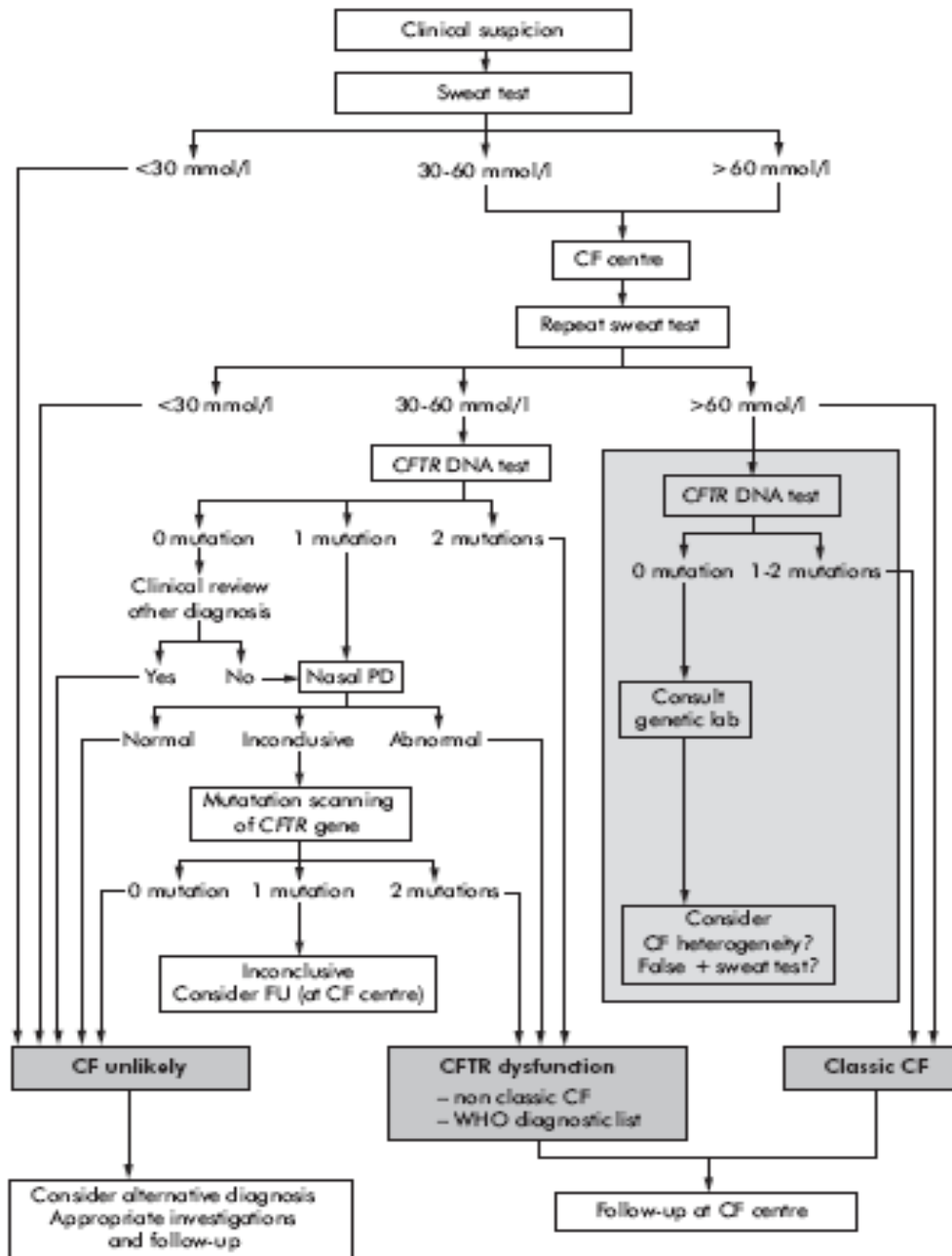


Figura 7. Algoritmo de diagnóstico estruturado proposto pelo Grupo Europeu sobre Diagnóstico de FC. *In:* De Boeck, K et al., 2006.

2.4.1. Aparelho Digestivo

Íleo meconial – cerca de 15% a 18% dos pacientes com FC apresentam-se com íleo meconial logo após o nascimento, secundário a impactação de mecônio viscoso no íleo. Os recém-nascidos irão apresentar distensão abdominal, eliminação de fezes viscosas em pequena quantidade ou nenhuma e vômitos biliosos. A radiografia abdominal mostra alças intestinais dilatadas acima da obstrução, em geral sem níveis hidroaéreos, e imagem de aspecto granuloso na área do íleo, indicando a mistura de ar com o mecônio. Aproximadamente 50% dos casos são complicados por peritonite, volvulo, atresia, necrose, perfuração ou formação de pseudocisto. A maioria dos pacientes tem insuficiência pancreática. Entre os neonatos a termo com íleo meconial 98% apresentam FC e devem assim ser tratados até que o diagnóstico seja estabelecido. Outra alteração intestinal que pode ocorrer no período neonatal e que sugere FC é a eliminação tardia de mecônio, sem os sintomas obstrutivos (Rosenstein, 1998).

Prolapso retal – na ausência de parasitoses, é um sinal muito sugestivo de FC e indica a realização de um teste do suor. O prolapso ocorre em cerca de 20% dos pacientes, em geral nos primeiros 5 anos de vida (Rosenstein, 1998).

Doença hepática – neonatos com FC podem se apresentar com icterícia colestática prolongada, presumivelmente devido à obstrução dos ductos biliares extra-hepáticos por bile espessa e estase biliar intra-hepática. As características clínicas e laboratoriais podem mimetizar atresia biliar. Aproximadamente 50% dos casos ocorrem em associação com íleo meconial ou passagem tardia de mecônio. Além do período neonatal, a doença hepática pode se manifestar em qualquer faixa etária. A lesão característica é a cirrose biliar focal que evolui com hipertensão portal. Raramente é a primeira manifestação da doença, pois costuma ter um curso clínico prolongado e silencioso, sendo geralmente detectada nos pacientes já em acompanhamento (Rosenstein, 1998).

Insuficiência pancreática exócrina - cerca de 2/3 dos císticos nascem com insuficiência pancreática, ou seja, função pancreática menor que 10%. Os outros 1/3 dos pacientes permanecerão pancreático-suficientes (10% a 15% dos pacientes) ou vão se tornar insuficientes ao longo do 1º ano de vida. As alterações patológicas no

pâncreas incluem obstrução dos ductulos proximais, pouco desenvolvimento e destruição das células acinares, fibrose, infiltração gordurosa e formação de microcistos com eventual destruição do tecido pancreático exócrino funcionante. Pode ocorrer estenose dos ductos maiores, formação de cálculos e calcificações. Devido a estas alterações a liberação das enzimas digestivas pelo pâncreas fica prejudicada levando à deficiente digestão intraluminal e má absorção. Os sintomas de má absorção se manifestam clinicamente por fezes volumosas e mal formadas, fétidas, oleosas, flatulência, dor, distensão abdominal e baixo ganho de peso. Prolapso retal associado pode ocorrer. Até o momento, a suficiência pancreática é o fenótipo que melhor se correlaciona com o genótipo, ou seja, presença de suficiência pancreática está associada a mutações das classes IV e V as quais apresentam ainda um grau de CFTR funcionante (Rosenstein, 1998).

Outras manifestações gastrointestinais da FC incluem intussuscepção, pancreatite, refluxo gastresofágico e impactação mucóide do apêndice. Uma variedade de apresentações relacionadas à deficiência de proteínas, vitaminas, minerais ou gorduras podem sugerir FC. Lactentes com FC podem apresentar edema, hipoproteinemia, anemia, hepatomegalia, alteração das provas de função hepática e *rash* cutâneo (acrodermatite enteropática). Deficiência de vitaminas lipossolúveis podem resultar em abaulamento da fontanela (vitamina A), anemia hemolítica (vitamina E) e complicações hemorrágicas (vitamina K). (Rosenstein, 1998).

2.4.2. Aparelho Respiratório

A idade do início dos sintomas respiratórios é muito variável. Podem surgir já no período neonatal, mas podem não ocorrer até os 10 a 20 anos de idade. Geralmente o 1º sintoma é tosse persistente, que pode inicialmente ser seca e tornar-se aos poucos produtiva, com eliminação de escarro mucóide a francamente purulento. Lactentes frequentemente apresentam quadros compatíveis com bronquiolites de repetição e disfunção respiratória mantida, sendo posteriormente erroneamente diagnosticados como asmáticos. A radiografia destes pacientes pode inicialmente apresentar apenas sinais de hiperinsuflação e espessamento brônquico, mas com o tempo podem surgir atelectasias segmentares ou lobares particularmente do lobo superior direito o que é altamente sugestivo de FC. O

achado de bronquiectasias é mais tardio. Baqueteamento digital pode se desenvolver mesmo em bebês jovens e sua presença pode ser uma pista para o diagnóstico. Isolamento de bactérias características da FC como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* mucóide e não mucóide, *Haemophilus influenzae* e *Burkholderia cepacia* em material do trato respiratório alertam para o diagnóstico.

FC deve ser considerada em todo paciente com achados crônicos ou recorrentes do trato respiratório inferior tais como pneumonia prolongada ou recorrente, bronquite, bronquiectasias, atelectasias, asma refratária e empiema (De Boeck et al., 2006; Farrell et al., 2008).

Trato respiratório superior – presença de pólipos nasais em crianças é sempre uma indicação para realização do teste do suor. Da mesma forma, pacientes com sinusite crônica ou recorrente refratária aos antibióticos devem ser encaminhados para o exame. Evidência radiográfica de opacificação completa dos seios paranasais está presente em quase todos os pacientes com FC e pode ser um achado útil para o diagnóstico (Rosenstein & Cutting, 1998; Rosenstein, 1998; De Boeck et al., 2006; Farrell et al., 2008).

2.4.3. Aparelho Genital

Cerca de 98% dos pacientes masculinos irão apresentar azoospermia obstrutiva. A causa da azoospermia é um defeito no desenvolvimento de estruturas derivadas do ducto de Wolf. Isto leva à ausência, atrofia ou várias formas de obstrução dos canais deferentes, parte do epidídimo e vesículas seminais. As alterações dos canais deferentes são provavelmente responsáveis pela interrupção do fluxo normal do fluido seminal e espermatozóides vindo dos testículos. A espermatogênese é normal. As alterações morfológicas do ducto variam desde estruturas macroscopicamente normais com áreas atrésicas à hipoplasia com estenose e, mais frequentemente, ausência completa do ducto com vasos do cordão espermático normal. Estas alterações parecem ser secundárias ao aumento da viscosidade do fluido seminal. De interesse particular são os casos de homens com azoospermia obstrutiva e ausência congênita bilateral dos canais deferentes com pouca sintomatologia pulmonar e pancreática e eletrólitos no suor normais, limítrofes ou elevados. Muitos destes casos têm mutações da FC em um ou dois alelos ou

uma mutação de penetrância incompleta (5T) em uma região não codificadora (intron 8) da CFTR. Nestes casos, a evolução da doença é melhor (Wang et al., 2002) .

Em mulheres, o muco cervical é mais espesso e em menor quantidade e a fertilidade pode estar diminuída.

2.4.4. Glândulas Sudoríparas

Em 1953 di Sant'Agnese demonstrou que o suor dos pacientes císticos continha concentrações anormalmente elevadas de sódio, cloro e potássio o que posteriormente levou a implantação do teste do suor , conforme descrito por Gibson e Cooke, como padrão para o diagnóstico de FC (Di Sant'Agnese et al., 1953; Gibson & Cooke, 1959). A glândula sudorípara normal secreta o suor na sua porção basal com concentrações de cloro e sódio isotônicas em relação ao plasma. À medida que o suor passa pela porção tubular da glândula os íons vão sendo reabsorvidos de uma forma CFTR-dependente e o produto final eliminado é hipotônico em relação ao plasma, ou seja, com concentrações inferiores a 40mEq de cloro e sódio. Na FC o mecanismo de reabsorção está comprometido e o produto final apresenta concentrações maiores de 60mEq. Além do “beijo salgado”, outras manifestações clínicas da perda excessiva de eletrólitos, tais como desidratação hiponatrêmica, hiponatremia crônica e alcalose metabólica hipoclorêmica, podem ocorrer (Rosenstein, 1998).

2.5. DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL E DIAGNÓSTICO DE FIBROSE CÍSTICA

Desde a descoberta do gene CFTR, veio à tona que FC não é sempre uma doença tão clara, existindo um amplo espectro clínico de doenças associadas às mutações na CFTR (Stewart et al., 1995; Goubau et al., 2009). Pacientes com fenótipo mais leve, geralmente apresentam dosagem de Cl⁻ no suor intermediária, entre 30 e 60 mEq/L, necessitando confirmação do diagnóstico através da análise de mutações CFTR e/ou análise *in vivo* da função da CFTR pela medida da DPN (Rosenstein, 1998, Lebecque P et al., 2002; De Boeck et al., 2006). Caso os resultados da pesquisa genética e/ou da DPN forem normais, FC é improvável e devem ser pesquisados diagnósticos alternativos. Caso os resultados da pesquisa genética e/ou DPN forem inconclusivos, deve ser considerada pesquisa genética mais ampla e seguimento clínico dos pacientes com monitoração de sintomas sugestivos de FC (De Boeck et al., 2006). Baseado nos registros americanos cerca de 2% a 10% dos indivíduos com características sugestivas de FC são casos atípicos (Rosenstein, 1998).

Goubau et al. realizaram um grande estudo multicêntrico envolvendo países da Europa, Ásia e Oceania para definir o fenótipo de pacientes com eletrólitos no suor intermediários (entre 30 e 60 mEq/L) e evidência da disfunção da CFTR, por presença de duas mutações CFTR identificadas ou DPN anormal. A resposta da DPN após solução sem Cl⁻ e isoproterenol menor que -5 mV e relação da resposta total do Cl⁻ pela resposta ao amiloride maior que 0,35 foram consideradas anormais. Os pacientes foram divididos em quatro grupos para comparação das características fenotípicas: 59 pacientes com disfunção da CFTR, 46 sem disfunção da CFTR (FC improvável), 103 com FC pancreático-suficientes e 62 com FC pancreático-insuficientes. Dos 59 pacientes com disfunção da CFTR, 31 (52%) tinham duas mutações CFTR identificadas e 28 (48%) tinham a DPN anormal, sendo que metade destes também tinham duas mutações CFTR identificadas. O grupo de pacientes com disfunção da CFTR tinha mais infecções respiratórias (p=0,01), isolamento de patógenos da FC mais frequente (p<0,001) e maior frequência de baqueteamento digital (p=0,001) do que o grupo FC improvável, mas menos infecções respiratórias por patógenos da FC que o grupo FC pancreático-

suficiente. ($p=0,05$). Os pesquisadores concluíram que o grupo de pacientes com eletrólitos no suor intermediários e duas mutações CFTR ou medidas da DPN anormal tem um fenótipo tipo FC (FC atípica) compatível com a disfunção da CFTR encontrada e que, como um grupo, difere dos pacientes com eletrólitos no suor intermediário sem disfunção da CFTR, assim como dos portadores de FC com ou sem insuficiência pancreática (Goubau et al., 2009).

Wilson et al analisaram a DPN em onze pacientes com características clínicas sugestivas de FC (bronquiectasias, episódios de pneumonia e sibilância recorrente) e com resultados variáveis de eletrólitos no suor, a maioria limítrofes para FC, além de análise genética inicial inconclusiva. Nenhum paciente tinha doença sinusal crônica e a função pulmonar excedia 95% em dez pacientes. Culturas de escarro eram transitoriamente positivas para *P. aeruginosa* ou *S. aureus* em seis pacientes. Todos eram pancreático-suficientes. Um paciente tinha azoospermia. Os valores da DPN no grupo foram intermediários entre os controles e FC e somente em dois pacientes pode ser confirmado o diagnóstico de FC pela DPN basal elevada (-47 mV) e pouca resposta a solução sem Cl⁻ e isoproterenol (-2 mV). Análise genética amplificada destes dois pacientes identificou a variante 5T associada a mutação CFTR no outro alelo. Os autores relataram a grande dificuldade em confirmar ou excluir FC nestes casos e consideraram potencialmente útil a medida da DPN na investigação diagnóstica (Wilson et al., 1998).

Alguns estudos sugerem que até 50% dos indivíduos com ACVDB são portadores de mutações CFTR nos dois alelos (Mak et al., 1999; Wang et al., 2002). Em geral, uma destas mutações é da classe IV ou V e os pacientes apresentam concentração de Cl⁻ no suor normal ou intermediário e doença sinusopulmonar leve. Entretanto, estudo desenvolvido por Pradal et al. mediu a DPN em homens com ACBVD e mostrou que a maior parte do grupo apresentava medida da DPN normal (DPN basal, resposta ao amiloride e resposta ao isoproterenol), sugerindo atividade normal da CFTR no epitélio respiratório destes pacientes. Somente um pequeno subgrupo apresentou DPN anormal, sendo que FC foi posteriormente confirmada pela dosagem do suor ou pesquisa genética em todos estes pacientes (Pradal et al., 1998). Este estudo formou a base do conhecimento atual sobre as doenças associadas ao CFTR, as quais não preenchem os critérios para FC, pois não

apresentam manifestações pulmonares ou gastrointestinais. A ACBVD isolada é a principal destas desordens (Moskovitz et al., 2008).

Pancreatite aguda ou recorrente é outro quadro clínico no qual apresentação monossintomática pode levar ao diagnóstico de FC atípica. Em 1998, dois artigos publicados por Sharer et al. e Cohn et al. demonstraram a relação entre mutações da CFTR e pancreatite (Sharer et al., 1998; Cohn et al., 1998). Estudos subsequentes determinaram que 10 a 20% dos indivíduos com pancreatite recorrente são portadores de duas mutações CFTR, sendo pelo menos uma considerada leve (Noone et al., 2001; Durno et al., 2002). Na maioria destes indivíduos, pancreatite é a única manifestação de FC. Outras características são variáveis, como eletrólitos no suor elevados ou intermediários, pouca ou nenhuma doença pulmonar e DPN alterado. Segundo Noone et al. nos indivíduos com pancreatite crônica e duas mutações CFTR, o transporte de íons nasal está alterado. A prevalência de pancreatite é maior (10%) entre pacientes com FC e suficiência pancreática e menor nos com insuficiência pancreática (0,5%) (Moskovitz et al., 2008).

Estudos realizados em portadores de outras doenças como hipertensão, sarcoidose, diabetes mellitus, doença celíaca, síndrome de Kartagener, síndrome de Young e febre do feno foram importantes para identificar que as características do transporte iônico transepitelial nestes pacientes são normais (Alton et al., 1987; Alton et al., 1990). Chung et al. estudaram a medida da DPN em portadores de asma leve e não encontraram diferenças significativas na DPN basal e nas respostas às soluções de amiloride e isoproterenol, sugerindo que o transporte iônico pelo epitélio respiratório entre os asmáticos é normal (Chung et al., 2003).

Somente um estudo relatou a presença de DPN alterada, aparentemente não relacionada ao CFTR, em outra doença além da FC. A medida da DPN em três irmãos portadores de Síndrome de Liddle mostrou valores da DPN máxima mais negativa (-31,8, -29,5 e -29,9 mV) e resposta ao amiloride aumentada (16, 11,8 e 14,1 mV) em comparação aos controles (Baker et al., 1998). Síndrome de Liddle é uma doença genética autossômica rara que causa hipertensão precoce, tendência a hipocalcemia e renina plasmática e aldosterona baixas. Aparentemente, mutações no canal de Na⁺ epitelial causam o aumento da pressão arterial pela reabsorção

aumentada de Na^+ pelos canais no túbulo renal distal. Os autores não relataram dosagem de eletrólitos no suor ou presença de sintomas sugestivos de FC nos pacientes e a técnica da DPN utilizada não incluía avaliação da resposta ao isoproterenol.

2.6. DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL E FENÓTIPO DA FIBROSE CÍSTICA

Vários grupos de cientistas procuraram uma relação entre a gravidade da doença da FC e o grau de anormalidade do transporte de íons na FC (Alton et al., 1990; Walker et al., 1997; Ho et al., 1997; Fajac et al., 1998; Thomas 1999; Fajac et al., 2004; Leal et al, 2008; Simmonds et al., 2011). Alguns pesquisadores sugeriram relação entre a doença respiratória e a hiperabsorção de Na^+ , determinada pela DPN basal e/ou resposta ao amiloride, e outros com a secreção de Cl^- , determinada pela resposta a solução sem Cl^- , com amiloride e isoproterenol. Os resultados diferiram entre os estudos provavelmente em reflexo ao número pequeno de sujeitos e a técnicas diferentes da DPN.

Alton e colaboradores foram os primeiros a relacionar que medidas de gravidade da FC, como volume expiratório forçado no 1 minuto (VEF1), capacidade vital forçada (CVF) e baixo peso são inversamente relacionados à DPN basal. Resultados normais foram encontrados em heterozigotos para mutações da FC (Alton et al., 1990)

Walker e colaboradores estudaram a relação entre o transporte de íons na via aérea e mutações da CFTR. O grupo estudou a DPN em cinco pacientes com FC portadores da mutação A455E em pelo menos um alelo, a qual é associada à doença pulmonar mais leve, e cinco pacientes portadores das mutações G542X e R553X, também em pelo menos um alelo, para as quais a associação com doença pulmonar não havia sido descrita. Os autores não encontraram relação com a reabsorção basal de Na^+ da via aérea, transporte de Na^+ sensível ao amiloride e resposta à secreção de Cl^- . Entretanto, o número reduzido de pacientes, devido a

raridade das mutações estudadas, pode ter influenciado os resultados (Walker et al., 1997).

Ho e colaboradores examinaram a relação entre a medida da DPN, condição clínica e genótipo de pacientes com FC a fim de avaliar se a DPN poderia ser um marcador de função do CFTR e um índice da condição clínica dos pacientes com FC. Os pesquisadores observaram que existe uma correlação estatisticamente significativa entre as mutações que levam à presença da proteína CFTR na membrana apical celular e as que não produzem a CFTR com a resposta da DP ao estímulo da secreção de Cl⁻ pelo isoproterenol. Entre os que responderam ao isoproterenol, os pesquisadores observaram que os maiores valores foram encontrados entre os pacientes que apresentavam melhor VEF1 (67,7% versus 48,3%), melhores escores radiológico de Northern (4,14 versus 7,07) e presença de suficiência pancreática. Desta forma, foi sugerido que a presença de secreção residual de Cl⁻ se correlaciona com a função pulmonar (Ho et al., 1997).

Fajac e colaboradores analisaram a relação entre a DPN basal, o fenótipo e o genótipo em adultos com FC. A DPN foi medida em 95 adultos com FC que foram classificados em três grupos de acordo com o percentil do potencial nasal: grupo 1: percentil 10; grupo 2: percentil 10 a 90 e grupo 3: percentil 90. O genótipo foi dividido em quatro grupos: Grupo A: pacientes homozigotos para mutação deltaF508; grupo B: pacientes com mutações que não produzem CFTR ou CFTR não funcionante; grupo C: pacientes com CFTR parcialmente funcionante e grupo D: pacientes com somente uma mutação grave ou mutação não identificada. Os autores não encontraram diferenças entre as características clínicas no momento do diagnóstico, função pancreática e estado nutricional. A DPN foi inversamente relacionada com a CVF ($r=0,21$, $p<0,05$) e VEF1 ($r=0,22$, $p<0,05$). CVF e VEF1 foram significativamente maiores nos pacientes do grupo 1 comparado com os grupos 2 e 3 ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente). A estimativa de perda anual de VEF1 foi também significativamente menor no grupo 1 ($p<0,05$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos com relação a colonização por *P. aeruginosa*, número de cursos de antibióticos por ano, história de polipose nasal, presença de cirrose hepática, cálculos biliares, dores articulares, gravidez em mulheres ou frequência de pneumotórax. Com relação ao genótipo, nos grupos A e

B, correspondente às mutações graves da FC, o grupo 1 mostrou menor comprometimento da função respiratória que os grupos 2 e 3. CVF e VEF1 foram maiores no grupo 1 que grupos 2 e 3 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). A estimativa de perda anual da CVF e VEF1 foi menor no grupo 1 que nos grupos 2 e 3 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). PaO_2 foi maior no grupo 1 ($p < 0,05$). O estudo mostrou que pacientes adultos com DPN basal normal apresentam melhor função pulmonar comparado aos com DPN basal elevada. Além disto, entre os pacientes com duas mutações do CFTR consideradas graves, por exemplo, homocigotos para deltaF508, uma relação similar foi encontrada entre a DPN basal e a função respiratória: em pacientes com DPN basal normal, a função respiratória estava menos alterada do que nos pacientes com DPN elevada. Desta forma, a hipótese de que a presença de função parcial do CFTR seria a responsável pela menor perda de função pulmonar não pode ser confirmada. Presença de fatores ambientais como inflamação e genes protetores fora do locus da FC podem ser responsáveis pela modulação da ação da CFTR. Os autores sugeriram que a presença de DPN basal normal em paciente portador de FC, mesmo com genótipo considerado grave, pode ser um indicativo de evolução menos grave da doença pulmonar (Fajac et al., 1998).

Thomas e colaboradores estudaram 42 pacientes adultos com FC homocigotos para mutação deltaF508 e correlacionaram a DPN basal, resposta ao amiloride e ao isoproterenol com o VEF1. Os pesquisadores encontraram uma correlação fortemente positiva entre a resposta ao isoproterenol e o VEF1 ($r = 0,31$, $p < 0,05$). A análise do grupo por sexo mostrou que os homens mostravam forte correlação ($r = 0,55$, $p = 0,003$), enquanto nenhuma correlação foi encontrada entre as mulheres ($r = -0,02$, $p = 0,47$), embora as mulheres tenham mostrado respostas ao isoproterenol semelhantes às dos homens. Desta forma, concluiu-se que em homens com FC homocigotos para deltaF508 e atividade residual da CFTR tinham doença pulmonar menos grave (melhor VEF1). Fatores que levaram à pior função pulmonar em mulheres, à despeito da atividade residual da CFTR, em mulheres com FC homocigotas para deltaF508 não puderam ser explicados (Thomas et al, 1999)

Fajac e colaboradores estudaram a relação entre a DPN, insuficiência pancreática e o VEF1 $< 50\%$. Os autores encontraram uma fraca relação entre a

doença pulmonar e a DPN basal e a resposta ao amiloride. Pela análise univariada, a DPN foi um pouco maior em portadores de doença pulmonar grave (média -54 mV) que nos com doença pulmonar leve (média -45 mV). A resposta ao amiloride foi também maior no grupo mais grave, embora pela análise multivariada incluindo infecção crônica por *P. aeruginosa*, a relação entre função pulmonar e DPN basal tenha desaparecido. Entretanto, foi mantida para a relação entre a função pulmonar e a sensibilidade ao amiloride (OR 3,7). Não foi encontrada relação entre o VEF1 e secreção de Cl⁻ (+2 mV na doença pulmonar grave e +1 mV na doença pulmonar leve). Os autores observaram que existe ligação entre o transporte de íons e a expressão clínica da FC e que a relação entre a presença de insuficiência pancreática parece estar mais relacionada à evidência de secreção de Cl⁻, enquanto o comprometimento respiratório está mais relacionado ao transporte anormal de sódio e função regulatória da CFTR (Fajac et al., 2004).

Leal e colaboradores investigaram a associação entre os diferentes componentes do transporte iônico transepitelial, a expressão clínica e marcadores de gravidade da FC. O grupo realizou análises univariada e multivariada entre a DPN e o estado clínico de 75 pacientes adultos com FC homozigotos para deltaF508. Os resultados mostraram que menores anormalidades do transporte do Na⁺ se correlacionaram com melhor função respiratória e nutricional. A presença de sintomas digestivos ao diagnóstico se associaram a menor condutância do Cl⁻. Melhor estado nutricional associado a função pulmonar preservada e idade maior estava associada a condutância do Cl⁻ com 85% de acurácia (Leal et al., 2008).

Simmonds e colaboradores estudaram a DPN em pacientes adultos com FC e idade superior a 40 anos. Os autores demonstraram que a associação entre a gravidade da doença pulmonar estava relacionada somente ao transporte de Na⁺ e não ao transporte de Cl⁻ (Simmonds et al., 2011).

2.7. DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL E GENÓTIPO DA FIBROSE CÍSTICA

O emprego da DPN tem um importante papel na avaliação do genótipo da FC devido a sua capacidade de aferir a presença ou não do transporte do Cl⁻ via CFTR e auxiliar a definir se o paciente é portador ou não de FC (Bombieri et al., 2011). A FC apresenta grande variabilidade clínica explicada pelo menos em parte pela grande heterogeneidade de alelos no gene CFTR. Até o momento quase 2000 mutações estão catalogadas. Porém, as mutações podem ter consequências clínicas diferentes, contribuindo para dificultar a interpretação do genótipo na prática clínica. As mutações no CFTR podem ser divididas em quatro grupos: 1. causadoras de FC; 2. causadoras de doenças associadas ao CFTR; 3. sem consequência clínica e 4. de relevância clínica desconhecida ou incerta (Castellani et al., 2008).

Doenças associadas ao CFTR são definidas como entidades clínicas associadas a disfunção da CFTR, mas que não preenchem os critérios para FC. As três principais são ACVDB, pancreatite recorrente e bronquiectasias, todas associadas a disfunção da CFTR (Bombieri et al., 2011).

Wilschanski e colaboradores examinaram a relação entre o número e a gravidade das mutações no gene da CFTR e o grau da disfunção mediada pelo CFTR no transporte epitelial de íons em homens com ACVDB através da análise da genotipagem, cloreto no suor e DPN em controles saudáveis, heterozigotos obrigatórios, portadores de ACVDB e portadores de FC (24 pancreático-suficientes e 26 pancreático-insuficientes). Os autores concluíram que nos portadores de ACVDB existe um amplo espectro de alterações iônicas transepiteliais, as quais se correlacionam com o número e a gravidade das mutações identificadas no CFTR, e que os valores extremos se sobrepõem aos valores do grupo de normais ou heterozigotos em uma ponta e aos dos portadores de FC na outra. O grupo observou que neste grupo de pacientes o uso da genotipagem, dosagem de Cl⁻ no suor ou a DPN, isolados ou em combinação, excluiu FC em todos os homens com ACVDB sem nenhuma mutação identificada (Wilschanski et al., 2006).

Outro aspecto de importância particular da DPN foi seu emprego na avaliação do significado da mutação 5T, onde a documentação da presença ou alteração da função da CFTR foi fundamental. Wilson et al. e Wilschanski et al. descreveram 2 e 4 casos, respectivamente, de FC atípica com DPN anormal em portadores da mutação 5T em um alelo (Wilson et al., 1998; Wilschanski et al., 2001). A mutação 5T foi descrita por Kerem et al. como uma variante de penetração parcial causadora de doença de apresentação clínica extremamente variável (Kerem et al., 1997). A mutação 5T quando pareada *in trans* com uma mutação CFTR relacionada a FC, frequentemente resulta em ACVDB ou pancreatite recorrente ou mesmo doença pulmonar da FC. Há também relatos de indivíduos sem mutações FC que são homocigotos para o alelo 5T e demonstram características clínicas de FC atípica (Castellani et al., 2008). O traço de polimidina é também de importância particular em determinar o efeito clínico da mutação R117H. Quando pareada *in trans* com outra mutação CFTR, o alelo R117H/5T irá causar um fenótipo de FC clássica com suficiência pancreática; R117H/7T irá causar uma forma leve de FC ou ACVDB isolada e R117H/9T não irá causar doença (Kiesewetter et al., 1993).

Bienvenu e colaboradores realizaram medidas da DPN em 122 pacientes com bronquiectasias sem etiologia conhecida e com dosagem de Cl⁻ no suor normal e as compararam com as de normais, heterocigotos para mutação CFTR e portadores de FC clássica. Os autores demonstraram uma continuidade entre as medidas e o genótipo-fenótipo, ou seja, valores da DPN normais em normais, intermediários entre os portadores de bronquiectasias e elevados em portadores de FC grave, além de também demonstrarem continuidade nos valores da DPN conforme o número de mutações CFTR encontradas, sendo mais baixos entre os sem nenhuma mutação identificada e mais elevados entre os com duas mutações identificadas. Desta forma, concluíram que bronquiectasias presentes em pacientes heterocigotos para mutação CFTR, com eletrólitos no suor normais, podem ser manifestações patogênicas do gene. Os pacientes portadores de bronquiectasias, neste caso, tiveram diagnóstico de FC atípica ou doença associada ao CFTR (Bienvenu et al, 2010).

2.8. DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA REPARADORA DA CFTR

Os avanços nos conhecimentos da biologia molecular, biologia celular e eletrofisiologia criaram a oportunidade para correção do defeito básico da FC por terapia genética ou por modulação farmacológica dos processos fisiológicos anormais. Como o sucesso com a terapia genética foi relativo e muitas questões sobre a segurança da reposição do próprio gene CFTR foram levantadas, terapias alternativas passaram a ser investigadas. Tratamentos de reparo da proteína CFTR ou terapêuticas mutação-específicas tornaram-se uma área importante de pesquisa no tratamento direcionado para correção do defeito básico da FC (Kerem, 2005). Os melhores resultados foram encontrados com drogas que atuam como “corretores” das mutações, através do resgate da CFTR por defeitos de tráfego (mutações classe II), e com substâncias que atuam como “potencializadores”, ou seja, que sobrepujam ou aumentam a atividade do canal de Cl⁻ defeituoso (mutações classe III).

A primeira destas drogas licenciada para uso em adultos e crianças maiores de 6 anos portadores da mutação G551D foi o ivacaftor (VX-770), um potencializador oral que aumenta a abertura do canal CFTR. Estudo de fase II desta nova droga utilizou a resposta à solução sem Cl⁻ e com isoproterenol como um dos biomarcadores de efetividade e observou aumento médio de -3,5mV em relação ao basal. Similarmente, o VX 770 restaurou parcialmente o transporte do Cl⁻ nas glândulas sudoríparas, como demonstrado pela diminuição do Cl⁻ no suor (Accurso et al., 2010). Estudo posterior demonstrou que a melhora das medidas da DPN pelo uso do ivacaftor estão também relacionadas a melhora da função pulmonar (Ramsey et al., 2011).

Diversas outras drogas e combinações delas estão em estudo para tratamento de outras mutações. Muito tem se discutido a respeito de qual é o melhor marcador de medida funcional da CFTR. Em comparação a dosagem de Cl⁻ no suor e secreção transepitelial retal de Cl⁻, a DPN é o método mais extensivamente validado, embora sua reprodutibilidade e confiabilidade, devido a falta de

padronização, devam ser melhor avaliadas e os pontos de corte melhor definidos (Beekman et al., 2014).

3. OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi reproduzir e padronizar a técnica da DPN para sua aplicação como uma ferramenta de auxílio diagnóstico em casos atípicos de FC na nossa população.

Os objetivos específicos são os relacionados abaixo:

- 1) Determinar os valores de referência e pontos de corte da DPN
- 2) Determinar a sensibilidade e a especificidade da DPN para diagnóstico de FC
- 3) Avaliar a concordância da DPN através da análise dos testes das narinas do mesmo paciente
- 4) Analisar as relações entre a função residual da CFTR e os seguintes parâmetros:
 - a) nível de Cl⁻ no suor
 - b) presença de insuficiência pancreática
 - c) positividade para *Pseudomonas aeruginosa* em cultura de material respiratório
 - d) função pulmonar medida pelo volume expiratório forçado no 1º segundo (VEF1)
 - e) genótipo da FC.

4. MÉTODOS

Os trabalhos previamente publicados demonstraram que os valores da DPN nos pacientes portadores de FC situam-se acima de 2 desvio-padrão da média e que a sensibilidade e especificidade do método são elevadas, chegando a 100% e 99%, respectivamente (Middleton et al, 1994). Considerando um intervalo de confiança de 95% e uma diferença máxima permitida de 3%, calculamos que a amostra necessária para identificar as diferenças da DPN deveria incluir 43 testes em pacientes com FC e 50 testes em indivíduos controle, totalizando 93 testes.

Planejamos um estudo transversal onde os pacientes com FC foram recrutados dos ambulatórios de FC pediátrico e adulto do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Considerou-se como FC o paciente que apresentasse dosagem do cloro no suor acima de 60 mEq/L e/ou fosse portador de duas mutações CFTR causadoras de FC ou que apresentasse um fenótipo clássico de FC e dosagem de cloro no suor acima de 40 mEq/L e/ou duas mutações CFTR causadoras de FC. Os pacientes deveriam apresentar condição clínica estável e não estar recebendo terapia anti-pseudomonas contínua. Os indivíduos controles foram divididos em dois grupos: pacientes portadores de outras doenças não FC (grupo não-FC) e indivíduos saudáveis (grupo sadio). Pacientes não-FC foram recrutados dos ambulatórios de pneumologia pediátrica e adulto e apresentavam outras doenças pulmonares, gastrointestinais ou metabólicas onde FC havia sido excluído através de dosagem de cloro no suor abaixo de 40 mEq/L. Os indivíduos saudáveis foram recrutados por convite.

Critérios de exclusão: foram excluídos recém-nascidos, pacientes com infecção de vias aéreas superiores nas últimas duas semanas, pacientes com rinite alérgica sintomática, polipose nasal ou cirurgia nasal prévia.

Não havia contra indicações reais ao teste ou efeitos colaterais significativos durante ou após a realização do mesmo relatados na literatura. Não havia necessidade de jejum. O teste dura em média 20 minutos por narina, sendo que normalmente as duas narinas são analisadas.

O projeto foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (nº do projeto: 05-125).

Os testes foram realizados na Unidade de Pneumologia Infantil do HCPA pelo pesquisador principal. Todos os pacientes e controles foram devidamente esclarecidos sobre o teste e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1). Foi empregada a técnica da DPN descrita por Alton (Alton et al., 1990), com a modificação introduzida por Leal (Leal et al., 2003). Na técnica descrita por Leal o eletrodo de referência é posicionado no epicutâneo do antebraço e o paciente realiza o teste em decúbito dorsal. Esta técnica permite que o teste seja mais facilmente realizado em crianças menores, pois não utiliza eletrodo subcutâneo, sendo mais confortável para o paciente e mais higiênica, uma vez que as soluções utilizadas não necessitam ser desprezadas no meio ambiente. O aprendizado da técnica foi realizado pelo pesquisador através de estágio prático com a própria Dra Teresinha Leal no Laboratório de Química Especial da *Universite Catholique de Louvain Cliniques Universitaires Saint-Luc em Bruxelas* (Figura 8).

Os dados e informações clínicas dos pacientes com FC foram retirados dos registros no prontuário médico de cada paciente e preenchida ficha padrão (anexo 2).

4.1. DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL:

- 1) Preparar as soluções A1, A2, B1, B2 em tubos diferentes (30ml).
- 2) Conectar os eletrodos no voltímetro nos respectivos polos negativo e positivo
- 3) Mergulhar os eletrodos no creme de contato ECG previamente diluído com Ringer Lactato 1:1
- 4) Ligar o voltímetro
- 5) Verificar o ofsete dos eletrodos. Deixar os eletrodos no creme ECG por cerca de 15 minutos, que normalmente é o tempo suficiente para se chegar à nulidade de voltagem entre os eletrodos. Se não ocorrer a nulidade, trocar os pares de eletrodos.
- 6) Montar a sonda de Foley com o eletrodo conectado ao polo positivo do voltímetro imerso em um dos canais da sonda que está preenchido pelo creme ECG. Utilizar sonda Foley nº6 para crianças e nº8 para adultos.

- 7) Conectar a outra via da sonda a extremidade distal do perfusor, pelo qual serão instiladas as soluções. A extremidade proximal do perfusor deve estar conectada a um equipo em bomba de infusão com um débito de 3ml/hora.
- 8) Preencher a extensão do perfusor com a 1ª solução através da aspiração da solução A1 do tubo A1 pela extremidade proximal do perfusor. Verificar que o espaço morto da tubulação deve ser de 2,5 minutos. O fluxo da solução deve ser no sentido proximal – distal. Deixar as soluções em banho-maria para manter a temperatura em aproximadamente 37°C.
- 9) Preparar o paciente. Sentá-lo em uma poltrona na posição semi-inclinada. As crianças são posicionadas no colo de um dos responsáveis.
- 10) Realizar uma abrasão da camada córnea com cerca de 0.5 cm de diâmetro na pele da face anterior do antebraço com o motor manual acoplado a broca dentária.
- 11) Fixar o eletrodo de referência sobre a área escarificada. Deixar uma camada fina de creme de contato entre o eletrodo e a pele. Fixar com fita adesiva Obs: o contato do creme de contato com a região escarificada da pele pode provocar uma sensação de “picoteamento”, sinal que a abrasão foi eficaz.
- 12) Verificar o valor da diferença de potencial (DP) entre o sítio de referência e a extremidade do 3º dedo do paciente. Valores em torno de -30mV indicam que o contato está bem estável entre os 2 eletrodos e a qualidade da abrasão da camada córnea é satisfatória.
- 13) Colocar a sonda nasal: a sonda deve ser introduzida lentamente ao longo da parede inferior do corneto inferior até o local onde o valor da DP for mais negativo. Este local geralmente equivale a uma distância de 6 a 7 cm do orifício externo das narinas. Registrar a DP máxima.
- 14) Fixar o cateter com fita Micropore na região frontal do paciente, mantendo uma tensão suficiente para a sonda não se deslocar da posição ideal.
- 15) Iniciar o registro contínuo da voltagem, a cada 10 segundos.
- 16) Iniciar a perfusão das soluções, respeitando a duração da perfusão de cada fase: aproximadamente 1 minuto para fase A1 e 5 minutos para cada uma das fases seguintes. Para trocar de fase, basta mudar a extremidade proximal do equipo de bomba de infusão no qual está imerso. Uma pequena coluna de ar irá se formar dentro do equipo e do perfusor a cada troca de frasco. Esta coluna representa a troca de fases, ou seja, de estímulo farmacológico. Para cada fase, a DP deve ser medida por pelo menos 3 a 5 minutos e deve-se registrar qual foi a leitura (mV) do

potencial no momento em que a coluna de ar entrar na sonda nasal. As soluções devem ser infundidas na sequência A1, A2, B1, B2.

17) Parar a perfusão e verificar a DP de novo. Valores de medida são aceitos se a DP no início e no final do procedimento forem comparáveis. (± 5 mV).

18) Remover o cateter, substituir a solução B2 pela A1 e fazer um flush com a solução A1 para remover os reagentes anteriores.

19) Repetir os passos 13 a 16 na outra narina.

20) Ao final do teste, repetir os passos 5 e 12.

4.1.1. Cuidados de antisepsia:

A sonda de Foley deve ser descartada no final do procedimento. Os eletrodos devem ser limpos em água e hipoclorito e reutilizados. Tanto o equipo da bomba de infusão e quanto o perfusor poderão ser reutilizados após limpeza com solução antisséptica e água pura

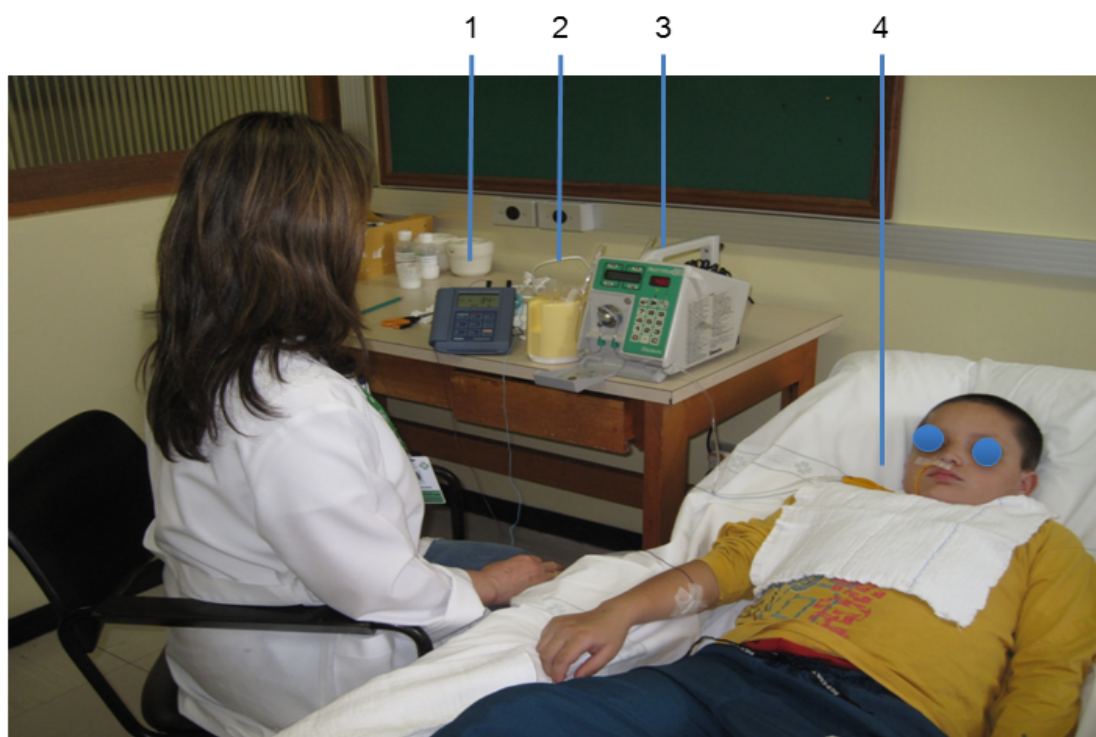


Figura 8. Material e técnica do Teste da Medida de Diferença de Potencial Nasal no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (1. Voltímetro; 2. Aquecedor tipo banho-maria;

3. Bomba peristáltica; 4. Sonda de Foley intranasal).

4.1.2. Composição das soluções:

Deve-se preparar 1 litro das soluções eletrolíticas A e B e armazená-las em frasco âmbar (podem ser refrigeradas por até 3 meses ou congeladas por 6 meses. As soluções A2, B1 e B2 pode ser preparadas até 2 horas antes do teste. As ampolas de isoprenalina devem ser mantidas sob refrigeração.

- 1.) solução A1 = solução A.
- 2.) solução A2 = 29,7ml da solução A1 + 0,3ml de solução de amiloride.
- 3.) solução B1 = 29,7ml da solução B + 0,3ml da solução de amiloride.
- 4.) solução B2 = 29,33ml da solução B + 0,3ml da solução de amiloride + 0,37 ml da isoprenalina (0,2mg/ml).

Obs: Solução de amiloride: 26,6mg do cloreto de amiloride dissolvido em 10 ml de água e aquecida durante 5 a 10 minutos a 70°C.

Tabela 2 – Composição da Solução de base (solução A1)

	mM	µM	Referência	Peso/1000ml
NaCl	115,2	58,44	Merck 1.06404	6,733g
CaCl ₂ .6H ₂ O	1,2	147	Merck 2382	176,4mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2	203,3	Sigma M2670	244mg
K ₂ HPO ₄	2,4	174,2	Sigma P8281	418mg
KH ₂ PO ₄	0,4	136,1	Sigma P5379	54,4mg
NaHCO ₃	25	84	Sigma S6297	2,1g

Tabela 3 – Composição da Solução sem cloro (solução B1)

	mM	µM	Referência	Peso/1000ml
NaGluconato	115,2	218,1	Fluka 71550	25,125g
CaGluconato	1,2	430,4	Sigma g4625	516,5mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2	246,5	Sigma M5921	295,8mg
K ₂ HPO ₄	2,4	174,2	Sigma P8281	418mg
KH ₂ PO ₄	0,4	136,1	Sigma P5379	54,4mg
NaHCO ₃	25	84	Sigma S6297	2,1g

5. ARTIGOS

Os resultados do presente trabalho serão apresentados na forma de artigos que serão submetidos para publicação na revista *Journal of Cystic Fibrosis* e *Pediatric Pulmonology*.

Artigo 1: **Nasal Potential Difference in Brazilian Cystic Fibrosis Patients**

Artigo 2: **Residual CFTR function and correlations with cystic fibrosis clinical phenotype and genotype**

Nasal Potential Difference in Brazilian Cystic Fibrosis Patients

Procianoy EFA^{1,2}, MD, PhD; Abreu e Silva FA^{1,2}, MD, PhD

¹ Pediatric Pulmonology Unit, Pediatrics - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Address to correspondence:

Elenara da Fonseca Andrade Procianoy
Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Pediatria
Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-903
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
e-mail: efaprocianoy@gmail.com
Phone: + 55 51 33598515

Abstract:

Background: Nasal potential difference (NPD) can help to define the diagnosis in atypical cystic fibrosis (CF), although it shows a continuum of the airway CFTR dysfunction associated with CFTR genotype. Intermediate values could be found, as in the sweat test, but with cut-offs not well defined. As the frequency of CFTR mutations are related to ethnic, demographic and racial group, it is essential to have regional NPD reference values.

Methods: NPD tests were carried out and compared in three different groups of subjects: CF, non-CF and healthy. All NPD parameters were recorded.

Results: We tested 29 CF patients, 19 non-CF and 19 healthy; 48 (72%) subjects tested the two nostrils. The frequency of allele F508del in CF group was 52%. All NPD parameters were similar between the control groups and statistically different in CF group. Compared to other studies the NPD for controls were similar whereas for CF were lower. The NPD clinical accuracy ranged according to the parameter. It was higher for NPDindex (cut-off 0.42; sensibility and specificity 96%). The correlation and concordance of the results of NPD between the left and right nostril were good.

Conclusion: The NPD test showed reproducibility, based on the similarity between ours and reported normal values in other studies. Lower CF-NPD values are probably related to local genotypic characteristics. This has to be accounted when interpreting NPD results in different countries.

Keywords: Atypical phenotype, cystic fibrosis, borderline sweat test, nasal potential difference

INTRODUCTION

Cystic Fibrosis (CF) is a recessive genetic disease resulting from ion transport disorders in exocrine epithelial cells due to mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (CFTR). The gene encodes a protein named CFTR that acts as an important ion channel. In the airways, it transports chloride (Cl^-) and bicarbonate and regulates other ion pathways including the epithelial sodium (Na^+) channel (ENaC) and alternative Cl^- channels [1].

CFTR dysfunction leads to bioelectric cellular changes and interrupts the normal regulation of salt and water in the epithelium [2]. More viscous and dehydrated secretion have pathological consequences in airways due to mucus stasis, infection, and inflammation that culminate in the signs and symptoms of CF. In the sweat glands it leads to production of high sweat chloride concentration [2,3]. Sweat chloride above 60mEq/L and/or identification of two CFTR mutations are tests that confirm CF diagnosis in most clinical situations, but in 5% to 10% of CF cases the diagnosis is not as clear-cut [1,4,5], because of limited clinical features of CF and inconclusive diagnostic tests, as normal or borderline sweat chloride, or CFTR mutations that are not associated with ion channel abnormality. In these atypical cases, electrophysiological studies became an alternative tool to clarify the diagnosis [1,4,5,6].

Nasal potential difference (NPD) is a test that measures the resulting voltage from ion movement across nasal epithelial cells and permits direct, sensitive, and *in vivo* quantification of both Cl^- and Na^+ transport that could assist in the CF diagnosis [2,7]. Typically, the epithelial CF cell is hyperpolarized because of increased Na^+ absorption by ENaC and reduced Cl^- permeability by CFTR. As consequence, the maximum NPD is more negative, responds to amiloride, a sodium channel blocker, with higher depolarization, and shows absent or markedly reduced repolarization in response to drug CFTR-mediated chloride transport stimulation, as to isoproterenol [2,8]. Nevertheless, NPD is limited in clinical practice due to lack of diagnostic reference values that can lead to inconclusive results [9].

Different NPD measurement techniques have been described since the initial description by Knowles, resulting in divergent protocols between CF centers

and different diagnostic cut-offs [2,8,10]. An attempt to standardize the test was triggered by the CF Foundation Therapeutics - Therapeutics Development Network (CFFT - TDN) and the Clinical Trials Network of the European Cystic Fibrosis Society (ECFS - CTN) because NPD is also used as an important biomarker of CFTR dysfunction restoration in clinical trials [10-12]. However, to date, it remains unclear what should be the optimal methodology [3]. Although NPD has shown reproducible results in some laboratories [13], recent analysis revealed great quality and stability variability of NPD tracings and high frequency of artifacts, probably because of differences in the equipment used, mainly the voltmeter, electrodes, catheters and solutions and differences between the positioning of measurement catheter into the nostril [14,15]. Furthermore, there is not a commercially standardized equipment worldwide available, hindering the NPD applicability in different countries [12,14]. Patient's issues such as previous nose or sinus surgery, current upper respiratory tract infection, cigarette smoking exposure, exercise, and menstrual cycle, are also important because they influence NPD results and their interpretation [15].

The NPD measurements demonstrate a wide spectrum of CFTR dysfunction and seem to be related to the number and severity of CFTR gene mutations and how much it interferes with the chloride channel activity. Intermediate values are described in mild or atypical CF cases [16]. As the frequency of CFTR mutations also seems to be related to ethnic, demographic, and racial group distribution, it is essential to have NPD reference values for different CF genetic backgrounds [4,17].

With these issues in mind we prospectively evaluated the NPD parameters in CF patients and compared them with those from two control groups: non-CF and healthy, to establish the cut-offs, sensitivity and specificity of the method as a diagnostic test for CF. We also evaluated the intra-subject correlation and concordance between the results of both nostrils.

METHODS

Subjects

Patients with CF and non-CF were prospectively recruited from outpatient clinic visits from 2008 to 2012. CF patients had to have sweat chloride above 60 mEq/L and/or two CF causing mutations or classical CF phenotype plus sweat chloride above 40 mEq/L and/or two CF causing mutations. The patients had to be clinically stable. All patients' regular use medications were maintained. Non-CF patients included those with obliterative bronchiolitis, chronic diarrhea, malnutrition, asthma, post-infectious bronchiectasis, hypothyroidism and hepatic cirrhosis. All non-CF patients had sweat chloride below 40 mEq/L. The healthy subjects were recruited by invitation.

We excluded newborns, patients with upper respiratory infection in the last two weeks, with symptomatic allergic rhinitis, nasal polyps and nasal surgery. All individuals or their parents signed an informed consent. The project was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (HCPA) (project number 05-125).

Nasal Potential Difference

NPD measurements were performed as previously described [6,18]. It was used Ag/AgCl electrodes, a high-impedance voltmeter (Millivoltmeter Knick Portamess 910[®], Elscolab, Germany) with recording and storing of measurement at every 10 seconds and an exploring electrode placed inside a Foley urinary catheter filled with a conductor cream (Signa[®] Cream, Parker, USA) in Ringer's lactate 1:1 to form a bridge with the reference electrode. The reference electrode was placed on a small area of exfoliated skin on the anterior forearm. The quality of the contact was checked by fingers potential difference above -30mV. An anterior rhinoscopy was performed to check nasal anatomy and mucosal integrity before the Foley catheter introduction into the nostril below the inferior nasal turbinate. The Foley catheter tip was placed in the site of the maximum negative voltage and a protocol of sequentially instilled solutions was initiated. The solutions were warmed at 37 °C.

The following NPD measurements were recorded: (1) maximum stable NPD (NPD_{max}); (2) NPD at the end of basal solution (NPD_{basal}); (3) NPD response

to basal solution with 100 mM amiloride (Δ_{amil}); (4) NPD response to zero chloride solution with 100 mM amiloride ($\Delta_{\text{ØCl}}$); (5) NPD response to zero chloride solution with 100 mM amiloride and 10 mM isoprenaline (Δ_{iso}). The chloride response was calculated by the sum of $\Delta_{\text{ØCl}} + \Delta_{\text{iso}}$ (Δ_{Cl}) and the relationship between the sodium and chloride transport elements by two indexes: the $\Delta_{\text{amil-iso}}$ ($\Delta_{\text{amil}} + \Delta_{\text{iso}}$), described by Bienvenu et al. [19] and the NPD index, described by Wilschanski et al ($\text{NPDindex} = e^{(\Delta_{\text{ØCl}} + \Delta_{\text{iso}} / \Delta_{\text{amil}})}$) [20]. Wherever possible the two nostrils were tested.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed with statistical package for the social sciences (SPSS) software v18.0. Descriptive analysis for each group (CF, non-CF, and healthy) was done by mean \pm standard deviation or n (%) and the comparison of means between the groups was done by one-way analysis of variances, *post hoc* Tukey HSD tests and box-plot graphics. Diagnostic test accuracy (sensitivity, specificity, and cut-off points) was assessed determining the area under a characteristic receiver operator curve (ROC).

For correlation and concordance analysis between the measurements of the two nostrils we used equations for linear correlation (Pearson's r) and Bland-Altman scatter diagram and plots, respectively.

Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

RESULTS

Subject characteristics

One hundred and twenty one tests were performed in 67 patients: 47 tests in 29 CF patients (12 patients tested one nostril, 16 patients two nostrils and one patient tested two nostrils and again one nostril); 37 tests in 19 non-FC (3 patients tested one nostril, 15 patients tested two nostrils and 1 patient tested twice both nostrils), and 37 tests in 19 healthy controls (4 patients tested one nostril, 12 patients tested two nostrils and 3 patients tested both nostrils and again one nostril). The sweat chloride in CF patients ranged from 53 to 109 mEq/L (5 patients with CF had sweat chloride between 50 and 60 mEq/L: 1 showed F508del mutation in both alleles

and 4 the F508del mutation in one allele). One patient with F508del mutation in both alleles did not have a sweat chloride test. Genotype of 26 CF patients was identified as follows: 8 F508del/F508del, 11 F508del mutation in one allele: 2 F508del/1812-1G>A, 1 F508del/G542X, 1 F508del/R1066H, 1 F508del/3132delTG and 6 without identification in the other allele. Seven patients had no mutation identified. Twenty-two CF patients (75%) had pancreatic insufficiency based on clinical history and pancreatic enzyme supplementation. The % predicted FEV₁ of CF patients varied from 28 to 133% (mean \pm SD: 80% \pm 11%). Eighteen CF patients (62%) had at least one sputum positive for *Pseudomonas aeruginosa* in the past 6 months (table 1).

Among non-CF patients sweat chloride ranged from 13 to 39 mEq/L (mean \pm SD: 28 \pm 5 mEq/L). One patient had G551D mutation in one allele. Among the healthy, 12 subjects had sweat chloride with values from 22 to 38 mEq/L (mean \pm SD: 32 \pm 2 mEq/L). Two were CF patients siblings and showed normal sweat chloride with mutation identification in only one allele (F508del/N and R553X/N).

The acceptance of the test was highly variable and was not related to patient age. Most of them well tolerated the test, but some complained of discomfort in the nostril and bad taste of the solutions. One 10 years old boy could not complete the test because of vomiting.

Table 1 – Subjects characteristics

Characteristics	CF n=29	Non-CF n=19	Healthy n=19	P
Age, yr	15.3±6.0	15.3±10.5	17.3±7.7	0.832
Female, n (%)	18 (62)	6 (32)	6 (32)	0,045
Sweat chloride, mEq/L	72 (4)	28 (5)	32 (2)	
Rhinitis, n (%)	11 (38)	8 (42)	8 (42)	0,942
CFTR genotype, n° (%)				
Phe508del/Phe508del	8 (28)	-	-	
Phe508del/1812-1G>A	2 (7)	-	-	
Phe508del/G542X	1 (3)	-	-	
Phe508del/R1066H	1 (3)	-	-	
Phe508del/3132delTG	1 (3)	-	-	
Phe508del/N	6 (20)	-	1 (5)	
N/N	7 (24)	18(95)	-	
ND	3 (12)	-	17(90)	
G551D/N	-	1(5)	-	
R553X/N	-	-	1 (5)	
Pancreatic insufficiency, n (%)	22 (75)			
% Predicted FEV ₁	80 ± 11			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , n (%)	18 (62)			
Basic disease, n (%)				
Obliterative bronchiolitis		7 (37)		
Chronic diarrhea		6 (32)		
Malnutrition		2 (11)		
Asthma		1 (5)		
Bronchiectasis		1 (5)		
Hypothyroidism		1 (5)		
Cirrhosis		1 (5)		
Number of tests	47	37	37	0.076

CF: cystic fibrosis; non-CF: non cystic fibrosis. CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; F508del/F508del: F508del mutation homozygous; F508del/N: one F508del allele and other not identified; N/N: both alleles were not identified; ND: not done;

FEV₁: forced expiratory volume in one second. The data were presented as mean \pm standard deviation and counting (percentage).

Nasal potential difference

The NPDmax was significantly higher in the CF group (mean \pm SD: -34 ± 9 mV, $P < 0.0001$), as expected, although a small overlap occurred with controls (-15 mV to -25 mV) in 13% exams. The Δ amil was higher in the CF group (mean \pm SD: -20 ± 9 mV, $P < 0.0001$) and similar between controls. Only three patients with CF had Δ amil lower than -10 mV. All of them had asymptomatic rhinitis. The Δ Cl was significantly lower in the CF group (mean \pm SD: 4 ± 5 mV, $P < 0.0001$) and similar between controls. Eight studies (8/47) in the CF group exhibited Δ Cl greater than 6 mV, which corresponded to tests of 4 CF patients with mild disease. One of these patients presented Δ Cl 21 mV and his diagnosis was questioned; the patient had steatorrhoea confirmed by fecal elastase < 200 , mild pulmonary symptoms without *Pseudomonas aeruginosa* colonization, sweat chloride of 58 mEq/L, NPDmax -39 mV and Δ amil -24 mV. Genotype analysis was negative for five most common local mutations [30]. This patient was considered as having atypical FC. The main NPD parameters for each group are presented in table 2 and figure 1.

The two indexes that analyze the relationship between sodium and chloride transport were statistically different in the CF group (Table 2): the Δ amil-iso (mean \pm SD: -19 ± 9 mV, $P < 0.0001$) and the NPDindex (0.85 ± 0.23 , $P < 0.0001$). Table 3 shows cut-off points, sensitivity, specificity and the area under the curve for NPD parameters.

Comparison between the results of NPD between right and left nostrils was done for 48 (72%) patients. The correlation and concordance were good, with best results for NPDmax and worst for Δ Cl (figure 2).

We observed less tolerance to the test in patients with rhinitis, although acute rhinitis has been an exclusion criterion. Analysis of rhinitis presence did not show significant differences, although the NPDmax, Δ amil and NPDindex have been lower in patients with rhinitis.

Table 2 – Nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients and control groups

Variable	**CF n=29	Non-CF n=19	Healthy n=19
NPDmax (mV)	-34 ± 9	-14 ± 5	-15 ± 4
Δamil	-20 ± 9	-6 ± 3	-6 ± 3
ΔCl	4 ± 5	17 ± 9	11 ± 7
Δamil-iso	-19 ± 9	-1 ± 4	-2 ± 4
NPDindex	0.85 ± 0.23	0.11 ± 0.11	0.20 ± 0.14

CF: cystic fibrosis; non-CF: non cystic fibrosis, NPDmax: maximal NPD, amil: amiloride; Cl: chloride; iso: isoproterenol; NPDindex: nasal potential difference index = $e^{(\Delta Cl / \Delta amil)}$. The data were presented as mean ± standard deviation. ** $p < 0.001$ for all NPD parameters.

Table 3 – Nasal potential difference parameters for CF diagnosis (n= 67 patients and 121 tests)

	Cut-off	Sensibility	Specificity	AUC
NPDindex	0,42	96	96	0.995
Δamil-iso, mV	-8.5	95	95	0.981
Δamil, mV	-11.5	89	95	0.971
NPDmax, mV	-20.5	91	92	0.969
ΔCl, mV	6,5	79	85	0.891

CF: cystic fibrosis; AUC = area under the curve; NPDindex: nasal potential difference index = $e^{(\Delta Cl / \Delta amil)}$; NPDmax: maximal NPD, amil: amiloride; iso: isoproterenol; NPDmax: nasal potential difference maximum; Cl: chloride.

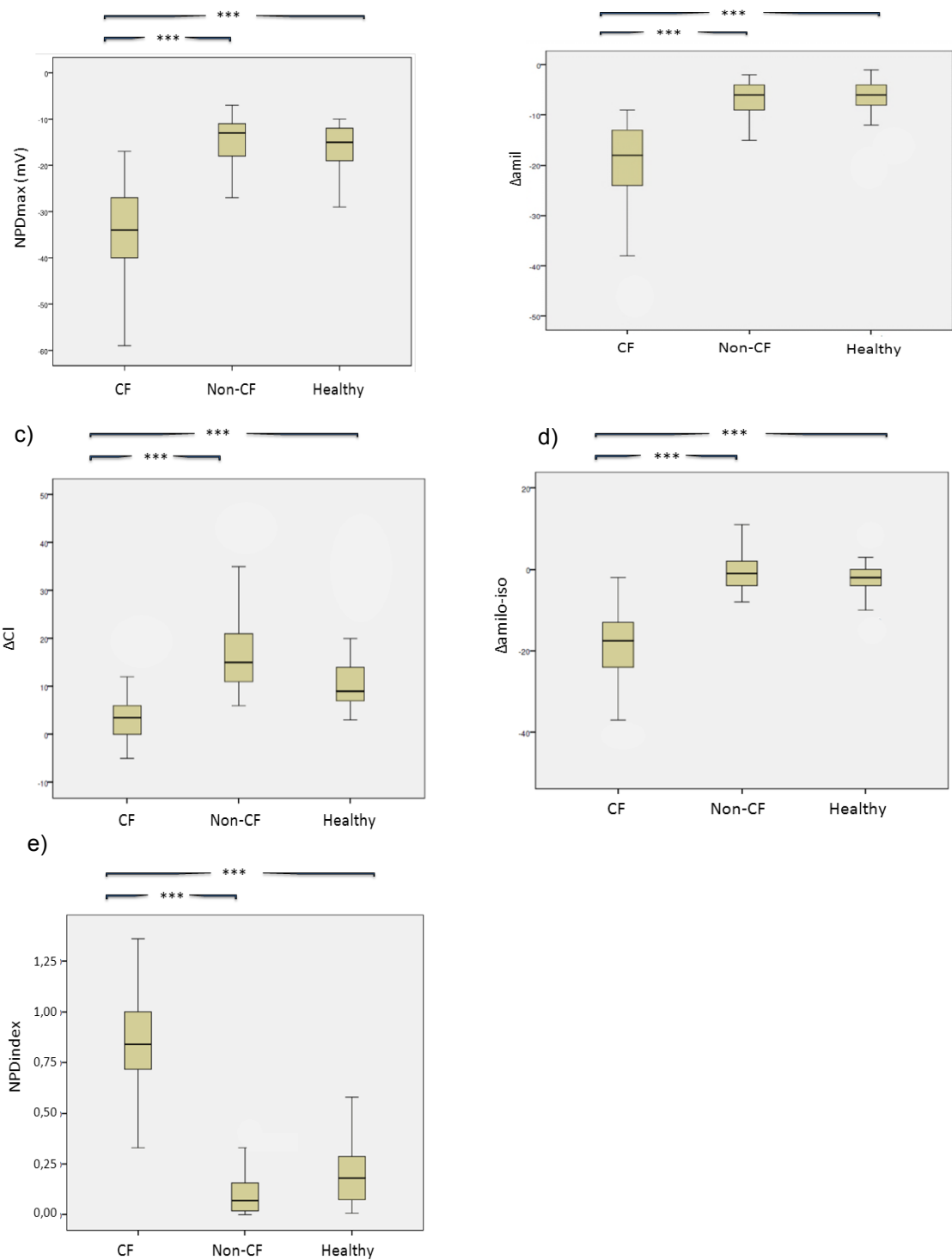


Figure 1 – Box plot for different NPD parameters in cystic fibrosis (CF), non cystic fibrosis (non-CF) and healthy groups (minimum, maximum, mean, lower and upper quartile): a) Maximal nasal potential difference (NPDmax); b) amiloride response (Δ amil), c) chloride response (Δ Cl), d) index Δ amilo-iso (Δ amilo-iso) and e) NPD index (NPDindex = $e^{(\Delta\phi_{Cl} + \Delta_{iso}/\Delta_{amil})}$). *** p<0,001

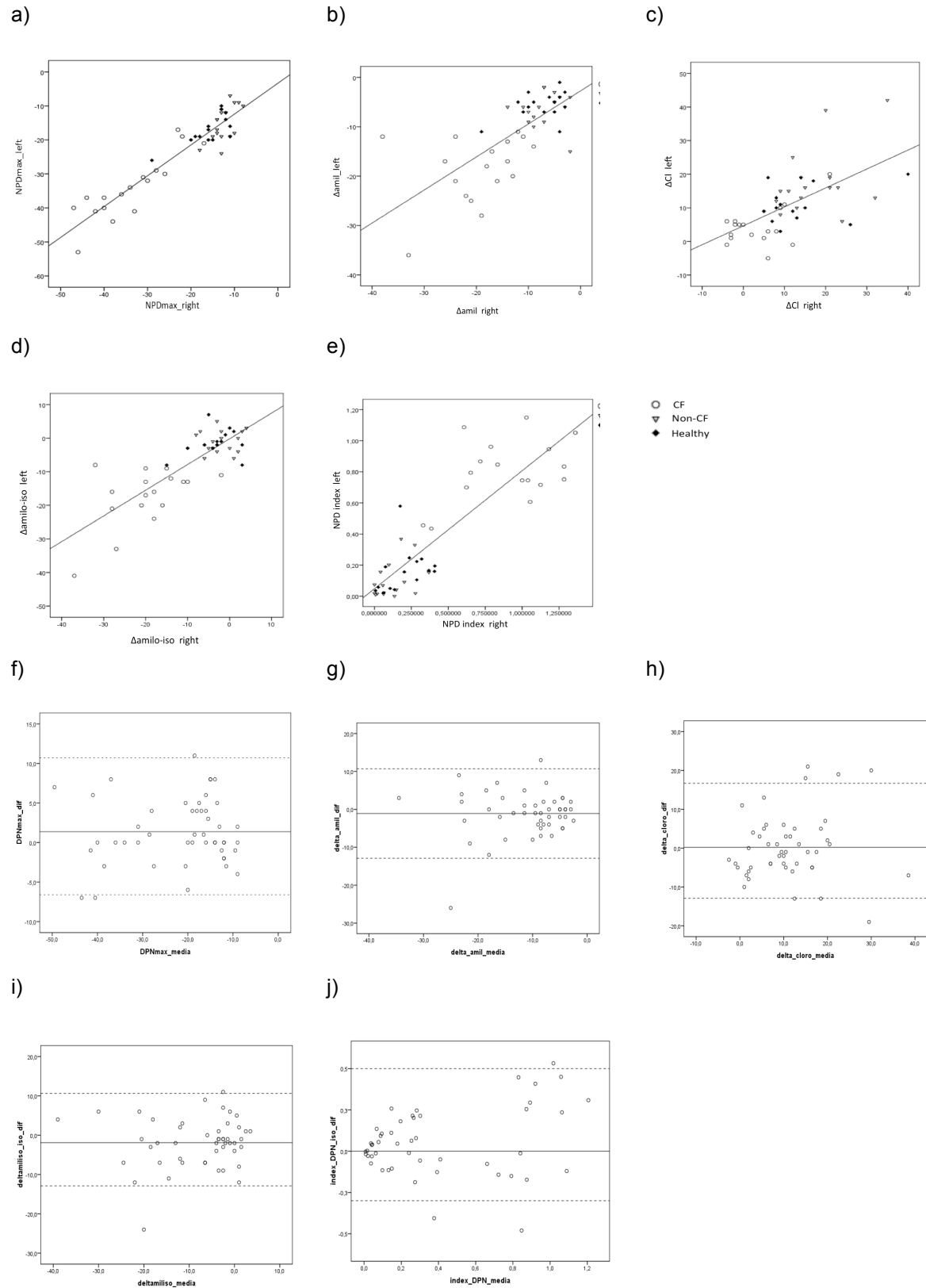


Figure 2 – Upper lines: Scatter diagram for correlation between right and left nostril values of nasal potential difference: a) Maximal nasal potential difference (NPDmax): $r=0,94$; $p<0,001$; b) amiloride response (Δamil): $r= 0,70$; $p<0,001$; c) chloride response (ΔCl): $r= 0,62$; $p<0,001$;

d) index Δ amilo-iso (Δ amilo-iso): $r=0,80$; $p<0,001$ and e) NPD index ($\text{NPDindex} = e^{(\Delta\varnothing\text{Cl} + \Delta\text{iso} / \Delta\text{amil})}$): $r=0,87$; $p<0,001$. *Bottom lines*: Bland-Altman plots for distribution of differences between both nostrils and mean for: f) Maximal nasal potential difference (NPDmax); g) amiloride response (Δ amil), h) chloride response (Δ Cl), i) index Δ amilo-iso (Δ amilo-iso) and j) NPD index ($\text{NPDindex} = e^{(\Delta\varnothing\text{Cl} + \Delta\text{iso} / \Delta\text{amil})}$). The continuous line shows the mean difference in values obtained from both nostrils (bias) and the dotted lines shows confidence limits for the bias (upper and lower limits).

DISCUSSION

Our study describes NPD values in Brazilian CF patients. The NPD differences for CF and non-CF, healthy or with other diseases were statistically showed, as described in previous studies [6,21,22]. The good sensibility and specificity of the test for CF was also demonstrated. Compared to studies from Leal et al. [18] and Bienvenu et al. [19], that used the same technique, we found similar NPD values for controls. It means that NPD test was reproducible. However, we found lower mean NPDmax, Δ amil and Δ amil-iso for CF. As Rosenstein and Cutting suggest [4], any laboratory that plans to use the NPD as a diagnostic tool should perform a sufficient number of studies in CF patients with defined mutations, normal and disease controls to establish reference values and ensure appropriate accuracy in test technique.

Nasal epithelial electrophysiology studies emerged as an alternative for CF diagnosis since Knowles et al. [2] demonstrated that in CF the NPD is more negative and amiloride response is more intense, reflecting sodium hyper absorption, and Middleton et al. [8] demonstrated the absent response to isoproterenol, reflecting the lack of the CFTR chloride conductance. The NPD techniques differ between centers because modifications and adaptations were made to facilitate its application, to improve patient acceptability and method reproducibility or to adapt to local conditions [6,8,11,21]. There are options regarding the equipment and materials that may be employed to perform NPD with advantages and disadvantages. The final choice of a particular protocol is a balance between the desire for standardization and the feasibility and cost of the test [12]. Schuler et al [23] consider some points

that are essential to reduce the NPD variability: choice of equipment, electrodes offsetting, positioning and fixation of the catheter in the patient, perfusion rate and timing of solutions and control of patient conditions that could interfere with results. We used solutions that were standardized for composition and pH and were warmed at 37 ° C to maximize the isoproterenol-dependent chloride response and to improve sensitivity, as postulated [15,23,24]. The offset of electrodes was obtained both at the beginning and at the end of all tests and short-circuit conditions were checked before the beginning of each test. The Foley catheter tip was positioned in the nostril below the inferior nasal turbinate where the most negative potential difference was found and its extension was firmly fixed in the patient forehead to prevent displacement. All measures were electronically recorded and strictly interpreted by the same technician. The same operator performed the tests to decrease variability, since all protocols state that operator skills and technique are the most important causes of measurement variability [10,14].

The reported tolerance to the test was good, as in other studies. Rather than what might have been expected, it was somehow unpredictable. Young children were more easily examined than adults, who sometimes complained about the taste of the solutions. Just one 10 years old boy could not complete the test because of vomiting. The biggest complaint from the patients was the discomfort caused by passing and positioning the nasal probe and this was observed more frequently in patients with rhinitis. Even though acute rhinitis had been an exclusion criterion, some patients have reported controlled rhinitis. The presence of rhinitis even asymptomatic was the major problem for NPD performing and interpretation. More often we had technical inadequate tracings in subjects with rhinitis. Notwithstanding statistical difference between cases with or without rhinitis was demonstrated, a reduction in NPDmax, ΔCI and NPDindex in cases with rhinitis was perceived, which should be taken into account when interpreting the results in suspect cases, because of false negatives [25]. At least, demonstration of a normal CFTR function, based in isoproterenol response (ΔCI) in a suspect CF case that has rhinitis has a strong negative predictive value, because CFTR function cannot be falsely high[26].

The intra-subject correlation and concordance of NPD was good for all parameters, with the best agreement for NPDmax and the worst for ΔCI . Despite this,

there was no equivocal diagnostic conclusion. So, based in our findings it seems reasonable to use the best CFTR response when reporting NPD results. This issue remains to be defined once CFF-TDN has developed standard operating procedures (SOP) to ensure less variability between both nostrils and repeated measurements, where the recommendation is to report the result as an average of both nostrils [12, 23]. Recently, Keenan et al. [26] reported that the averaging of the NPD results of right and left nostril measurements leads to an underestimation of individual CFTR function and also recommended to use the best CFTR response for diagnostic purpose.

Wilschanski et al. [19], Bienvenu et al. [18] and, recently, Ooi et al [27] studies found that combined ion channel measurements that take into account both the Na^+ and Cl^- transport are the most useful NPD parameter for questionable CF diagnosis. We found similar results, as NPDindex and $\Delta\text{amilo-iso}$, two indexes that calculate the relationship between Na^+ and Cl^- transport elements of the nasal potential difference, showed the best diagnostic accuracy with the best sensitivity and specificity. The worst diagnostic parameters were the NPDmax and ΔCl . This demonstrates that both the perfect intranasal localization of maximum NPD, that depends of operator skills, and the cell provocation with sequential substances are crucial points of NPD test to be considered.

Our study showed lower NPDmax, Δamil and $\Delta\text{amil-iso}$ in CF group compared to publish data [15,18,19]. We suppose that these findings are related to the genetic background. Previous molecular analysis study in CF patients from our CF center found frequencies of F508del in 48,7% of the alleles, G542X in 3,25%, R334W in 1,3%, R553X in 0,65% and W1282X in 0,65% [17]. In our studied subjects we found F508del allele frequency of 52%, 1812-1G>A: 3,4%, G542X: 1,7%, R1066H: 1,7%, 3132delTG: 1,7% and 34% of the alleles were not identified using PCR. This particularity arises from migratory currents that reached the southern Brazil predominantly from Western Europe, mainly from Germany, Italy and Spain. The impact of genotype in these results has to be confirmed in the future when more detailed genetic tests are available.

In conclusion, we are able to confirm that the NPD was a valid and reliable test to distinct the electrophysiological CF characteristics. The test is performed *in*

vivo, is readily interpreted, could be repeated as many times as needed and has relatively low cost. These are great advantages of NPD compared to others electrophysiological tests. Of course, attention to standardization and training are important, but they are also important to others diagnostic tests, as for the sweat test and genotyping. Lower NPD in this particular group of CF patients is probably related to genotypic characteristics. This has to be accounted when interpreting NPD results in different countries.

The authors wish to thank all patients and parents who allowed this study and Fundo de Incentivo Educacional à Pesquisa do Hospital de Clinicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) which provides funding for this research could be conducted. The authors would also like to thank Dr. Teresinha Leal for NPD protocol training

The authors declare no potential conflict of interest.

References

- [1]. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*, 2006; 61:627-635.
- [2]. Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 1981, 305:1489-1495.
- [3]. Rowe SM, Liu B, Hill A, Hathorne H, Cohen M, Beamer JR et al. for the VX06-770-101 Study Group. Optimizing nasal potential difference analysis for CFTR modulator development: assessment of ivacaftor in CF subjects with the G551D-CFTR mutation. *PLoS ONE*, 2013; 8(7):e66955. Doi:10.1371/journal.pone.0066955.
- [4]. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*, 1998, 132(4): 589-595.
- [5]. Farrel PM, Rosenstein J, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborn through older adults: Cystic fibrosis consensus report. *J Pediatr*, 2008; 153(2):S4-14.
- [6]. Alton EFWF, Currie D, Logan-Sinclair R, Warner JO, Hodson ME, Geddes DM. Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 1990, 3:922-926.
- [7]. Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Sands D, Stremmler N, Vavrova, Deneuville et al. Clinical phenotype and genotype of children with borderline sweat test and abnormal nasal epithelial chloride transport. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010; 182:929-936.
- [8]. Middleton PG, Geddes DM, Alton EFWF. Protocols for in vivo measurement of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium. *Eur Respir J*, 1994, 7: 2050-2056.
- [9]. Ooi CY, Dupuis A, Ellis L, Jarvi K, Martin S, Ray PN et al. Does extensive genotyping and nasal potential difference testing clarify the diagnosis of cystic fibrosis among patients with single-organ manifestations of cystic fibrosis? *Thorax*, 2014; 69:254-260. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203832.

- [10]. Leonard A, Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Wallemacq P, Lebecque P, Leal T. Comparative variability of nasal potential difference measurements in human and mice. *Open J Respir Dis*, 2012; 2:43-56. Doi: 10.4236/ojrd.2012.22007.
- [11]. Rowe SM, Clancy JP, Wilschanski M. Nasal potential difference measurements to assess CFTR ion channel activity. *Methods Mol Biol*, 2011; 741:69-86. Doi:10.1007/978-1-61779-117-8_6.
- [12]. De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I. et al. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibr*, 2011; 10(2): S53-66.
- [13]. Yaakov Y, Kerem E, Yahav Y, Rivlin J, Blau H, Bentur L et al. Reproducibility of nasal potential difference measurements in cystic fibrosis. *Chest*, 2007; 132:1219-1226.
- [14]. Solomon GM, Konstan M, Wilschanski M, Billings J, Sermet-Gaudelus I, Accurso F et al. An international randomized multicenter comparison of nasal potential difference techniques. *Chest*, 2010; 138(4): 919-928.
- [15]. Naehrlich L, Ballmann M, Davies J, Derichs N, Gonska T, Hjelte L et al. on behalf of the ECFS Diagnostic Networking Group. Nasal potential difference measurements in diagnosis of cystic fibrosis: An International Survey. *J Cystic Fibr*, 2014; 13:24-28.
- [16]. Wilschanski M, Dupuis A, Ellis L, Jarvi K, Zielenski J. et al. Mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene and *in vivo* transepithelial potentials. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006; 174: 787-794.
- [17]. Streit C, Burlamaque-Neto AC, Silva FA, Giugliani R, Saraiva-Pereira ML. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Gen Metab*. 2003; 78: 259-64.
- [18]. Leal T, Lebacq J, Lebecque, Cumps J, Wallemacq P. Modified method to measure nasal potential difference. *Clin Chem Lab Med*, 2003; 41 (1):81-87.
- [19]. Bienvenu T, Sermet-Gaudelus I, Burgel P-R, Hubert D, Crestani B, Bassinet L et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel dysfunction in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010; 181:1078-1084.

- [20]. Wilschanski M, Famini H, Strauss-Liviatan N, Rivlin J, Blau H, Bibi H. et al. Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 2001; 17:1208-1215.
- [21]. Alton EFWF, Hay JG, Munro C, Geddes DM. Measurement of nasal potential difference in adult cystic fibrosis, Young's syndrome and bronchiectasis. *Thorax*, 1987; 42:815-817.
- [22]. Chung NC, Illek B, Widdicombe JH, Fischer H. Measurement of nasal potential difference in mild asthmatics. *Chest*, 2003; 123(5): 1467-1471.
- [23]. Schuler D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Ballmann M, Dechaux M, Edelman A et al. Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *J Cystic Fibr*, 2004; 3:151-155.
- [24]. Standaert TA, Boitano L, Emerson J, Milgram LJH, Konstan MW, Hunter J et al. Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: an outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatr Pulmonol*, 2004, 37; 385-392.
- [25]. Boyle MP, Diener-West M, Milgram L, Knowles M, Foy C, Zeitlin P, Standaert T. A multicenter study of the effect of solution temperature on nasal potential difference measurements. *Chest*, 2003; 124:452-489.
- [26]. Hofmann T, Bohmer O, Huls G, Terbrack HG, Bittner P, Klingmuller V et al. Conventional and modified nasal potential difference measurement in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997;133:1908-1933.
- [27]. Keenan K, Avolio J, Rueckes-Nilges C, Tullis E, Gonska T, Naehrlich L. Nasal potential difference: best or average result for CFTR function as diagnostic criteria for cystic fibrosis? *J Cystic Fibr*, 2015;14:310-316. Doi:10.1016/j.jcf2014.09.006.
- [28]. Ooi CY, Dupuis A, Gonska T, Ellis L, Ni A, Jarvi K et al. Does integration of various ion channel measurements improve diagnostic performance in cystic fibrosis? *Ann Am Thorac Soc*, 2014;11(4):562-70. doi: 10.1513/AnnalsATS.201311-412OC.

Residual CFTR function and correlations with cystic fibrosis clinical phenotype and genotype

Procianoy EFA^{1,2}, MD; Abreu e Silva FA^{1,2}, MD, PhD

¹ Pediatric Pulmonology Unit, Pediatrics - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Adress to correspondence:

Elenara da Fonseca Andrade Procianoy
Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Pediatria
Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-903
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
e-mail: efaprocianoy@gmail.com
Phone: + 55 51 33598515

Abstract

Background: Cystic fibrosis has a wide clinical presentation and genetic background. Residual CFTR function could be related to CF phenotype and genotype.

Methods: NPD tests were carried out in 29 CF patients to study the relation between ΔCl , as a marker of residual CFTR function, and sweat chloride, pancreatic insufficiency, *P. aeruginosa* positivity, pulmonary function and genotype.

Results: It was not found correlation between ΔCl and all clinical characteristics, but pancreatic insufficiency showed a strong correlation with more negative NPDmax ($p < 0,001$). *Pseudomonas aeruginosa* positivity showed correlation with lower ΔCl ($p = 0,019$), a parameter that evaluates the Cl^- movement through not cAMP-regulated channels and %FEV1 showed an moderate inverse correlation with NPDmax ($r = 0,3$; $p = 0,067$). ΔCl showed correlation with genotype, with a strong impact of F508del mutation.

Conclusion: Residual CFTR function does not correlate with phenotype but with genotype. Instead of, is the ENaC dysfunction that correlates with the clinical phenotype.

Keywords: CFTR, nasal potential difference, pulmonary function, genotype.

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene and characterized by abnormal epithelial ion transport and high sweat chloride [1]. The gene is responsible for the synthesis of CFTR protein, which functions as a cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent chloride channel in epithelial cells as well as regulating sodium transport in the airways via the epithelial sodium channel (ENaC) [2-4]. CFTR dysfunction results in epithelial bioelectric abnormalities, due to lower chloride secretion and sodium hyperabsorption [5,6]. Up to date, almost 2.000 CFTR mutations were identified which can disrupt CFTR function within epithelial cells in different ways, ranging from complete absence of protein and no chloride conductance to normal surface expression but poor chloride conductance [7, 8].

CF is characterized by a wide clinical expression with a considerable variability in the severity and rate of disease progression. If not detected by neonatal screening, patients could be diagnosed with various modes of presentation, involving a variety of CF-affected organs at different ages, from birth to adulthood [9]. This is caused, at least partially, by the large number of CFTR-mutations, influence of modifier genes and environmental factors [10]. There is also the influence of the treatment on the course of the disease.

There is a huge interest in understanding the relationship between genotype and phenotype in CF. It seems that the relative impact of CFTR genotype is organ specific, with the vas deferens and pancreas being most sensitive to reduction of CFTR function than the lungs [11]. Probably the pathological manifestations of CF are the result of the degree of epithelial ion transport dysfunction [4] and better prognosis could be related to residual CFTR function.

Nasal potential difference (NPD) is a biophysiological test that can quantify both chloride (Cl^-) and sodium (Na^+) movement across nasal epithelial cells. In CF, increased Na^+ absorption is reflected by more negative NPD and increased response to amiloride, a Na^+ channel blocker, because of hyperpolarization of the nasal

mucosa, and the Cl⁻ impermeability is demonstrated by a reduced or abolished cellular repolarization in response to both an electrochemical gradient favorable to Cl⁻ efflux and addition of isoproterenol, a cAMP-agonist that stimulates CFTR [6, 12]. Although it was primarily implemented as an auxiliary diagnostic tool for suspected CF cases with inconclusive sweat chloride and genotyping, some studies tried to demonstrate that NPD could be used as a prognostic marker [4, 5]. But, while some studies showed correlation between lower NPD and lower response to amiloride and pancreatic sufficient CF phenotype, others showed that ion transport abnormalities have distinct clinical outcomes [13 - 18].

We conducted this study to analyze if residual CFTR function is correlated to clinical CF parameters as sweat chloride concentration, pancreatic insufficiency, *Pseudomonas aeruginosa* positivity, pulmonary function and to genotype in a group of CF patients.

METHODS

Subjects

We prospectively enrolled CF patients who attended the pediatric and adult CF clinics of Hospital de Clinicas de Porto Alegre whose diagnosis was confirmed by sweat chloride above 60 mEq/L and/or identification of two CF causing mutations or classical CF phenotype plus sweat chloride above 40 mEq/L and two CF causing mutations. Patients from different ages, except newborns, were included. Patients with upper respiratory infection in the previous two weeks, with symptomatic allergic rhinitis, nasal polyps and previous nasal surgery were excluded. All patients or their parents signed an informed consent. The project was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil (project number 05-125).

For clinical data analysis we used the information contained in the patients' medical records. We considered the sweat chloride concentration that confirmed the CF diagnosis. All sweat chloride measurements were determined according to guidelines by the Gibson and Cooke method (pilocarpine iontophoresis) [19]. The pancreatic phenotype was based in both clinical symptoms and pancreatic

enzyme replacement therapy. For *Pseudomonas aeruginosa* positivity we considered clinically-collected respiratory cultures (oropharyngeal swab, aspirated sputum or sputum) from previous six months. The patient could not be in use of continuous suppressive anti-pseudomonas therapy. Pulmonary function was evaluated as the forced expiratory volume in 1st second (FEV1) of the most recent functional test when clinically stable, not exceeding 12 months apart from NPD. FEV1 was expressed as percentage (%) of predicted for age, sex and height of reference values. The genotype was analyzed for the most frequent mutations in South Brazil using Real Time-PCR (F508del, R347P, R347H, R334W, G542X, G551D, R553X, S549N, W1282X, N1303K) or DNA sequencing [20].

Residual CFTR function

The CFTR function was evaluated by the delta chloride (ΔCl), which is the variation of NPD in response to electrolytic solutions with amiloride and isoproterenol, a substance that stimulates the Cl^- movement across CFTR. NPD measurements were performed as previously described [5, 21]. It was used Ag/AgCl electrodes, a high-impedance voltmeter (Millivoltmeter Knick Portames 910[®], Elscolab, Germany) with recording and storing of measurement at every 10 seconds and an exploring electrode placed inside a Foley urinary catheter filled with a conductor cream (Signa[®] Cream, Parker, USA, in Ringer's lactate 1:1) to form a bridge with the reference electrode. The reference electrode was placed over an exfoliated skin area on the volar surface of forearm. The quality of the contact was checked by measuring the finger potential difference. The Foley catheter was introduced into the nostril below the inferior nasal turbinate and placed at the site of the most stable negative voltage after an anterior rhinoscopy was performed to check nasal anatomy and mucosal integrity. After maximum stable NPD stabilization (NPD_{max}) measurements were performed with perfusion of standardized warmed solutions (37° C) in the following sequence: (1) NPD at the end of basal solution superfusion (NPD_{basal}); (2) NPD response to basal solution with 100 mM amiloride (Δamil); (3) NPD response to zero chloride solution with 100 mM amiloride ($\Delta\emptyset\text{Cl}$); (4) NPD response to zero chloride solution with 100 mM amiloride and 10 mM isoproterenol (Δiso) and (5) the chloride response: sum of $\Delta\emptyset\text{Cl} + \Delta\text{iso}$ (ΔCl). Two indexes that took into account sodium and chloride transportation were calculated: the $\Delta\text{amilo-iso}$

($\Delta_{amil} + \Delta_{iso}$), described by Bienvenu et al. [22] and the NPD index, described by Wilschanski et al ($NPD_{index} = e^{(\Delta_{Cl} + \Delta_{iso} / \Delta_{amil})}$) [23]. The nostril with the highest (most negative) NPD_{max} was chosen for analysis.

Statistical analysis

Descriptive analysis of continuous variables was expressed as median (range) or n (%) and correlation between groups was explored by box-plot, scatterplot or Spearman's rank correlation. Univariate analysis between group comparisons of continuous variables were made using ANOVA. Post hoc comparisons were performed using Student's *t* test or Tukey-Kramer HSD test. Multivariate analysis for comparisons was tested using Spearman's rank correlation test or the non-parametric Mann-Whitney U test. For genotype correlations the subjects were divided in three groups: F508del mutation in two alleles (homozygous F508del), F508del mutation in one allele and any other CFTR mutation in the opposite allele or not identified (heterozygous F508del) and with other or not identified CFTR mutation in both alleles (other/other).

SPSS 18.0 software was used; *p*-value <0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

NPD was measured in 29 patients with CF. Clinical characteristics and CFTR genotypes are presented in table 1. The age of the patients ranged from 3 months to 28 years and sweat chloride concentration from 53 to 109 mEq/L. Most of the patients were pancreatic insufficient and *Pseudomonas aeruginosa* positive, 22 (75%) and 18 (62%), respectively. The mean percentage of predicted FEV1 was 80%, with range of 23% to 133% FEV1.

The CFTR genotype was distributed as follows: homozygous F508del: 7 patients; heterozygous F508del: 12 patients (F508del/1812-1G>A: 2 patients; F508del/G542X: 1 patient; F508del/R1066H: 1 patient; F508del/3132delTG: 1 patient; F508del/not identified: 6 patients) and other/other: 10 patients (12307insA/not identified: 1 patient; not identified/not identified: 9 patients).

The ΔCl , neither other NPD parameters, did not show correlation with sweat chloride concentration. The CFTR function also was not correlated to pancreatic insufficiency, *Pseudomonas aeruginosa* positivity or pulmonary function. However it was showed a strong correlation between pancreatic insufficiency and more negative maximal NPD (NPDmax) ($p < 0.001$), a parameter that reflects the epithelial Na^+ transport abnormality by ENaC, and there was a moderate inverse association between %FEV1 and NPDmax ($r = 0.3$; $p = 0.067$).

Pseudomonas aeruginosa positivity showed correlation with lower NPD response to zero chloride solution with 100 mM amiloride (ΔCl) ($p = 0.019$), a parameter that evaluates the chloride movement across other epithelial channels that are not the CFTR (Figure 1). Between the *Pseudomonas aeruginosa* negative patients the age ranged from 3 months to 25 years (mean: 12,5 years) and the genotype was the following: F508del/F508del: 2 patients, F508del/R1066H: 1 patient, F508del/not identified: 2 patients, not identified/not identified: 5 patients.

The residual CFTR function showed relation to genotype severity. There was a clear relation between the presence of F508del mutation (homozygous F508del and heterozygous F508del) and lower ΔCl , as also as to the indexes $\Delta\text{amilo-iso}$ and NPDindex (Figure 2). The mainly differences was between ΔCl and NPD index (ΔCl : F508de/F508del and F508del/other: $p = 0.99$; F508de/F508del and other/other: $p = 0.04$; F508del/other and other/other: $p = 0.03$; NPDindex: F508de/F508del and F508del/other: $p = 0.80$; F508de/F508del and other/other: $p = 0.08$; F508del/other and other/other: $p = 0.02$). It was also observed a relation between higher NPDmax and F508del homozygous group (NPDmax: F508de/F508del and F508del/other: $p = 0.20$; F508de/F508del and other/other: $p = 0.04$; F508del/other and other/other: $p = 0.60$)

Table 1 – Clinical and genotype data of the CF patients

Variable	CF patients (n= 29)
Age, years	15.3 (0.25 - 28)
Female (n, %)	18 (62)
Sweat chloride, mEq/L	72 (53 - 109)
Pancreatic insufficiency (n, %)	22 (75)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> positive (n, %)	18 (62)
% predicted FEV1	80 (28 – 133)
CFTR Genotype (n, %)	
F508del/F508del	7 (24)
F508del/Other	12 (42)
F508del/G542X	1 (3)
F508del/1812-1G>A	2 (7)
F508del/3132delTG	1 (3)
F508del/R1066H	1 (3)
F508del/not identified	7 (24)
Other/Other	10 (34)
2307insA/not identified	1 (3)
not identified/not identified	9 (41)

CF: cystic fibrosis; CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; FEV1: forced expiratory volume in one second. F508del/F508del: F508del mutation homozygous; F508del/Other: one F508del allele and other CFTR mutation or not identified; Other/Other: other CFTR mutation in one or both alleles or not identified. The data were presented as mean (range) and counting (percentage).

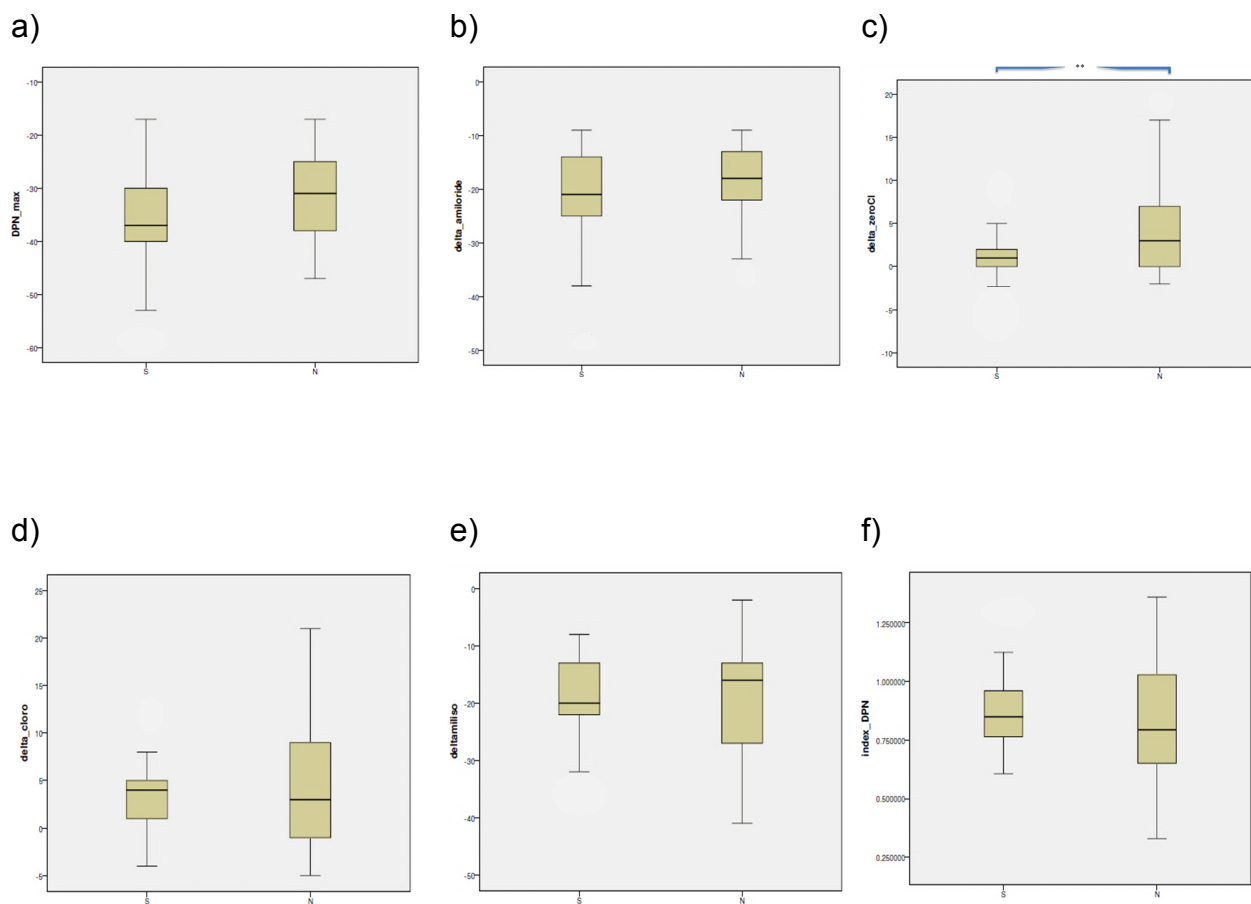


Figure 1. Box plot showing NPD and *Pseudomonas aeruginosa* respiratory culture (S: positive; N: negative) a.) maximal nasal potential difference (NPDmax), b.) amiloride response (Δ amiloride), c.) response to zero chloride solution ($\Delta\emptyset$ Cl), d.) sum of response to zero chloride and isoproterenol (Δ Cl), e.) sum of Δ amiloride and Δ isoproterenol (Δ amilo-iso) and f.) NPD index ($NPD_{index} = e^{(\Delta\emptyset Cl + \Delta iso / \Delta amil)}$). ** $p < 0,05$.

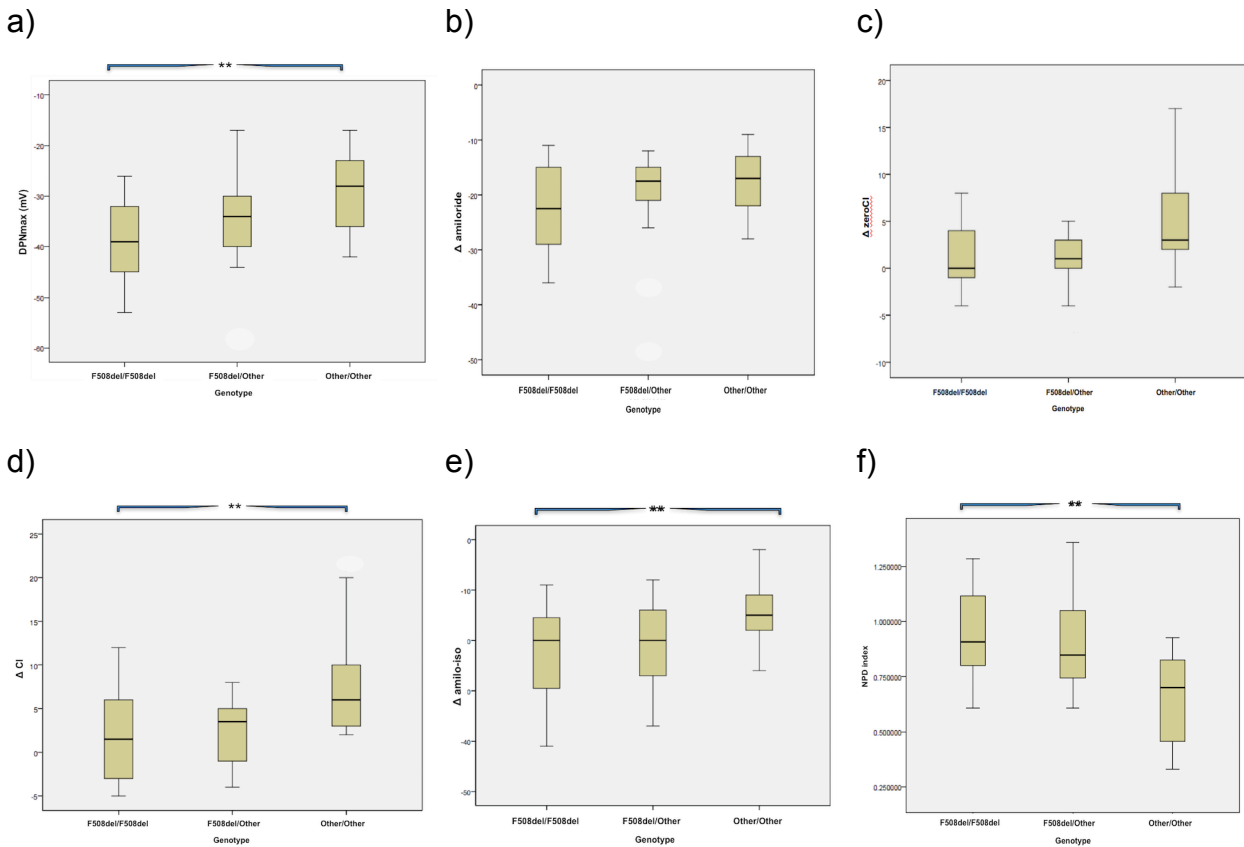


Figure 2. Box plot showing NPD in three genotype groups: 1.) homozygous F508del (F508del/F508del), 2.) F508del mutation in one allele and any other CFTR mutation in the opposite allele or not identified (F508del/Other) and 3.) others or not identified CFTR mutations in one or both alleles (Other/Other): a.) maximal nasal potential difference (NPD_{max}), b.) amiloride response (Δ amiloride), c.) response to zero chloride solution ($\Delta\emptyset$ Cl), d.) sum of response to zero chloride and isoproterenol (Δ Cl), e.) sum of Δ amiloride and Δ isoproterenol (Δ amilo-iso) and f.) NPD index ($NPD_{index} = e^{(\Delta\emptyset Cl + \Delta_{iso} / \Delta_{amil})}$). ** p < 0,05.

DISCUSSION

NPD was primarily used in research on the bioelectric characteristics of nasal epithelium in CF and later became important when used in diagnostic algorithms for atypical CF cases [24]. Nowadays it has a special interest as a surrogate end-point in clinical trials for cystic fibrosis disease modifying drugs [25]. Its role as a clinical marker, based in the quantitative correlation between its measurements and CF phenotype, has also been investigated in several studies [4, 13-18, 26-29], but still there are speculations about its importance.

We did not find any correlation between CFTR function and clinical parameters. No relationship was found between all NPD parameters and sweat chloride concentration even in patients with established CF diagnosis. Similar results were found by others groups [4, 27, 28]. This is not surprising, since the main use of NPD is to identify suspected cases of CF with questionable sweat test. This finding is probably related to differences in CFTR activity in the two epithelia [28]. This difference was perceived in studies that evaluate the new drugs ivacaftor and VX-809, where the sweat chloride concentration response was more sensitive to small changes in CFTR activity than NPD [25].

Pancreatic insufficiency was not related to Cl^- movement across nasal epithelial cells. Instead, it was related to maximum NPD (NPD_{max}), a parameter that reflects the Na^+ transepithelial movement. Notwithstanding this result is probably influenced by the presence of the F508del mutation in two thirds of the alleles in the sample, which was the most common CF genetic background, similar correlation has already been described. Alton and colleagues in the beginnings of the 90s showed that poor nutrition was related to more negative NPD, but they did not mention how many subjects were pancreatic insufficient and they did not evaluate the dynamic changes in NPD. More recently, Leal and colleagues showed that in patients homozygous for the F508del mutation better nutritional and respiratory function in the absence of *Pseudomonas aeruginosa* infection is correlated to lower NPD (less Na^+ transport abnormality) [18]. However, Fajac and colleagues found relation between more Cl^- secretion and pancreatic sufficiency, while abnormal transport of Na^+ and regulatory function of CFTR was more related to the respiratory status [17].

Our group of CF patients with at least one *Pseudomonas aeruginosa* positive respiratory culture showed an interesting correlation with the magnitude of ΔCl : larger ΔCl was related to *Pseudomonas aeruginosa* negativity. This part of the NPD protocol assesses the Cl^- efflux in response to a favorable electrochemical gradient induced by the zero chloride solution and amiloride through all open Cl^- epithelial channels [12]. Although ΔCl also reflects the Cl^- cell permeability, it is not as specific to CF as cAMP-regulated Cl^- secretion evaluated by the response to zero chloride solution plus amiloride and isoproterenol [6]. Others studies that analyze the association between *Pseudomonas aeruginosa* infection and NPD did not find any correlation [4, 16 - 18]. But Green and colleagues when using the predicted CFTR function based on the CFTR mutation class found that the residual CFTR function delay acquisition of multiple respiratory pathogens in CF including *Pseudomonas aeruginosa* [30]. Studies of intestinal current measurement also did not find relationship between presence of residual chloride secretion and early *Pseudomonas aeruginosa* colonization [28]. Our finding needs to be confirmed in the future with a larger sample and controlled groups for better understanding

Twenty-eight patients were submitted to pulmonary function testing. No statistically significant correlation was found between %FEV1 and ΔCl , though it was perceived a trend of inverse relationship between %FEV1 and NPDmax ($r= 0,3$; $p=0,067$). A number of studies that examined the relationship between the extent of ion transport abnormality and the severity of pulmonary CF disease showed contrasting findings. The studies of Ho and Thomas were the only ones to show relation between FEV1 and chloride residual conductance [14, 16]. All other studies showed a relationship between FEV1 and sodium abnormalities, either by NPDmax or by response to amiloride [4, 5, 15-18].

The relationship between ΔCl and genotype in our study represent the association reported in the literature with lower ΔCl correlated with more severe genotype, considering the presence of F508del mutation. The genotype severity was also correlated to higher NPDmax, $\Delta\text{amilo-iso}$ and NPDindex. The first to describe that NPD can be used as a CFTR function marker associated to genotype was Ho and colleagues; they observed that there is a statistically significant correlation between mutations that lead to the presence of the CFTR protein in the apical cell

membrane and those which do not produce CFTR with the potential difference response to chloride secretion stimulated by isoproterenol [15]. Wilschanski and colleagues also examined the relationship between the number and severity of CFTR mutations and the degree of epithelial ion transport dysfunction mediated by CFTR. They concluded that there is a wide spectrum of transepithelial ionic changes, which correlates with the number and severity of the identified CFTR mutations with normal extreme values overlapping heterozygous “values” in the other extreme [29]. Bienvenu and colleagues confirmed these findings and demonstrated that the phenotype of airway transepithelial ion transport is a continuum and strongly associated with CFTR genotype [22]. Although our finding has confirmed this association trend, we found some patients homozygous for F508del mutation with residual CFTR function, which has already been reported in the literature [28].

Some limitations of our study should be mentioned. The major limitations were the relative small sample size and large percentage of not identified CFTR mutations. While we have more than three hundred CF patients in our clinics, we choose patients not chronically colonized by *Pseudomonas aeruginosa* and that are not using anti-pseudomonas inhaled antibiotics. This greatly reduced the sample. Besides this, a genotypic analysis by sequencing was not disposable to all patients.

Our conclusion with this study was that the residual Cl⁻ movement across CFTR does not have prognostic value. We showed that the relationships between the transmembrane transport defects, phenotype, and genotype are multiple. While the magnitude of sodium transmembrane transport abnormality, represented by more negative NPD_{max}, is related to pancreatic phenotype and to some degree with poorer pulmonary function, the magnitude of residual chloride transport is related to the genotype severity. So, the magnitude of CFTR dysfunction has diagnostic value while is the magnitude of the ENaC hyperfunction that has prognostic value.

The authors wish to thank all patients and parents who allowed this study and Fundo de Incentivo Educacional à Pesquisa do Hospital de Clinicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) which provides funding for this research could be conducted. The authors would also like to thank Dr. Teresinha Leal for NPD protocol training

The authors declare no potential conflict of interest.

References

- [1]. Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzky JT, Boucher RC. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science*, 1983; 221:1067–1070.
- [2]. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*, 1991; 253: 202–205.
- [3]. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*, 1995; 269:847–850.
- [4]. Simmonds NJ, D'Souza L, Roughton M, Alton EFW, Davies JC, Hodson ME. Cystic fibrosis and survival to 40 years: a study of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function. *Eur Respir J*, 2011; 37: 1076-1082.
- [5]. Alton E.W.F.W, Currie D, Logan-Sinclair R, Warner JO, Hodson ME, Geddes DM. Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 1990, 3:922-926.
- [6]. Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC. In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 445–455.
- [7]. CFTR2: http://www.cftr2.org/files/CFTR2_22July2013
- [8]. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, 1993; 73:1251–1254.
- [9]. Castellani C, Cuppens H, Macek Jr M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zieleenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis*, 2008; 7:179-196.

- [10]. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Sermet I, Schwarz M, Tzetis M, Wilschanski M, Bareil C, Bilton D, Castellani C, Cuppens H, Cutting GR, Drevinek P, Farrell P, Elborn JS, Jarvi K, Kerem B, Kerem E, Knowles M, Macek Jr M, Munck A, Radojkovic D, Seia M, Sheppard DN, Southern KW, Stuhmann M, Tullis E, Zielenski J, Pignatti PF, Ferec C. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cystic Fibrosis*, 2011; 10(2): S86-S102.
- [11] Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*, 2000; 67:117–33.
- [12]. Middleton PG, Geddes DM, Alton EFWF. Protocols for in vivo measurement of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium. *Eur Respir J*, 1994, 7: 2050-2056.
- [13]. Walker LC, Venglarik CJ, Aubin G, Weatherly MR, McCarty NA, Lesnick B, Ruiz F, Clancy JP, Sorscher EJ. Relationship between airway ion transport and a mild pulmonary disease mutation in CFTR. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 155:1684-1689.
- [14]. Ho LP, Samways JM, Porteous DJ, Dorin JR, Carothers A, Greening AP, Innes JA. Correlation between nasal potential difference measurements, genotype and clinical condition in patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 1997; 10:2018-2022.
- [15]. Fajac I, Hubert D, Bienvenu T, Richaud-Thiriez B, Matran R, Kaplan J-C, Dall'Ava-Santucci J, Dusser DJ. Relationships between nasal potential difference and respiratory function in adults with cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 1998; 12:1295-1300.
- [16]. Thomas SR, Jaffe A, Geddes DM, Hodson ME, Alton EFWF. Pulmonary disease severity in men with deltaF598 cystic fibrosis and residual chloride secretion. *Lancet*, 1999; 353:984-985.
- [17]. Fajac I, Hubert D, Guillemot D, Honoré I, nu T, Volter F, Dall'Ava-Santucci J, Dusser DJ. Nasal airway ion transport is linked to the cystic fibrosis phenotype in adult patients. *Thorax*, 2004; 59:971-976.

- [18]. Leal T, Fajac I, Wallace HL, Lebecque P, Lebacq J, Hubert D, Dall'Ava J, Dusser D, Ganesan AP, Knoop C, Wallemacq, Southern KW. Airway ion transport impacts on disease presentation and severity in cystic fibrosis. *Clin Biochem*, 2008; 41:764-772.
- [19]. LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel Jr PJ. Diagnostic sweat testing: the cystic fibrosis foundation guidelines. *J Pediatr*, 2007; 151:85-89.
- [20]. Streit C, Burlamaque-Neto AC, Abreu e Silva F, Giugliani R, Pereira MLS. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Genet Metab*, 2003(78):259-264.
- [21]. Leal T, Lebacq J, Lebecque, Cumps J, Wallemacq P. Modified method to measure nasal potential difference. *Clin Chem Lab Med*, 2003; 41(1):81-87.
- [22]. Bienvenu T, Sermet-Gaudelus I, Burgel PR, Hubert D, Crestani B, Bassinet L, Dusser D, Fajac, I. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Channel Dysfunction in Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010;181(10): 1078-1084.
- [23]. Wilschanski M, Famini H, Strauss-Liviatan N, Rivlin J, Blau H, Bibi H, Bentur L, Yahav Y, Springer H, Kramer MR, Klar A, Ilani A, Kerem B, Kerem E. Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 2001; 17:1208-1215.
- [24]. De Boeck K., Wilschanski M., Castellani C., Taylor C., Cuppens H., Dodge J., Sinaasappel M. and on behalf of the Diagnostic Working Group. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*, 2006; 61:627-635.
- [25]. De Boeck K, Kent L, Davies J, Derichs N, Amaral M, Rowe SM, Middleton P, de Jonge H, Bronsveld I, Wilschanski M, Melotti P, Danner-Boucher I, Boerner S, Fajac I, Southern K, de Nooijer RA, Bot A, de Rijke Y, de Wachter E, Leal T, Vermeulen F, Hug MJ, Rault G, Nguyen-Khoa T, Barreto C, Proesmans M, Sermet-Gaudelus I on behalf of the European Cystic Fibrosis Society Clinical Trial Network Standardisation Committee. CFTR biomarkers: time for promotion to surrogate end-point? *Eur Respir*

J, 2013; 41:203-216.

[26]. Sermet-Gaudelus I, Vallée B, Urbin I, Torossi T, Marianovski R, Fajac A, Feuillet M-N, Bresson J-L, Lenoir G, Bernaudin JF, Edelman A. Normal function of the cystic fibrosis conductance regulator protein can be associated with homozygous deltaF508 mutation. *Pediatr Res*, 2002; 52:628-635.

[27]. Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Sands D, Stremmler N, Vavrova V, Deneuille E, Reix P, Bui S, Huet F, Lebourgeois M, Munck A, Iron A, Skalicka V, Bienvenu T, Roussel D, Lenoir G, Bellon G, Sarles J, Macek M, Roussey M, Fajac J, Edelman A. Clinical phenotype and genotype of children with borderline sweat test and abnormal nasal epithelial chloride transport. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010;182: 929-936.

[28]. Derichs N, Mekus F, bronsveld I, Bijman J, Veeze HJ, Von der Hardt H, Tummler B, Ballmann M. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-mediated residual chloride secretion does not protect against early chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in F508del homozygous Cystic Fibrosis patients. *Pediatr Research*, 2004; 55:69-75.

[29]. Wilschanski M, Dupuis A, Ellis L, Jarvi K, Zielenski J, Tullis E, Martin S, Corey M, Lap-Chee T, Durie P. Mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene and *in vivo* transepithelial potentials. *Amer J Respir Crit Care Med*, 2006; 174: 787-794.

[30]. Green DM, McDougal KE, Blackman SM, Sosnay PR, Henderson LB, Naughton KM, Collaco JM, Cutting GR. Mutations that permit residual CFTR function delay acquisition of multiple respiratory pathogens in CF patients. *Respiratory Research*, 2010;11:140. Doi:10.1186/1465-9921-11-140.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste projeto permitiu a reprodução e padronização do teste da diferença de potencial nasal para aplicação no diagnóstico de casos atípicos de FC no nosso meio. Embora existam discussões sobre qual o melhor teste a ser utilizado perante esta condição clínica, a DPN é a opção melhor estudada, melhor padronizada e validada (Beekman et al, 2014). Embora o método para realização do teste seja trabalhoso e exija dedicação, apresenta vantagem por ser de relativo baixo custo comparado às demais opções, como o sequenciamento genético e a medida da corrente intestinal, poder ser repetido quantas vezes forem necessárias e poder ser realizado no paciente *in vivo*, sem necessidade de punções ou biópsias mais invasivas. A base da técnica que utilizamos para medida da DPN foi originalmente descrita por Alton e colegas do *Royal Brompton Hospital* de Londres, em 1990, o qual posteriormente participou da elaboração do protocolo de perfusão de soluções para teste das variações da DPN juntamente com Middleton, em 1994, mas com a pequena modificação introduzida por Leal e colegas do *St Luc University Hospital* de Bruxelas, em 2003 (Alton et al., 1990; Middleton et al, 1994; Leal et al., 2003). Leal modificou a técnica para que as soluções testadas fossem deglutidas pelo paciente e não fossem desprezadas no ambiente ocasionando a possibilidade de disseminação dos possíveis germes do paciente.

Nosso estudo sobre a medida da DPN em pacientes portadores de FC, em pacientes portadores de outras doenças que não são FC e em indivíduos sadios foi capaz de distinguir os grupos entre si e reproduzir os resultados de trabalhos anteriores. A DPN máxima, por alguns referida como DPN basal, foi significativamente mais negativa no grupo de pacientes com FC do que nos grupos controle (FC: -34mV, $p=0,001$; não-FC: -14 mV, sadios: -15 mV). A variação da DPN em resposta ao amiloride (Δ amil) nos pacientes com FC foi significativamente maior que nos controles (FC: -20mV, $p=0,001$; não-FC: -6mV e sadios: -6mV). A resposta ao isoproterenol (Δ CI) no grupo FC foi significativamente menor que nos grupos controle (FC:4mV, $p=0,001$, não-FC: 17mV e sadios:11mV). Os índices que avaliaram a relação entre os componentes que medem o transporte transmembrana de Na^+ e Cl^- , Δ amilo-iso e índice DPN, também foram diferentes no grupo FC

(Δ amiloride-iso: FC: -19, não-FC:-1 e sadios:-2; índice DPN: FC: 0,85, não-FC:0,11 e sadios:0,20). Através dos nossos resultados concluímos que a DPN apresenta sensibilidade de 96% e, especificidade de 96% para o diagnóstico de FC. A concordância entre as medidas da DPN das duas narinas foi satisfatória para todos os parâmetros avaliados, significando que para fins diagnósticos a narina com melhores valores da DPN deve ser considerada para interpretação.

Avaliamos a influência da presença de rinite sobre os valores da DPN. Embora a influência tenha sido leve, com leituras menores da NPDmax, Δ CI e índice DPN, a presença de rinite não levou a modificação na conclusão do resultado final do exame. Porém, nesta situação, a interpretação da DPN deve ser cautelosa e os resultados confirmados em novo exame, pelo risco de falso negativo para FC

Desta forma, a partir do nosso estudo estabelecemos os seguintes valores de referência da DPN (tabela 2);

Tabela 2- Medidas de referência da DPN no HCPA

Parâmetro	FC (média \pm DP)	Controles (média \pm DP)	Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade
DPN máxima (mV)	-34 \pm 9	-14 \pm 5	-20,5	91%	92%
Δ amiloride	-20 \pm 9	-6 \pm 3	-11,5	89%	95%
Δ zeroCI	3 \pm 5	11 \pm 8	14	95%	80%
Δ zeroCI+isoproterenol	1 \pm 5	5 \pm 3	8	94%	85%
Δ CI	4 \pm 5	11 \pm 7	6,5	79%	85%
Δ amiloride- isoproterenol	-19 \pm 9	-1 \pm 4	-8,5	95%	95%
Índice DPN	0,85 \pm 0,23	0,20 \pm 0,14	0,42	96%	96%

Os nossos resultados se mostraram reproduzíveis em relação aos de outros estudos, o que pode ser confirmado através da semelhança dos valores dos principais parâmetros da DPN entre indivíduos normais. A diferença entre os valores

da DPN nos pacientes com FC está provavelmente relacionada à frequência variável das mutações CFTR entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre os parâmetros da DPN no HCPA e publicados por Leal et. al., 2003 e Bienvenu et al., 2010.

	HCPA		Leal et al.		Bienvenu et al.	
	FC	Normal	FC	Normal	FC	Normal
DPN máxima (mV)	-34 ± 9	-14 ± 5	-45 ± 11	-17 ± 6	-43 ± 2	-16 ± 2
Δ amiloride	-20 ± 9	-6 ± 3	-26 ± 6	-8 ± 4	-26 ± 2	-7 ± 1
Δ zeroCl	3 ± 5	11 ± 8	2 ± 4	10 ± 6	5 ± 1	10 ± 2
Δ zeroCl+isoproterenol	1 ± 5	5 ± 3	2 ± 3	5 ± 2	-	-
Δ Cl	4 ± 5	11 ± 7	4 ± 5	15 ± 6	1 ± 1	5 ± 1
Δ amiloride-isoproterenol	-19 ± 9	-1 ± 4	-	-	25 ± 2	3 ± 1
Índice DPN	0,85 ±	0,20 ±	-	-	0,83 ±	0,20 ±
	0,23	0,14			0,04	0,05

A análise da relação entre a presença de função residual da CFTR avaliada pela DPN, a qual supostamente conferiria melhor prognóstico, e marcadores fenotípicos como a concentração de cloro no suor, presença de insuficiência pancreática, positividade para *Pseudomonas aeruginosa* em cultura de material respiratório e função pulmonar mostrou que não existe nenhuma correlação entre estes parâmetros e sim com a gravidade do genótipo. Porém, outras correlações foram encontradas, como:

- maior DPN máxima e presença de insuficiência pancreática

-menor variação da DPN em resposta à instilação nasal de solução eletrolítica sem cloro e com amiloride e a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em pelo menos um cultural de material respiratório nos últimos seis meses

- maior DPN máxima e pior função pulmonar avaliada como percentual do VEF1.(correlação moderada).

Com relação ao genótipo, encontrou-se que a presença de função residual da CFTR está associada a genótipo menos grave, enquanto quem menor função CFTR, maior DPN máxima, maior Δ amilo-iso e maior índice DPN estão associados a genótipo mais grave, influenciado pela presença da mutação F508del.

Ou seja, a análise das correlações da DPN confirmou que existem inter-relações múltiplas entre os defeitos de transporte iônico na FC, as variáveis clínicas e o genótipo. Enquanto a magnitude das anormalidades do transporte transmembrana do íon sódio, representadas pela DPN máxima mais negativa, está relacionada principalmente ao fenótipo, o distúrbio no transporte transmembrana do cloro, representado principalmente pelo Δ Cl, está relacionado à gravidade do genótipo.

Em suma, nosso estudo foi fundamental para demonstrar a aplicabilidade local da DPN e possibilitar a sua utilização na rotina da investigação diagnóstica de FC

Por ser um teste de eletrofisiologia a DPN tem o potencial de ser aplicada em futuros projetos de pesquisa de estudo do transporte iônico epitelial, quais sejam:

- 1.) O papel da DPN na triagem neonatal de FC através da utilização de um protocolo adaptado ao recém-nascido;
- 2.) O perfil do transporte iônico transepitelial de pacientes portadores de Bronquiolite Obliterante (BO). BO é uma doença pulmonar obstrutiva crônica da infância frequentemente pós-infecciosa e com quadro clínico por vezes semelhante ao da FC. Presença de mutação CFTR em pacientes portadores de BO parece ser maior que na população normal, porém até o momento nenhum estudo sobre a DPN neste grupo de pacientes foi realizado.
- 3.) A DPN em portadores de asma de difícil controle. Alguns estudos demonstraram relação entre asma com pior função pulmonar e heterozigidade para mutações CFTR, enquanto estudos da DPN em asmáticos não mostraram diferenças da DPN em relação aos normais. Avaliação da DPN em um grupo específico de asmáticos ainda não foi realizada.

- 4.) As características da DPN em portadores de hipotireoidismo. Pacientes com hipotireoidismo podem apresentar dosagens de cloro no suor falso-positivas, porém o mecanismo envolvido não é bem explicado. Análise do comportamento do transporte dos íons Cl^- e Na^+ neste grupo de pacientes poderia trazer novas informações.

Referências

Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, Sagel SD, Hornick DB, Konstan MW, Donaldson SH, Moss RB, Pilewski JM, Rubenstein RC, Uluer AZ, Aitken ML, Freedman SD, Rose LM, Mayer-Hamblett N, Dong Q, Zha J, Stone AJ, Olson ER, Ordonez CL, Campbell PW, Ashlock MA, Ramsey BW. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CTR mutation. *N Engl J Med*, 2010; 363:1991-2003.

Ahrens RC, Standaert T, Launspach J, Han S-H, Teresi ME, Aitken ML, Kelly TJ, Hillard KA, Milgram LJH, Konstan MW, Weatherly MR, McCarty NA. Use of nasal potential difference and sweat chloride as outcome measures in multicenter clinical trials in subjects with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 2002, 33; 142-150.

Alsuwaidan S, Po ALW, Morrison G, Redmond A, Dodge JA, McElnay J. Effect of exercise on the nasal transmucosal potential difference in patients with cystic fibrosis and normal subjects. *Thorax*, 1994; 49:1249-1250.

Alton EFWF, Hay JG, Munro C, Geddes DM. Measurement of nasal potential difference in adult cystic fibrosis, Young's syndrome and bronchiectasis. *Thorax*, 1987; 42:815-817.

Alton EFWF, Currie D, Logan-Sinclair R, Warner JO, Hodson ME, Geddes DM. Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 1990, 3:922-926.

Augarten A, Hacham S, Kerem E, Kerem B, Szeinberg A, Laufer J, Doolman R, Altshuler R, Blau H, Bentur L et al. The significance of sweat Cl/Na ratio in patients with borderline sweat test. *Pediatr Pulmonol*, 1995; 20:369-371.

Baker E, Jeunemaitre X, Portal AJ, Grimbert P, Markandu N, Persu A, Corvol P, MacGregor G. Abnormalities of nasal potential difference measurement in Liddle's syndrome. *J Clin Invest*, 1998; 102(1):10-14.

Bear C.E., Li C., Kartner N., Bridges R.J., Jensen T.J., Ramjeesingh M., Riordan J.R. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*, 1992; 68:809-818.

Beauchamp M, Lands LC. Sweat-testing: A review of current technical requirements. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39: 507-511.

Beekman JM, Sermet-Gaudelus I, De Boeck K, Gonska T, Derichs N, Mall MA, Mehta A, Martin U, Drumm M, Amaral MA. CFTR functional measurements in human models for diagnosis, prognosis and personalized therapy: Report on the pre-conference meeting to the 11th ECFS Basic Science Conference, Malta, 26–29 March 2014. *J Cyst Fibros*, 2014; 13(4): 363-72. DOI: 10.1016/j.jcf.2014.05.007

Biennu T, Sermet-Gaudelus I, Burgel PR, Hubert D, Crestani B, Bassinet L, Dusser D, Fajac, I. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Channel Dysfunction in Non–Cystic Fibrosis Bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010;181(10): 1078-1084.

Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of *CFTR* mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation*, 2002; 19(6): 575-606. DOI: 10.1002/humu.10041

Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Sermet I, Schwarz M, Tzetis M, Wilschanski M, Bareil C, Bilton D, Castellani C, Cuppens H, Cutting GR, Drevinek P, Farrell P, Elborn JS, Jarvi K, Kerem B, Kerem E, Knowles M, Macek Jr M, Munck A, Radojkovic D, Seia M, Sheppard DN, Southern KW, Stuhmann M, Tullis E, Zielenski J, Pignatti PF, Ferec C. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cystic Fibrosis*, 2011; 10(2): S86-S102.

Boucher RC, Stutts MJ, Gatzky JT. Regional differences in canine airway epithelial ion transport. *J Appl Physiol*, 1981; 51:706-714.

Boucher RC. Cystic Fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends in Molecular Medicine*, 2007; 13(6): 231-240.

Boyle MP, Diener-West M, Milgram L, Knowles M, Foy C, Zeitlin P, Standaert T. A multicenter study of the effect of solution temperature on nasal potential difference measurements. *Chest*, 2003;124:452-489.

Bromberg P, Buntin W, Gatzky J, Boucher R. In vivo measurements of tracheal bioelectric potential differences in normal human subjects. *Physiologist*, 1979; 22(4):15. (Abstract)

Castellani C, Cuppens H, Macek Jr M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielewski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis*, 2008; 7:179-196.

CFTR2: http://www.cftr2.org/files/CFTR2_22July2013

Chung NC, Illek B, Widdicombe H, Phil D, Fischer H. Measurement of nasal potential difference in mild asthmatics. *Chest*, 2003; 123:1467-1471.

Clunes M.T., Boucher R.C. Cystic Fibrosis: The mechanisms of pathogenesis of an inherited lung disorder. *Drug Discov Today Dis Mech*, 2007; 4(2):63-72.

Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med*, 1998; 339:653-658.

Collie JTB, Massie RJ, Jones OAH, LeGrys VA, Greaves RF. Sixty-five years since the New York heat wave: advances in sweat testing for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 2014; 49(2):106-117. DOI 10.1002/ppul.22945

De Boeck K., Wilschanski M., Castellani C., Taylor C., Cuppens H., Dodge J., Sinaasappel M. and on behalf of the Diagnostic Working Group. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*, 2006; 61:627-635.

De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I, Sermet I, Vermeulen F, Sheppard DN, Cuppens H, Hug M, Melotti P, Middleton PG, Wilschanski M. on

behalf of the ECFS Diagnostic Network Working Group and the EuroCareCF WP3 group on CF diagnosis. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J Cystic Fibrosis*, 2011; 10 (2):S53-S66.

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; 10:1145-1149.

Di Sant' Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of the sweat in cystic fibrosis: Clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics*, 1953; 12: 549-563.

Durno C, Corey M, Zielenski J, Tullis E, Tsui L-C, Durie P. Genotype and phenotype correlations in patients with cystic fibrosis and pancreatitis. *Gastroenterology*, 2002; 123: 1857-1864.

Fajac I, Hubert D, Bienvenu T, Richaud-Thiriez B, Matran R, Kaplan J-C, Dall'Ava-Santucci J, Dusser DJ. Relationships between nasal potential difference and respiratory function in adults with cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 1998; 12:1295-1300.

Fajac I, Hubert D, Guillemot V, Honoré I, Bienvenu T, Volter F, Dall'Ava-Santucci J, Dusser DJ. Nasal airway ion transport is linked to the cystic fibrosis phenotype in adult patients. *Thorax*, 2004; 59: 971-976. DOI:10.1136/thx.2003.020933.

Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, LeGrys VA, Massie J, Parad R, Rock MJ, Cambell III PW. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr*, 2008; 153:S4-S14.

Ferec C, Cutting GR. Assessing the disease-liability of mutations in CFTR. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012; 2(12):a009480.

Flume PA, Van Devanter DR. State of progress in treating cystic fibrosis respiratory disease. *BMC Medicine*, 2012; 10:88

Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*, 2006; 440:477-483.

Gaillard EA, Shaw NJ, Subhedar NV, Wallace HL, Southern KW. Employing the nasal potential difference as a diagnostic test for cystic fibrosis in neonates: potential pitfalls. *J Pediatr*, 2002; 141(2):295-296.

Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, 1959; 23:545-549.

Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003; 168:918-951.

Gilljam M, Ellis L, Corey M, Zielenski J, Durie P, Tullis. Clinical manifestations of cystic fibrosis among patients with diagnosis in adulthood. *Chest*, 2004; 126:1215-1224.

Goubau C, Wilschanski M, Skalická V, Lebecque P, Southern KW, Sermet I, Munck A, Derichs N, Middleton PG, Hjelte L, Padoan R, Vasar M, De Boeck K. Phenotypic characterization of patients with intermediate sweat chloride values: towards validation of the European diagnostic algorithm for cystic fibrosis. *Thorax*, 2009; 64:683-691.

Gowen CW, Lawson EE, Gingras-Leatherman J, Gatzky JT, Boucher RC, Knowles MR. Increased nasal potential difference and amiloride sensitivity in neonates with cystic fibrosis. *J Pediatr*, 1986; 108:517-521.

Green DM, McDougal KE, Blackman SM, Sosnay PR, Henderson LB, Naughton KM, Collaco JM, Cutting GR. Mutations that permit residual CFTR function delay acquisition of multiple respiratory pathogens in CF patients. *Respiratory Research*, 2010;11:140. Doi:10.1186/1465-9921-11-140.

Guyton AC, Hall JE. Membrane potentials and action potentials. In: Guyton AC, Hall JE (Ed). *Textbook of Medical Physiology*, 11th edition. Elsevier Saunders. Philadelphia, USA, 2006; 57 – 70.

Hay JG, Geddes DM. Transepithelial potential difference in cystic fibrosis. *Thorax*, 1985; 40:493-496.

Ho LP, Samways JM, Porteous DJ, Dorin JR, Carothers A, Greening AP, Innes JA. Correlation between nasal potential difference measurements, genotype and clinical condition in patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 1997; 10:2018-2022.

Hodson ME. Respiratory system: Adults. In Hodson ME and Geddes DM (Ed). *Cystic Fibrosis*. Chapman & Hall Medical, London, UK.1995; 237-258.

Hoffman T, Bohmer O, Huls G, Terbrack HG, Bittner P, Klingmuller V, Heerd E, Lindemann H. Conventional and modified nasal potential difference measurement in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 133; 1908-1933.

Kerem E, Rave-Harel N, Augarten A, I Madgar, Nissim-Rafinia M, Yahav Y, Goshen R, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Genem A, Chiba-Falek O, Kraemer MR, Simon A, Branski D, Kerem B. A cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variant with partial penetrance associated with variable cystic fibrosis presentations. *Am J respire crit Care Med*, 1997; 155(6): 1914-1920.

Kerem E. Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy. *Pediatric Pulmonology*, 2005; 40:183-196.

Kersting U, Schwab A, Hebestreit. Measurement of human nasal potential difference to teach the theory of transepithelial fluid transport. *Am J Physiol (Adv Physiol Educ)*, 1998; 275(20): S72-S77.

Kessler WR, Andersen DH. Heat prostration in fibrocystic disease of the pancreas and other condition. *Pediatrics*, 1951; 8:648.

Kiesewetter S, Macek Jr M, Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, Shrimpton AE, Cashman SM, Tsui LC, Mickle J, Amos J, Highsmith WE, Shuber A, Witt DR, Crystal RG, Cutting GR. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal n=background. *Nat Genet*, 1993; 5:274-278.

Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 1981a, 305:1489-1495.

Knowles M, Carson J.L., Collier A.M., Gatzky J.T., Boucher R.C. Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. *Am Rev Respir Dis*, 1981b; 124:484-490.

Knowles MR, Stutts M.J., Spock A., Fischer N., Gatzky J.T., Boucher R. C. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science*, 1983; 221:1067-1070.

Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC. In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. *Human Gene Therapy*, 1995; 6:445-455.

Kunzelman K. Control of membrane transport by cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR). In Kirk KL and Dawson DC (Ed). *The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, Plenum Publishers, 2003; 55 – 93.

Leal T, Lebacq J, Lebecque, Cumps J, Wallemacq P. Modified method to measure nasal potential difference. *Clin Chem Lab Med*, 2003; 41 (1): 81-87.

Leal T, Fajac I, Wallace HL, Lebecque P, Lebacq J, Hubert D, Dall’Ava J, Dusser D, Ganesan AP, Knoop C, Wallemacq, Southern KW. Airway ion transport impacts on disease presentation and severity in cystic fibrosis. *Clin Biochem*, 2008; 41:764-772.

Lebecque P, Leal T, De Boeck C, Jaspers M, Cuppens H, Cassiamn J-J. Mutations of the cystic fibrosis gene and intermediate sweat chloride levels in children. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002; 165:757-761.

LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel Jr PJ. Diagnostic sweat testing: the cystic fibrosis foundation guidelines. *J Pediatr*, 2007; 151:85-89.

Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy, *Clin Biochem*, 2012; 45:1132-1144. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.05.034.

Mak V, Zielenski J, Tsui L-C, Durie P, Zini A, Martin S, Longley TB, Jarvi KA. Proportion of cystic fibrosis gene mutations not detected by routine testing in men with obstructive azoospermia. *JAMA*, 1999; 281:2217-2224.

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: 2050-2056.

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

Moskovitz SM, Chmiel JF, Stern DL, Cheng E, Gibson RL, Marshall SG, Cutting GR. Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet Med*, 2008; 10(2):851-868.

Noone PG, Zhou Z, Silverman LM, Jowell PS, Knowles MR, Cohn JA. Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. *Gastroenterology*, 2001; 121: 1310- 1319.

Okiyoneda T, Barrière H, Bagdany M, rabe WM, Du K, hohfeld J, Young JC, Lukacs GL. Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science*, 2010:329(5993): 805-810.

Pradal U, Castellani C, Delmarco A, Mastella G. Nasal potential difference in congenital bilateral absence of the vas deferens. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998; 158:896-901.

Quinton PM, Bijman J. Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 1983; 308:1185–1189.

Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, 1983; 301:421-422.

Ramsey B, Marshall S. Respiratory system: Pediatrics. In Hodson ME and Geddes DM (Ed). *Cystic Fibrosis*. Chapman & Hall Medical, London, UK.1995; 215-236.

Ramsey BW, Davies J, McElvaney G, Tullis E, Bell SC, Drevinek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordonez C, Elborn JS for the VX08-770-102 Study Group. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*, 2011; 365:1663-1672.

Raskin S, Pereira-Ferrari L, Reis FC, Abreu F, Marostica P, Rozov T, Cardieri J, Ludwig N, Valentin L, Rosario-Filho NA, Camargo Neto E, Lewis E, Giugliani R, Diniz EMA, Culp L, Philip III JA, Chakraborty R. 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 Cystic Fibrosis*, 2008; 7:15-22.

Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B-S., Alon N, Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielinski J., Plavsic S.L.N., Chou J-L., Drumm M.L., Iannuzzi C.M., Collins FS., Tsui L-C. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 1989; 245:1066-1072.

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

Rogan MP, Stolz DA, Hornick DB. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator intracellular processing, trafficking and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest*, 2011;139 (6):1480-1490.

Rosenstein B.J, Cutting G.R. The diagnosis of Cystic Fibrosis: A Consensus statement. *J Pediatr*, 1998; 132:589-95.

Rosenstein B.J. What is a Cystic Fibrosis Diagnosis? In: Fiel S (Ed). *Clinics in Chest Medicine: Cystic Fibrosis*, 1998; 19: 423-442.

Sauder RA, Chesrown SE, Loughlin GM. Clinical application of transepithelial potential difference measurements in cystic fibrosis. *J Pediatr*, 1987; 111:353-358.

Schuler D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Ballmann M, Dechaux M, Edelman A, Hug M, Leal T, Lebacq J, Lebecque P, Lenoir G, Stanke F, Wallemacq P, Tummler

B, Knowles MR. Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2004; 3:151-155.

Sermet-Gaudelus I, Vallée B, Urbin I, Torossi T, Marianovski R, Fajac A, Feuillet M-N, Bresson J-L, Lenoir G, Bernaudin Jf, Edelman A. Normal function of the cystic fibrosis conductance regulator protein can be associated with homozygous deltaF508 mutation. *Pediatr Res*, 2002; 52:628-635.

Serohijos AWR; Hagedus T, Aleksandrov AA, He L, Cui L, Dokholyan NV, Riordan JR. Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *PNAS*, 2008; 105(9):3256-3261.

Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med*, 1998; 339:645-652.

Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*, 1999; 79:23-45.

Shwachman H, Mahmoodian A. Pilocarpine iontophoresis sweat testing: results of seven years' experience. In Rossi E, Stoll E (Ed). *Modern Problems in Pediatrics*, Basel: Karger, 1967; 158-182.

Simmonds NJ, D'Souza L, Roughton M, Alton EFW, Davies JC, Hodson ME. Cystic fibrosis and survival to 40 years: a study of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function. *Eur Respir J*, 2011; 37: 1076-1082.

Southern KW, Noone PG, Bosworth DG, LeGrys VA, Knowles MR, Barker PM. A modified technique for measurement of nasal transepithelial potential difference in infants. *J Pediatr*, 2002; 139:353-358.

Standaert TA, Boitano L, Emerson J, Milgram LJ, Konstan MW, Hunter J, Berclaz PY, Brass L, Zeitlin PL, Hammond K, Davies Z, Foy C, Noone PG, Knowles MR. Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: an outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatr Pulmonol*, 2004, 37; 385-392.

Stewart B, Zabner J, Shuber AP, Welsh MJ, McCray JR PB. Normal sweat chloride do not exclude the diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995; 151(3):899-903.

Taylor CJ, Hardcastle J, Southern KW. Physiological measurements confirming the diagnosis of cystic fibrosis: the sweat test and measurements of transepithelial potential difference. *Paediatr Respir Rev*, 2009; 10(4):220-226.

Thomas SR, Jaffe A, Geddes DM, Hodson ME, Alton EFWF. Pulmonary disease severity in men with deltaF598 cystic fibrosis and residual chloride secretion. *Lancet*, 1999; 353:984-985.

Vanscoy LL, Blackman SM, Collaco JM, Bowers A, Lai T, Naughton K, Algire M, McWilliams R, Beck S, Hoover-Fong J, Hamosh A, Cutler D, Cuttong GR. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007; 175:1036-1043.

Walker LC, Venglarik CJ, Aubin G, Weatherly MR, McCarty NA, Lesnick B, Ruiz F, Clancy JP, Sorscher EJ. Relationship between airway ion transport and a mild pulmonary disease mutation in CFTR. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 155:1684-1689.

Wang Z, Milunsky J, Yamin M, Maher T, Oates R, Milunsky A. Analysis by mass spectrometry of 100 cystic fibrosis gene mutations in 92 patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod*, 2002; 17(8): 2066-2072.

Wang W, El Hiani Y, Linsdell P. Alignment of transmembrane regions in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *JGP*, 2011; 138(2):165-178.

Ward CL, Kopito LL. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem*, 1994; 269(41): 25710-25718.

Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, 1993; 73:1251-1254.

Wilschanski M, Famini H, Strauss-Liviatan N, Rivlin J, Blau H, Bibi H, Bentur L, Yahav Y, Springer H, Kramer MR, Klar A, Ilani A, Kerem B, Kerem E. Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 2001; 17:1208-1215.

Wilschanski M, Dupuis A, Ellis L, Jarvi K, Zielenski J, Tullis E, Martin S, Corey M, Lap-Chee T, Durie P. Mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene and *in vivo* transepithelial potentials. *Amer J Respir Crit Care Med*, 2006; 174: 787-794.

Wilson DC, Ellis L, Zielenski J, Corey M, Wan F, Tsui L-C, Tullis E, Knowles M, Durie PR. Uncertainty in the diagnosis of cystic fibrosis: possible role of *in vivo* nasal potential difference measurements. *J Pediatr*, 1998; 132:596-599.

Wood A, Higenbottam T, Jackson M, Scott J, Stewart S, Wallwork J. Airway mucosal bioelectric potential difference in cystic fibrosis after lung transplantation. *Am Rev Respir Dis*, 1989; 140:1645-1649

Yaakov Y, Kerem E, Yahav Y, Rivlin J, Blau H, Bentur L, Aviram M, Picard E, Bdolah-Abram T, Wilschanski M. Reproducibility of nasal potential difference measurements in cystic fibrosis. *Chest*, 2007; 132:1219-1226.

Younger JM, Chen L, Ren HY, Rosser MFN, Turnbull EL, Fan CY, Patterson C, Cyr DM. Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell*, 2006; 126(3):571-582.

Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*, 2000; 67:117-133.

Anexos**MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL TRANSEPITELIAL****Formulário de Informação e de Consentimento**

As páginas deste documento devem ser numeradas (1/número total de páginas), e assinadas pelo médico investigador e pelo voluntário dando seu consentimento. Este documento tem duas vias originais: uma é cedida ao voluntário e uma é arquivada pelo médico investigador.

A fim de esclarecer minha decisão de participar como voluntário do teste ***Diferença de Potencial Nasal Transepitelial*** realizado pela ***Dra Elenara da Fonseca Andrade Procianoy***, declaro ter recebido as seguintes informações:

- ✓ O teste da diferença de potencial nasal é atualmente utilizado em muitos centros internacionais como um teste complementar ao teste do suor no diagnóstico da Fibrose Cística. Seu principal uso é no auxílio diagnóstico de casos atípicos, ou seja, incomuns, quando o teste do suor ou a genética não são decisivos podendo, desta forma, confirmar ou excluir a possibilidade de Fibrose Cística.
- ✓ Este projeto será desenvolvido com o objetivo de implementar este teste no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- ✓ Devido ao defeito básico na Fibrose Cística ocorrem alterações no transporte de sais de sódio e cloro através das células. Esta alteração leva a modificação da medida da diferença do potencial nasal dos pacientes com Fibrose Cística quando comparado aos valores correspondentes medidos nos indivíduos normais.
- ✓ Esta diferença de potencial transepitelial pode ser medida na mucosa nasal.
- ✓ O teste do potencial nasal é um teste não-invasivo e não causa dor.
- ✓ Para sua realização o paciente deve permanecer sentado em uma poltrona, ligeiramente reclinado. A medida é realizada graças à introdução de uma sonda fina e flexível em uma das narinas a uma distância usualmente encontrada entre 2 a 7 cm do orifício de entrada. Durante a introdução da sonda pode-se sentir um ligeiro desconforto. Após a fixação da sonda no lugar ideal esta sensação de desconforto desaparece.
- ✓ O teste inclui instilação da narina com soluções que contém algumas substâncias terapêuticas, isto é, um diurético (amiloride) e um beta-agonista (isoproterenol), em doses muito pequenas. Nestas doses, estas substâncias não irão apresentar efeitos

farmacológicos ou tóxicos e não terão sabor desagradável. As soluções instiladas na cavidade nasal se acumulam na faringe e são consecutivamente deglutidas.

- ✓ Por precaução, este teste não deve ser realizado em mulheres grávidas ou durante o período de aleitamento.
- ✓ Não existem contra indicações reais ao teste.
- ✓ Nenhum efeito colateral tem sido observado durante ou após a realização deste teste.
- ✓ O teste não requer jejum.
- ✓ A duração do teste é em média de 20 minutos por narina. Habitualmente, ambas as narinas são analisadas.

Como voluntário, eu posso, em qualquer momento, pedir toda informação complementar ao médico investigador, **Dra. Elenara da Fonseca Andrade Procianoy** que antes da realização do teste estará disponível a responder a qualquer outra questão ou curiosidade adicional relativa ao teste.

Os dados recolhidos durante este teste serão mantidos em estrita confidencialidade. Estes resultados poderão ser consultados pela equipe médica presente durante a realização do mesmo. O nome do paciente ou voluntário NÃO aparecerá em nenhuma divulgação dos resultados obtidos.

Eu, _____ abaixo assinado, declaro ter lido e compreendido todas as informações relativas a realização do teste descrito acima.

Declaro igualmente ter tido a oportunidade de colocar todas as minhas dúvidas adicionais relativas ao teste. Declaro estar satisfeito com as respostas concedidas às minhas perguntas.

Aceito que os dados recolhidos na ocasião da realização do teste permanecerão como propriedades do médico investigador.

Afirmo o meu acordo formal através de minha assinatura do presente documento.

Porto Alegre,

Médico Investigador

Voluntário

Dra. Elenara da Fonseca Andrade Procianoy
 CREMERS 18236
 Unidade de Pneumologia Infantil
 Hospital de Clínicas de Porto Alegre
 Fone: 3359-8515
 Celular: 9990-2330

Anexo 2

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

UNIDADE DE PNEUMOLOGIA INFANTIL – SERVIÇO DE PEDIATRIA

MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL

Data do exame: ___/___/___ N° do exame: _____

Nome: _____

Prontuário: _____ Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: M () F ()

Endereço: _____

Telefone para contato: (___) _____

Motivo da realização do exame:

Portador de FC () Eletrólitos no suor limítrofes ()

IRT alterada + FC não confirmada ()

Outra patologia () Qual: _____

Controle sadio () Irmão com FC: sim () não ()

Outra: _____

História atual:

IVAS nas últimas 2 semanas: sim () não () Tabagismo: sim () não ()

Rinite: sim () não () Em uso de: _____

Polipose nasal: sim() não() Cirurgia nasal: sim() não() Quando: _____

Infertilidade: sim () não ()

Eletrólitos no suor:

Data: ___/___/___ Na: _____ mEq/L Cl: _____ mEq/L Peso: _____ mg

Data: ___/___/___ Na: _____ mEq/L Cl: _____ mEq/L Peso: _____ mg

Data: ___/___/___ Na: _____ mEq/L Cl: _____ mEq/L Peso: _____ mg

Genótipo para FC: _____ / _____ Data: ___ / ___ / _____ Não fez ()

Mutações pesquisadas: _____

OFFSETE INICIAL: _____

FINGER INICIAL: _____

DPN BASAL NARINA DIREITA: - _____ mV

DPN BASAL NARINA ESQUERDA: - _____ mV

DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL Narina: ()direita ()esquerda		
Início A2: _____ Início B1: _____ Início B2: _____ Início A1: _____ Término A1: _____		
Basal (A1): _____ - mV DPmax <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content;">Distância:</div>	Solução de amiloride(A2): _____ - mV Solução sem cloro(B1): _____ -mV Solução sem cloro + isoprenalina (B2): _____ -mV	
	Δ amiloride (-mV) : _____	Δ Cl (-mV): _____ + _____ = _____ (soma das variações obtidas após solução sem Cl e sol. sem Cl+iso)
	DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL Narina: ()direita ()esquerda Início A2: _____ Início B1: _____ Início B2: _____ Início A1: _____ Término A1: _____	
Basal (A1): _____ - mV DPmax <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content;">Distância:</div>	Solução de amiloride(A2): _____ - mV Solução sem cloro(B1): _____ -mV Solução sem cloro + isoprenalina (B2): _____ -mV	
	Δ amiloride (-mV) : _____	Δ Cl (-mV): _____ + _____ = _____ (soma das variações obtidas após solução sem Cl e sol. sem Cl+iso)

FINGER FINAL: _____

OFFSETE FINAL : _____

PARA PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

Idade do diagnóstico de FC : _____ anos _____ meses (data : ____/____/____)

Sintomas ao diagnóstico de FC:

() triagem neonatal () ileo meconial () sintomas respiratórios crônicos

() diarreia () baixo peso/desnutrição () suor salgado

() desidratação hiponatrêmica () história familiar

() outro(s) : _____

Insuficiência pancreática : sim () não ()**Colonização pulmonar atual: (considerar últimos 6 meses)**

P. aeruginosa () P. aeruginosa mucóide ()

Complexo Burkholderia cepacea () MSSA () MRSA () BGNNF ()

Outros patógenos: _____

Função pulmonar: data: ____/____/____

VEF1: _____ litros (____%) VEF1 Pós-BD: _____ litros (____%)

CVF: _____ litros (____%) CVF Pós-BD: _____ litros (____%)

FMEF: _____ litros (____%) FMEF Pós-BD: _____ litros (____%)

Dados clínicos da última consulta: data ____/____/____

Peso: _____ kg (percentil:____; escore Z:____)

Altura: _____ cm (percentil:____; escore Z:____)

IMC: _____ kg/m² (percentil:____; escore Z:____)**Escore de Schwachman:** _____ (data: ____/____/____)

Executor: _____