



RONNY TAH YEN NG

**Fibrose Cística: Avaliação diagnóstica através
da Diferença de Potencial Nasal e sua
correlação com duas mutações genéticas**

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RONNY TAH YEN NG

Fibrose Cística: Avaliação diagnóstica através da Diferença de Potencial Nasal e sua correlação com duas mutações genéticas

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Eulalia Sakano

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Otorrinolaringologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO RONNY TAH YEN NG E ORIENTADO PELO PROFa. DRa. EULALIA SAKANO.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

N499f Ng, Ronny Tah Yen, 1979-
Fibrose cística avaliação diagnóstica através da diferença de potencial nasal e sua correlação com duas mutações genéticas / Ronny Tah Yen Ng. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Eulalia Sakano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Proteína CFTR. 2. Mutação. 3. Diagnóstico. 4. Diferença potencial nasal. 5. Fibrose cística. I. Sakano, Eulalia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cystic fibrosis Diagnostic evaluation through nasal potencial difference and its correlation with two genetic mutations

Palavras-chave em inglês:

CFTR protein

Mutation

Diagnosis

Nasal potencial difference

Cystic fibrosis

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Eulalia Sakano [Orientador]

Shirley Shizue Nagata Pignatari

Reinaldo Jordão Gusmão

Data de defesa: 28-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

A minha esposa, Priscila, por seu apoio constante e incondicional,
minha incentivadora e motivadora permanente,
À minha filha Isabella, por me tornar mais humano,
e me fazer desejar ser uma pessoa melhor a cada dia.

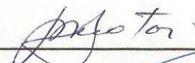
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

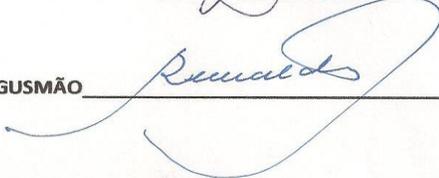
RONNY TAH YEN NG

Orientador (a) PROF(A). DR(A). EULALIA SAKANO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). EULALIA SAKANO 

2. PROF(A). DR(A). SHIRLEY SHIZUE NAGATA PIGNATARI 

3. PROF(A). DR(A). REINALDO JORDÃO GUSMÃO 

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 28 de agosto de 2013

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos

À Prof. Dra. Eulalia Sakano, por aceitar ser minha orientadora neste trabalho, exemplo de pessoa e profissional a ser seguido, que me incentivou e norteou-me desde o meu primeiro dia na residência médica; e quem me premia com sua excelência em pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro, do Departamento de Pediatria e do CIPED, pela sua expertise e vivência em extensão, bem como suas revisões e opiniões pontuais e de extremo valor, que contribuíram de forma imprescindível ao trabalho, tornando-o realizável.

À Enf. Silvana Dalge e, à Ft. Maria Ângela Ribeiro, do CIPED/ Grupo de Fibrose Cística, pelo apoio, paciência e auxílio na execução dos exames.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes e à pós-doutoranda Gláucia Coelho Mello, do departamento de Farmacologia, pelo seu auxílio técnico.

Ao doutorando Fernando de Lima Marson, do Departamento de Genética Médica, pelas suas contribuições técnicas e pessoais, que enriqueceram de forma única este trabalho.

Aos pacientes e voluntários, que contribuíram com este trabalho.

LISTAS

Lista de abreviaturas

CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*

Cl⁻: íon cloreto

DPN: diferença de potencial nasal

ENac: Epithelial sodium channel/ canal de sódio epitelial

FC: fibrose cística

HCO₃⁻: íon bicarbonato

IRT: Tripsinogênio Imunorreativo

mEq/L: miliequivalente/litro

mV: milivolt

TNN: triagem neonatal

vs. : versus

RESUMO

A fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva, resultante da ausência total na proteína CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), ou de alterações qualitativas ou quantitativas do gene que transcreve esta proteína, em células de diversos órgãos do corpo humano, resultando em inúmeros genótipos e fenótipos desta doença. Em muitos pacientes, o diagnóstico é difícil de ser definido, pelo método clássico de dosagem de sódio e cloro no suor, ou pelo sequenciamento genético, justificando a utilização de novas técnicas de auxílio diagnóstico, como a Diferença de Potencial Nasal (DPN). Este teste proporciona uma forma de avaliação direta e sensível, através do epitélio nasal, do transporte de sódio e cloro das membranas celulares, baseado nas propriedades bioelétricas transepiteliais. O objetivo deste trabalho foi verificar se existe diferença dos valores obtidos no exame de DPN em pacientes com FC em comparação com indivíduos controles saudáveis; e verificar se este teste permite diferenciar pacientes com FC das subclasses funcionais mais graves (I, II, III) das subclasses menos graves (IV, V, VI). Foram incluídos no estudo 15 pacientes FC, 10 com mutações mais graves (grupo A) e 5 com mutações menos graves (grupo B), e 21 controles saudáveis (grupo C). Foram considerados os seguintes parâmetros do teste da DPN: “Finger”, PDMax, Δ Amilorideo, Δ Amilorídeo+livrecloro e index de Wilchanski. Para a variável “Finger”, foi encontrada diferença entre pacientes com FC grupo B - mutações menos graves (classe IV, V ou VI) e indivíduos saudáveis – grupo C. O valor do index de Wilchanski mostrou diferença entre pacientes com FC grupo A - mutações mais graves (classes I, II ou III) e indivíduos saudáveis – grupo C. No nosso estudo, a DPN mostrou valores estatisticamente diferentes entre FC com 2 mutações conhecidas e sujeitos saudáveis. Porém, não conseguiu

diferenciar fibrocísticos com mutações mais graves (classes I, II e III) daqueles com mutações consideradas menos graves (classes IV, V e VI).

Palavras chaves: gene *CFTR*, mutação, diagnóstico, diferença potencial nasal, fibrose cística.

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disease, due to the total absence of protein CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), or due to qualitative or quantitative changes in the gene that transcript this protein in cells of various organs of the human body, resulting in numerous genotypes and phenotypes of the disease. In several patients, the diagnosis is difficult to be defined by the classical method of sodium and chloride dosage in sweat, or by genetic sequencing, justifying the use of new techniques for diagnosis, as the Nasal Potential Difference (NPD). This test provides a way of direct and sensitive assessment of the transport of sodium and chloride ions in cell membranes, via the nasal epithelium, based on transepithelial bioelectric properties. The objective of this work was to verify the difference of the values obtained in the examination of NPD in patients with CF compared with healthy control subjects, and, to verify if this test allows differentiating patients with more severe CF functional subclasses (I, II , III) from patients with less severe CF subclasses (IV, V, VI). This study included 15 CF patients, 10 with more severe mutations (group A) and 5 with less severe mutations (group B), and 21 healthy controls (group C). We considered the following test parameters of NPD: "Finger", PDMax, Δ Amiloride, Δ Amiloride+Chloridefree and Wilchanski index. For "Finger" values, it was found difference between patients with CF Group B - less severe mutations (class IV , V or VI) and healthy individuals - group C. The value of Wilchanski index showed difference between group A CF patients, with more severe mutations (class I, II or III) and healthy individuals - group C. In our study, NPD showed statistically different values between CF patients with two known mutations and healthy subjects. However, it was not able to

distinguish between CF patients with more severe mutations (class I, II and III) of the CF patients with less severe mutations (Class IV, V and VI).

Key words: *CFTR* gene, mutation, diagnosis, nasal potential difference, cystic fibrosis.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Casuística e métodos.....	33
4.2 Critério de Inclusão.....	33
4.3 Critério de Exclusão.....	33
4.4 Identificação das mutações no gene CFTR.....	34
4.5 Diferença de potencial nasal.....	34
4.6 Análise estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	38
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÃO.....	48

8.	REFERÊNCIAS.....	50
9.	ANEXOS.....	54
1.	Quadro Clínico de fibrose cística.....	56
2.	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduos Saudáveis.....	57
3.	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes com Fibrose Cística.....	59
4.	Protocolo metodológico de manipulação das soluções utilizadas no Teste de Diferença de Potencial Nasal e Cutâneo.....	61
5.	Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de Finger (mV).....	64
6.	Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de PDmax (mV).....	65
7.	Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de Δ amiloride (mV).....	66
8.	Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de Δ Chloride-free+isoproterenol.....	67
9.	Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de Índice de Wilschanski.....	68
10.	Tabela de das variáveis do potencial nasal em relação ao grupo de pacientes com fibrose cística da Universidade de Campinas e grupo controle	69
11.	Artigo submetido a Revista Rhinology Journal: <i>Nasal potential difference for the diagnosis of cystic fibrosis taking into account CFTR mutations</i> . Ronny Tah Yen Ng, Fernando Augusto de Lima Marson, Antônio Fernando Ribeiro, Carmen Sílvia Bertuzzo, José Dirceu Ribeiro, Eulália Sakano.....	70
10.	APÊNDICES	
10.1	Comprovante de apresentação trabalho congresso Rhinology 2013.....	90
10.2	Certificado de premiação: Melhor Trabalho – categoria apresentação oral, congresso Rhinology 2013.....	91
10.3	Capa da Rhinology Journal: edição vigente.....	92

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva com ampla variabilidade clínica, esta condicionada por mutações no gene *CFTR*, genes modificadores e fatores ambientais [1,2,3]. É uma doença multissistêmica que afeta diversos órgãos, com grau variável de comprometimento e gravidade, como o sistema respiratório, pancreático, gastrointestinal, hepatobiliar, reprodutor e glândulas sudoríparas. As anormalidades nos ductos sudoríparos são bem descritas e correlacionam com alto conteúdo de sódio e cloro no suor. As infecções pulmonares são reconhecidas como a principal causa que determina a morbidade e mortalidade na FC. [4]

A FC tem sido considerada a doença congênita letal mais comum em populações de origem caucasiana (Europa Central, América do Norte, Austrália). A incidência é variável entre os países e grupos étnicos (1:2500 caucasianos nascidos vivos na Europa e América do Norte) [19].

Os critérios para diagnóstico de FC são baseados na presença do quadro clínico (anexo 1) e a evidência da alteração do gene regulador da condutância da transmembrana da FC (*CFTR*). [5]. Os sinais clínicos para o diagnóstico da fibrose cística são a doença de vias aéreas, doença gastrointestinal e infertilidade devido à azoospermia obstrutiva. Uma história familiar positiva ou screening neonatal positivo podem ser auxiliares no diagnóstico. O transporte anormal de íons é mostrado pelas altas concentrações de sódio e cloro no suor e pelo aumento da diferença de potencial elétrico através do epitélio nasal.

Nos últimos anos, com o maior estudo da doença, tornou-se evidente a variabilidade das mutações, da gravidade e a dificuldade na obtenção do diagnóstico da FC [4]. A dosagem de sódio e cloro no suor, não é mais totalmente distinguível entre todos os pacientes com FC, sendo em alguns casos não positiva. O uso do sequenciamento do gene *CFTR* possibilitou o diagnóstico em alguns casos onde a clínica de FC está presente, mesmo com valores de cloro no suor limítrofes ou negativos. Nesse contexto, ficou evidente, que apenas o cloreto no suor não pode ser usado como diagnóstico da doença em alguns casos [5].

Ao mesmo tempo, o uso do sequenciamento completo não é possível para a maioria dos pacientes, em todas as regiões do mundo, pelo alto custo, dificuldade de realização da técnica, necessidade de pessoal especializado, número de mutações no gene *CFTR* elevado, falta de orçamento para a realização do teste com cobertura pelos sistemas públicos de saúde, dentre outros aspectos. Assim, novos métodos diagnósticos têm sido testados, dentre eles a diferença de potencial nasal [6,7], que não substituiria o sódio e cloro no suor, mas seria alternativo ao mesmo quando o outro não fosse possível, pela baixa quantidade de suor. Atualmente, sabe-se que, se alterações da proteína CFTR não forem demonstradas por algum dos seguintes métodos: *Teste do suor; Análise das mutações; confirmação de Triagem Neonatal, Função CFTR em células do intestino Medida da diferença de potencial nasal*, o diagnóstico definitivo não pode ser realizado.

Dosagem de sódio e cloro: O teste do suor deve utilizar métodos padronizados internacionalmente, ser realizado por pessoa experiente e em serviços que realizem diariamente um número razoável de testes, no sentido de assegurar a eficiência do laboratório e o padrão de qualidade do teste. Atualmente o único procedimento aceitável é a dosagem quantitativa de cloreto no suor, através do método da iontoforese por pilocarpina, padronizado por GIBSON &

COOKE (1959)(21). A análise deve ser realizada com um peso de suor obtido de no mínimo 100 mg.

A estimulação térmica, coleta de suor sem estimulação, métodos de condutividade ou de osmolaridade são menos confiáveis que a estimulação por pilocarpina e não devem ser usados para diagnóstico de FC por apresentarem resultados falso positivos e negativos (DENNING et al,1980)(20).

O resultado é considerado positivo quando a concentração de cloro é maior que 60 mEq/L, valor encontrado em 98% dos casos. Os níveis considerados normais vão até 45mEq/L. Adolescentes e adultos jovens porém podem ter valores mais elevados e desta forma, os resultados entre 45 e 60 mEq/L são considerados duvidosos e devem ser retestados. Pela gravidade da doença e pelo prognóstico reservado da mesma, o diagnóstico de FC somente poderá ser confirmado após o teste ser repetido em ocasiões diferentes. Não existe correlação entre a concentração de íons no suor e a gravidade da doença. (19)

Como controle de qualidade do teste é útil fazer-se também a dosagem de sódio no suor. Em pacientes com FC tanto o cloro como o sódio estão elevados, sendo que a diferença entre eles não pode ultrapassar 20 mEq/L e a relação cloro/sódio deve ser sempre maior que 1. Uma concentração de cloro maior que 160 mEq/L é fisiologicamente impossível (SCHULZ,1969) (23) sugerindo erro na coleta ou na dosagem.

O teste do suor pode ser falso positivo em algumas situações, geralmente doenças endócrinas ou metabólicas que tem características clínicas muito diferentes da FC, sendo raramente confundidas. As doenças mais freqüentes são:

Insuficiência Adrenal não tratada.

Displasia ectodérmica.

Hipoparatiroidismo.

Hipotireoidismo.

Diabetes insípido nefrogênico.

Deficiência de glicose 6-fosfatase.

Síndrome nefrótica.

Doença de Von Gierke.

Fucosidose.

Colestase familiar.

Pseudo hipo aldosteronismo.

Mucopolisacaridose.

Panhipopituitarismo.

Resultados falso negativos são encontrados nos lactentes com hipoproteinemia e edema.

O teste de suor normal não exclui o diagnóstico de formas atípicas de FC. Os casos duvidosos podem ser confirmados através do estudo genético ou da medida da diferença de potenciais do epitélio nasal.

Análise das mutações: A identificação de duas mutações conhecidas para FC é útil para se confirmar o diagnóstico em pacientes com FC atípica. Assim, nos pacientes que apresentem quadro clínico compatível com FC mas com teste do suor não conclusivo, a análise genética é importante na tentativa de se confirmar o diagnóstico.

Entretanto como já existem mais de 1500 mutações conhecidas para a FC e, segundo TSUI (1995)(22), o screening das 25 mutações mais frequentes, consegue detectar apenas 80 a 85% dos alelos de pacientes com FC, a confirmação do diagnóstico de FC baseado no teste genético do DNA é extremamente específico, porém não muito sensível.

Devido ao grande número de mutações existentes, mesmo com a melhora da sensibilidade dos testes genéticos, uma grande parcela dos pacientes com FC será portador de uma mutação não identificada. Para estes pacientes, o diagnóstico de fibrose cística deve ser confirmado através do teste do suor ou, se este não for conclusivo, da medida da diferença do potencial nasal.

Segundo HUFF e colaboradores (1979), 1 a 2% dos pacientes com FC tem teste do suor inconclusivo, com valores de cloro no suor entre 50 e 60 mEq/L. Estes pacientes em geral apresentam suficiência pancreática e um acometimento pulmonar discreto. Alguns pacientes podem apresentar manifestações clínicas sugestivas de FC, porém com teste do suor não conclusivo e com identificação de somente uma mutação genética. Nestes casos o diagnóstico não pode ser confirmado e o paciente pode ser acompanhado ou ser tratado, baseando-se na gravidade das manifestações clínicas, e identificando outras alterações sugestivas de FC, como polipose nasal, sinusite crônica, manifestações hepáticas ou biliares e colonização pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*.

Portanto, em relação à análise genética para confirmação do diagnóstico de FC, temos que:

- em pacientes com manifestações clínicas de FC, a identificação de duas mutações conhecidas de FC, confirma o diagnóstico.
- o achado de uma única mutação deve ser associado à confirmação de disfunção da CFTR, através do teste do suor ou da medida da diferença do potencial nasal.
- a não detecção de duas mutações, mesmo em laboratório especializado, não afasta o diagnóstico de FC.

Atualmente, existem mais de 1800 mutações identificadas na CF Mutations Database (www.genet.sickkids.on.ca/cftr) que podem ser agrupadas em 6 classes:

- I. CFTR não é sintetizada
- II. defeito na síntese da CFTR
- III. defeito na maturação da CFTR
- IV. defeito na condutância da CFTR
- V. redução parcial da função da CFTR
- VI. degradação gradativa e progressiva da CFTR

Defeito na regulação de outros canais também podem ocorrer.

As mutações das classes I-III são as mais freqüentes e estão associadas com insuficiência pancreática, sendo consideradas mutações com manifestações clínicas mais graves, pois englobam mutações que levam a produção de pouca ou nenhuma proteína; enquanto pacientes com mutações mais raras, classes IV-VI, não apresentam a insuficiência, sendo consideradas de fenótipo menos severo. (19)

A mutação mais frequente, responsável pela fibrose cística, está na classe 3 e é causada pela deleção da fenilalanina na posição 508 da CFTR. Esta mutação resulta em uma redução importante na função da CFTR, levando ao fenótipo clássico da fibrose cística com aumento de cloro no suor, infecções respiratórias recorrentes com bronquectasias e insuficiência pancreática precoce.

Há grande variação da freqüência relativa da mutação $\Delta F508$ entre regiões geográficas. No norte da Europa e América do Norte, atinge 70 a 90%, mas é muito menos freqüente na população mediterrânea, em que menos de 50% dos cromossomos FC têm essa mutação (24). A menor freqüência desta mutação foi encontrada na Turquia onde representa apenas 32%. (19)

No Brasil, a freqüência da mutação $\Delta F508$ foi estudada em 190 pacientes FC caucasóides, de cinco estados das regiões sul e sudeste, encontrando-se presente em 47% dos

alelos examinados, sendo 49% no Rio Grande do Sul, 27% em Santa Catarina, 44% no Paraná, 52% em São Paulo e 53% em Minas Gerais. (25)

Triagem Neonatal (TNN): baseada na dosagem da tripsina imunorreativa (TIR) sérica, precursora da enzima pancreática. Nos recém-nascidos fibrocísticos, ocorre o aumento de duas a três vezes no primeiro mês de vida, mesmo nos suficientes pancreáticos. A elevação da enzima é, provavelmente, decorrente da obstrução dos ductos pancreáticos na vida intra-uterina, com refluxo da esma circulação. Realizar duas amostras, a primeira ao nascimento e, se elevado, repetir uma segunda amostra após 15-30 dias. Se ambos valores forem elevados, confirmar o diagnóstico de FC com teste de suor ou genético. [2]

Diferença de potencial nasal (DPN): Medidas da diferença de potencial nasal são utilizadas para avaliar a voltagem através do epitélio nasal que está relacionada com o transporte de sódio e cloro através das membranas celulares. Como descrito por KNOWLES, GATZY, BOU CHE (1981), existe uma diferença no potencial elétrico através do epitélio respiratório, inclusive o nasal, devido ao transporte ativo de íons através desse epitélio. A diferença de potencial nasal foi demonstrada estar alterada na FC em 1981 e desde então, este método tem sido utilizado para aumentar a nossa compreensão da doença.

Diferentes epitélios tem diferentes características de transporte iônico e a magnitude da diferença de potencial varia, dependendo do local de medida.

A medida da diferença de potencial nasal é utilizada proporciona uma forma de avaliação direta e sensível, através do epitélio nasal, do transporte de sódio e cloro das membranas celulares, baseado nas propriedades bioelétricas transepiteliais [8]. Como descrito por

KNOWLES, GATZY, BOU CHE (1981)(3), existe uma diferença no potencial elétrico através do epitélio respiratório, inclusive o nasal, devido ao transporte ativo de íons através desse epitélio. A diferença de potencial nasal foi demonstrada estar alterada na FC em 1981 e desde então, este método tem sido utilizado para aumentar a nossa compreensão da doença e tem sido utilizado como ferramenta diagnóstica nos casos atípicos e que se suspeita de defeito do *CFTR*.

Nos casos em que o diagnóstico se apresentar duvidoso, apesar da história clínica fortemente sugestiva de FC, com teste do suor negativo ou borderline, ou em casos de mutações não encontradas no sequenciamento genético, ou nos casos de sintomas atípicos de FC, o DPN parece ser um teste promissor no auxílio diagnóstico, e também para avaliações mais objetivas do seguimento terapêutico de novas opções farmacológicas em testes. (13)

A premissa do teste se baseia no fato das anormalidades bioelétricas na mucosa da cavidade nasal dos FC refletirem as anormalidades encontradas no trato respiratório pulmonar. Nos indivíduos saudáveis, o potencial basal é mantido pelo balanceamento da absorção de sódio e o transporte de cloro, resultando num controle rigoroso da quantidade de líquido na superfície da via aérea e no conteúdo iônico, ambos importantes na manutenção do clearance mucociliar.(10,11,12,15)

A cavidade nasal é acessível, o que a torna um bom local para exame das características do transporte de íons do epitélio respiratório. A menos de 1 cm para dentro da cavidade nasal, o epitélio escamoso torna - se pseudocolunar ciliado, abaixo do corneto nasal inferior, apresentando as mesmas características das partes mais distais da via aérea. Utilizando a medida da DPN, KNOWLES e seus colaboradores (1981) foram capazes de demonstrar que a absorção de sódio era a atividade primária do transporte iônico no epitélio respiratório normal. (3,11)

A diferença de potencial pode ser medida utilizando-se um voltímetro de alta impedância entre dois eletrodos, um dentro e outro fora do epitélio. O eletrodo externo (eletrodo explorador) fica sobre a superfície do epitélio alvo, no caso, a mucosa do trato respiratório nasal. O eletrodo interno (eletrodo de referência) pode estar em qualquer compartimento interno do corpo, embora geralmente seja utilizado o tecido cutâneo e/ou subcutâneo do antebraço. O epitélio nasal é exposto a quatro tipos de solução em sequência e diante da resposta a cada uma delas, obtém-se o resultado do exame. (10,11)

JUSTIFICATIVA

Muitos pacientes encaminhados aos ambulatórios de FC, embora tenham manifestações clínicas compatíveis com FC, não apresentam o diagnóstico confirmado. Ou seja, apresentam valores de eletrólitos normais no suor, não apresentam as mutações mais frequentes da FC e, muitas vezes, apresentam apenas um alelo das mutações do gene CFTR.

Semelhante a outros centros de estudo em fibrose cística do mundo, iniciamos a utilização do teste da DPN, com o intuito de verificarmos a importância e os benefícios deste exame no diagnóstico da FC.

OBJETIVOS

Verificar se existe diferença dos valores obtidos nas variáveis do exame de diferença de potencial nasal (DPN) em pacientes com FC diagnosticados pela determinação de duas mutações no gene *CFTR* em comparação com indivíduos controles saudáveis.

Verificar se a DPN permite identificar diferenças entre pacientes com mutações de classe IV, V ou VI no gene *CFTR* em heterozigose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística e Método

Realizou-se um estudo de corte transversal com pacientes do Centro de Referência para atendimento de FC do hospital de Clínicas da FCM/Unicamp entre 2011 e 2013.

Foram convidados a participar da pesquisa pacientes com FC diagnosticados por características clínicas da doença, mais dois exames de cloro no suor maiores que 60 Eqs/litro e com duas mutações conhecidas do gene *CFTR*. O grupo controle foi composto por sujeitos saudáveis sem doenças agudas e crônicas.

Critério de inclusão

Para o grupo controle o critério de inclusão foi o aceite do estudo perante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo 2) e a ausência de sinais clínicos de FC ou quaisquer outras doenças agudas e crônicas. Para o grupo de pacientes, foram incluídos, sujeitos com FC diagnosticados pelo genótipo do gene *CFTR* completamente caracterizado (i.e. determinação de duas mutações no gene *CFTR*). No grupo de pacientes também foi necessário à assinatura do TCLE (anexo 3).

Critério de exclusão

Não identificação de mutação no gene *CFTR* para os pacientes com FC inicialmente incluídos no estudo por apresentarem sódio e cloro no suor com valores acima de 60 mEq/L, bem como, clínica da doença, tanto pulmonar como digestiva.

Identificação das mutações no gene *CFTR*

Para a identificação das mutações no gene *CFTR*, uma alíquota de sangue periférico foi obtida dos pacientes com FC. A extração do DNA foi realizada pelo método de fenol clorofórmio segundo protocolo padrão [16].

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Genética Molecular da FCM/Unicamp.

Inicialmente para todos os pacientes foi testada a mutação F508del, por ser a mais prevalente na população analisada, com origem predominantemente caucasiana, segundo o uso dos iniciadores: forward 5'-GGC ACC ATT AAA GAA AAT ATC-3' e reverse 5'-TGG CAT GCT TTG ATG ACG C-3'.

Posteriormente, como rotina diagnóstica foram testadas as mutações: G542X, R1162X, N1303K, G551D, R553X e W132X.

Para as demais mutações identificadas no gene *CFTR* foi realizado o sequenciamento dos exons, incluindo os limites exon/intron como previamente descrito [17], duplicações, deleções e identificação de LOH usando SALSA MLPA[®] Kit P091-C1 *CFTR*-MRC-Holland foi realizado como instruções dos fabricantes; e finalmente a identificação da mutação 1584-18672pb A>G (no intron 10) foi realizada como previamente descrito [18].

Diferença de potencial nasal

Para as medidas de DPN é utilizado voltímetro de alta impedância com capacidade de armazenagem para 100 dados (Knick Portamess 913[®], E) e eletrodos de AgCl de baixa impedância (<10³ ohms). O voltímetro foi configurado para registro das leituras a cada 10

segundos e as medidas foram transferidas a um computador através de um cabo de dados e armazenadas em um *software* específico do voltímetro (Paraly SW105).

O eletrodo 1, de referência, é posicionado e fixado na face anterior do antebraço esquerdo após escarificação cutânea com broca dentária de ponta de diamante acoplada a motor manual. O eletrodo 2, explorador ou de medida, é posicionado dentro do canal maior de uma sonda siliconada Folley estéril (sonda folley siliconado Rush Gold®) preenchida de creme condutor (Sigma Electrode Cream, Parker Laboratories®)

É realizado a medida “Finger”, com o eletrodo de medida entre os dedos indicador e polegar do paciente, embebidos em creme condutor, e depois posicionado a ponta da sonda folley a 3,0cm, 2,0cm, 1,5cm, 1,0cm e 0,5cm abaixo e posterior à cabeça do corneto inferior direito, pelo mesmo medico Otorrinolaringologista em todos os exames, sob auxílio de endoscópio rígido nasal, sendo obtidos medidas do PN em todas as posições, quando o mesmo se estabiliza por mais de cinco segundos. É considerado a medidas PDmax como o valor mais negativo dentre este últimos. A sonda é locada na posição 1,5 cm, com auxilio de fita adesiva tipo Transpore ® Johnson. Preferencialmente, o teste é realizado na cavidade nasal direita, sendo realizado na cavidade nasal esquerda somente em caso de alteração anatômica que impeça a progressão da sonda ou fixação da mesma.

Por essa sonda, são infundidas quatro soluções, a um fluxo de 5 ml/minuto, controlado por meio de bomba de infusão, em sistema ausente de bolhas de ar, previamente aquecidas para que tenham temperatura final dentro da cavidade nasal de 37°C, por três minutos cada, trocadas sequencialmente, sem pausa entre as mesmas, sendo estas soluções:

- Solução A – Ringer Lactato

- Solução B – solução A + amiloride
- Solução C – solução B + livre de cloreto
- solução D – solução C + isoproterenol

As soluções são preparadas previamente e acondicionadas em tubos tipo Falcon® dentro de freezer por um período não superior a seis meses, e descongeladas em refrigerador 24 horas antes do exame (anexo 4).

O voltímetro é programado para realizar uma medida de PN a cada 10 segundos, perfazendo um total de 18 medidas para cada solução, referente aos três minutos de perfusão de cada solução. Estes valores, após cada exame, são transferidos imediatamente a um computador desktop e via o software específico, prontamente convertidos em arquivos Excel (MS Office 2007®) e armazenados.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.17.0 (versão 17, SPSS Inc., Chicago,IL).

Cálculos amostrais de potência estatística foram realizados com software GPower 3.0.3.1 [Faul, 2007]. Considerando-se o teste de Kruskal-Wallis como parâmetro para estimar o poder da população para os testes estatísticos, com erro α igual a 0,05 e tamanho do efeito de 0,5, o poder estatístico de todos os testes realizados foi de 0,812, sendo acima de 0,80.

Os dados foram comparados pelo teste de Mann-Whitey (comparação entre os grupos A versus B, A versus C e B contra C) e Kruskal-Wallis (comparação entre os grupos A, B e C) para as variáveis do PN. Para evitar dados espúrios por causa de vários testes problemáticos [Draghici de 2003], o nível de significância α foi ajustado; utilizando o teste de correção de Bonferroni ($\alpha =$ corrigido 0.05/número de testes).

Os pacientes com FC foram divididos em subgrupos, de acordo com a mutação identificada no gene CFTR. Pacientes com duas mutações identificadas e pertencentes à classe I, II e III foram denominados de grupo A, e pacientes com pelo menos uma mutação identificada pertencente à classe IV, V e VI, foram identificados como grupo B. Os indivíduos controles foram considerados como grupo C.

RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 15 pacientes com FC e 21 controles saudáveis. Dos 15 pacientes com FC, 10 apresentavam mutações genéticas mais graves, de classe I, II ou III, e foram incluídos no grupo A; e 5 apresentavam mutações genéticas mais graves, de classe IV, V ou VI, e foram incluídos no grupo B. Os 21 sujeitos saudáveis formaram o grupo C.

No grupo A, os genótipos observados foram para os 10 pacientes incluídos: F508del/F508del (8 pacientes – mutação classe II), F508del/1717-1G>A (1 paciente – mutação classe II/classe I), F508del/G542X (1 paciente – mutação classe II/classe I). No grupo B, os genótipos observados foram para os 5 pacientes incluídos: F508del/1812-1G>A (1 paciente – mutação classe II/paciente - classe incerta), F508del/3272-26A>G (1 paciente – mutação classe II/classe V), F508del/D1152H (1 paciente – mutação classe II/classe IV), F508del/P205S (1 paciente – mutação classe II/classe IV), V562I/IVS8-5T (1 paciente – classe incerta /classe V).

Os dados obtidos pelo exame de diferença de potencial nasal descrevem os valores de média, desvio padrão, valor máximo, valor mínimo, intervalo de confiança e p na comparação entre os grupos de pacientes com FC e controles saudáveis, estão descritos na tabela 1(anexo 10).

Nela constam também as variáveis analisadas no exame: Finger (mV), PDmax (mV), Δ amiloride (mV), Δ Chloride free+isoproterenol(Δ Sem Cloreto + isoproterenol) e índice de Wilschanski ($e\Delta$ Chloride free + isoproterenol/ Δ amiloride).

Os dados em detalhes para cada momento do exame estão nos anexos 5 a 9, respectivamente, sendo: (5) posicionamento da sonda nasal abaixo do corneto inferior, (6) valores de referência para o Ringer (solução A) em 18 tempos durante a realização da medida do potencial nasal, (7) valores de referência para o amilorideo (solução B) em 18 tempos durante a realização da medida do potencial nasal, (8) valores de referência para a solução livre de cloro (solução C) em 18 tempos durante a realização da medida do potencial nasal, (9) valores de

referência para o Isoproterenol (solução D) em 18 tempos durante a realização da medida do potencial nasal.

Houve diferença estatisticamente significativa para os valores de “*Finger*” entre os grupos de FC classes I,II e III (grupo A) vs. IV, V e VI (grupo B) e, entre o grupo de FC classes IV, V e VI (grupo B) vs. indivíduos saudáveis (grupo C).

Houve diferença estatisticamente significativa para os valores de *PDmax* entre os grupos de FC classes I,II e III (grupo A) vs. IV, V e VI (grupo B).

Para os valores de $\Delta Amilorideo$, nenhuma diferença foi observada entre os grupos analisados.

Houve diferença estatisticamente significativa para os valores de *A Sem Cloreto + isoproterenol* entre os grupos de FC classes I,II e III (grupo A) vs. IV, V e VI (grupo B).

Houve diferença estatisticamente significativa para os valores do *índice de Wilschanski* entre os grupos de FC classes I,II e III (grupo A) vs. IV, V e VI (grupo B), e entre o grupo de FC classes I,II e III (grupo A) vs. indivíduos saudáveis (grupo C).

Houve diferença, para os valores obtidos, entre pacientes com FC e controles saudáveis para as soluções A (Ringer Lactato) e B (Amilorídeo). Nenhuma associação foi observada para as soluções C (livre de cloreto) e D (Isoproterenol). Em ambos os casos houve menores valores médios para as soluções A e B.

DISCUSSÃO

O diagnóstico e o manejo da FC no Brasil variam entre os centros de referências dos estados do país. Muitos problemas ainda são observados como: elevada proporção de casos não diagnosticados, diagnóstico tardio em muitos estados, poucos serviços em relação à demanda real e à estimada, reduzido número de profissionais de saúde envolvidos, doença subestimada pelas autoridades de saúde (baixos investimentos e reduzidas verbas de custeio), falta da TNN na maioria dos estados e produção científica ainda tímida.

Atualmente sabe-se que, se alterações da proteína CFTR não forem demonstradas por algum dos seguintes métodos: teste do suor, análise das mutações, medida da diferença de potencial nasal; função CFTR em células do intestino, função beta adrenergica das glândulas sudoríparas, o diagnóstico definitivo não pode ser realizado. (1,2,3,4,5)

Previamente ao início do teste de DPN, propriamente dito, pode ser obtida a medida “Finger”. Valores inferiores a -30 mV podem já inferir e predizer anormalidades nos outros parâmetros do teste, compatíveis com FC. A DP basal é negativa ou polarizada em pessoas sem FC, na magnitude de -15 a -25 mV. Este primeiro parâmetro, dentre todos da DP, parece ser o de maior variabilidade frente a doenças nasais, como polipose nasossinusal e infecções recentes de trato respiratório superior. (8,11)

Entretanto, o valor de “Finger”, parâmetro de medida fácil e rápida do potencial bioelétrico de membrana, mostrou resultados estatisticamente significativos entre paciente FC e saudáveis, podendo ser utilizado um screening rápido. Isto só reforça a aplicabilidade do teste, como um método pouco invasivo, pois ao ser realizado o restante do teste na narina, torna-se bastante acessível. (6,9,14)

A solução Ringer Lactato é uma solução eletricamente neutra, para lavagem e lubrificação da mucosa nasal, sem impacto do ponto de vista bioelétrico no potencial de membrana basal.

Em indivíduos saudáveis, o amilorideo, conhecido com droga bloqueadora da absorção de sódio intracelular, bloqueadora do canal ENaC, leva a uma redução na magnitude da DPN pela despolarização, isto é, a DP se torna menos negativa, tipicamente aproximando-se de valores entre 0 e -10mV. Entretanto há quase sempre alguma DP negativa residual, provavelmente relacionada com a secreção de ânion (HCO_3^- ou Cl^-)

Quando o epitélio é banhado com a solução com pouco ou sem íons cloro, um meio potencial para secreção extracelular de cloro é gerado, através dos canais CFTR. Em epitélios de não fibrocísticos, isto resulta em uma rápida e frequentemente ampla hiperpolarização da DP que, na presença de amilorideo, é definido ser secreção de cloro.

Este aumento na DP negativa pode ser potencializado pela adição de agentes conhecidos por aumentar a secreção de cloro, tais como o beta agonista, isoproterenol ou ATP. O isoproterenol aumenta o AMP cíclico intracelular, que ativa a secreção de cloro através do canal de cloro da CFTR.

Empregando-se protocolos de DP nasal com perfusão de diferentes drogas e soluções, diferentes aspectos das características do transporte iônico podem ser examinados. Na FC, o perfil de transporte iônico é anormal e a medida da diferença de potencial tem um número de aspectos que caracteriza o fibrocístico do não fibrocístico. Indivíduos com FC tem a linha de base mais negativa que o não fibrocístico [9,10,11] em razão da hiperatividade dos canais ENaC, decorrente da ausência de regulação da função do canal ENaC pelo *CFTR*. Como esperado, a resposta de despolarização pelo amiloride também é aumentada. Embora a anormalidade do transporte de sódio seja rapidamente verificada, a anormalidade mais consistente com FC, com maior sensibilidade e especificidade, é a ausência de hiperpolarização após a perfusão da solução

sem cloreto e do isoproterenol, indicador importante do transporte de ânion *CFTR-dependente*; marcador de seguimento frequentemente utilizado nos ensaios clínicos com paciente FC. Para este parâmetro, são geralmente considerados indivíduos normais valores <0,7 e alterados, valores >0,7 [12]. Junto ao índice de Wilschanski = $[e^{(\Delta_{\text{sem cloreto+isoproterenol}} / \Delta_{\text{amilorida}})}]$, são variáveis que mostram acurácia diagnóstica razoável, pois demonstram o transporte de ambos os íons: sódio e cloro [13].

Nossos resultados mostram pelo índice de Wilschanski que a DPN é estatisticamente diferente entre FC e saudáveis, porém o grupo de FC de mutações menos graves (Grupo B) não consegue se caracterizar como valores de FC ou de saudáveis.

O teste de diferença de potencial nasal e cutâneo mostra-se como um teste de boa reprodutibilidade em diferentes centros diagnósticos de FC, com correlação entre os resultados de revisões multicêntricos. A DPN também se mostrou fidedigno em estudos com repetição seriada das medidas, no seguimento por longos períodos, no mesmo paciente. [12,13].

Usualmente o teste DPN é realizado em apenas uma narina, sem diferença quando testada na narina contralateral. “Além disso, não existe diferença significativa entre a inserção do eletrodo de medida abaixo no corneto inferior ou direto no soalho da fossa nasal sob visualização direta ou às cegas” [14], nem tampouco em relação ao método de visualização para inserção da sonda com o eletrodo: via otoscópio, endoscópio ou fotoforo [15]. A DPN também mostra correlação similar em relação ao modo de inserção do eletrodo de referencia: via subcutânea vs. sobre a superfície da pele, após dermoabrasão [12, 15].

Dentre as limitações e dificuldades do teste, pode-se citar (14,15):

- faixa etária para cooperação do paciente;

- tempo para conservação das soluções: três meses em refrigerador e seis meses em freezer;

- estimulação na narina contralateral durante o teste, com produção de secreção nasal excessiva, o que pode inviabilizar o teste;

- fatores anatômicos, que dificultem a locação da sonda nasal;

- reflexo vagal, ao locar a sonda nasal

Em nosso conhecimento este é o primeiro estudo realizado no Brasil para verificar a DPN em pacientes com FC diagnosticados pela determinação de duas mutações no gene CFTR, em comparação com indivíduos saudáveis. Nosso estudo mostrou que as medidas da DPN podem diferenciar pacientes com FC de saudáveis, porém não foi capaz de identificar diferenças entre pacientes com mutações de classes I, II e III (maior gravidade) daqueles com mutações de classes IV, V ou VI (menor gravidade) no gene CFTR em heterozigose.

Estudo semelhante realizado no Hospital das Clínicas de Porto Alegre demonstrou valores de DPN claramente diferentes, segundo o autor, na sua amostra analisada, entre indivíduos FC e saudáveis. (26)

Vários estudos têm mostrado que a eletronegatividade de órgãos e sistemas na FC ficam comprometidos em graus diferentes dependendo da gravidade da mutação do gene CFTR. (8,9) Isto faz com que os valores de cloro no suor variem entre as diferentes mutações da FC. Com a introdução do TNN em nosso estado, a partir de 2010, as crianças com mutações graves provavelmente terão diagnóstico confirmado precocemente e serão conduzidas aos centros de referência especializados. (2)

Em contrapartida ainda não sabemos como se comporta a TNN nos pacientes com mutações de classes leves e se o Tripsinogênio Imunorreativo (IRT) se comporta como a expressão da proteína CFTR, ou seja, se pacientes com mutações de classes menos graves (IV, V e VI) teriam níveis normais de IRT (2). Caso isso seja verdade os estudos de eletrofisiologia seriam marcadores importantes para confirmar a disfunção da proteína CFTR, conforme os resultados demonstrados no Anexo 9 – Tabela 1. (7,9,11)

Portanto pode-se inferir que a DPN diferencia a FC, com duas mutações, de indivíduos saudáveis, porém não se caracteriza como um teste diagnóstico, em nossa amostra analisada, comparado a outros estudos realizados (7,12,15). O único teste possível de certeza seria o sequenciamento gênico. (4,7,15,17).

Seria esperado ainda, comparado a estudos semelhantes (10,11,12,15), que houvesse diferença nos valores de Δ Amilorideo e Δ Sem Cloreto + isoproterenol, entre indivíduos FC e saudáveis, porém em nossa amostra, não foi observado este resultado.

Durante a implementação do protocolo do teste na nossa instituição, pode-se constatar algumas dificuldades técnicas e limitações do teste: manipulações farmacológicas das soluções utilizadas, aquecimento e conservação das mesmas, colaboração do pacientes de menor idade durante o exame, estimulação da narina contralateral para produção de secreção nasal excessiva, o que inviabiliza o teste, capacitação de pessoal treinado, custo financeiro de reagentes, conflito do software específico de DPN com os sistemas operacionais atuais.

Entretanto, este fato não diminui a importância e aplicabilidade do DPN, como ferramenta diagnóstica complementar nos casos de FC atípicos (13), além de ser um teste dinâmico para avaliação da função do canal de Cl⁻, podendo inferir função residual do canal Cl nos pacientes portadores de mutações do CFTR, servindo como método de avaliação objetiva de resposta

terapêutica de potencializadores, corretores e repositores do CFTR, em ensaios clínicos conduzidos atualmente.

CONCLUSÃO

A DPN mostrou valores estatisticamente diferentes entre FC com 2 mutações conhecidas e sujeitos saudáveis. Porém, não conseguiu diferenciar fibrocísticos com mutações graves (classes I, II e III) daqueles com mutações consideradas menos graves (classes IV, V e VI).

REFERÊNCIAS

1. Drumm ML, Ziady AG, Davis PB. **Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis.** *Annu Rev Pathol.* 2012;7:267-82. Review.
2. Wagener JS, Zemanick ET, Sontag MK. **Newborn screening for cystic fibrosis.** *Curr Opin Pediatr.* 2012 Jun;24(3):329-35.
3. Knowles MR, Drumm M. **The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Dec 1;2(12).
4. Ratjen F, Döring G. **Cystic fibrosis.** *Lancet.* 2003 Feb 22;361(9358):681-9.
5. Rosenstein BJ, Cutting GR. **The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement.** *J Pediatr.* 1998 Apr;132(4):589-95. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel.
6. Davies JC. **New tests for cystic fibrosis.** *Journal Paediatr Respir Rev.* 2006;7 Suppl 1:S141-3. Epub 2006 Jun 5.
7. 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; ECFS Diagnostic Network Working Group; EuroCareCF WP3 Group on CF diagnosis. **New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe.** *J Cyst Fibros.* 2011 Jun;10 Suppl 2:S53-66
8. Rowe SM, Clancy JP, Wilschanski M. **Nasal Potential Difference Measurements to Assess CFTR Ion Channel Activity.** *Cystic Fibrosis - Methods in Molecular Biology.* Volume 741, 2011, pp 69-86
9. Sermet-Gaudelus I, Déchaux M, Vallée B, Fajac A, Girodon E, Nguyen-Khoa T. **Chloride transport in nasal ciliated cells of cystic fibrosis heterozygotes.** *Am J Resp Crit Care Med,* 171:1026-1031,2005
10. Lela T, Lebaeq J, Lebeque P, Cumps J, Wallemacq P. **Modified method to measure nasal potential difference.** *Clin Chem Lab Med,* 41(1):61-67,2003.
11. Scheller D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Ballmann M, Déchaux M, Edelman A. **Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements.** *J Cystic Fibrosis,*3:151-155,2004.
12. 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 Oct;132(4):1219-26. Epub 2007 Sep 21.

13. Jaron R, Yaakov Y, Rivlin J, Blau H, Bentur L, Yahav Y, Kerem E, Bibi H, Picard E, Wilschanski M. **Nasal potential difference in non-classic cystic fibrosis-long term follow up.** *Pediatr Pulmonol.* 2008 Jun;43(6):545-9.
14. Vermeulen F, Proesmans M, Feyaerts N, De Boeck K. **Nasal potential measurements on the nasal floor and under the inferior turbinate: does it matter?** *Pediatr Pulmonol.* 2011 Feb;46(2):145-52
15. Solomon GM, Konstan MW, Wilschanski M, Billings J, Sermet-Gaudelus I, Accurso F, Vermeulen F, Levin E, Hathorne H, Reeves G, Sabbatini G, Hill A, Mayer-Hamblett N, Ashlock M, Clancy JP, Rowe SM. **An international randomized multicenter comparison of nasal potential difference techniques.** *Chest.* 2010 Oct;138(4):919-28.
16. Abel T, Maniatis T. Gene regulation. **Action of leucine zippers.** *Nature.* 1989 Sep 7;341(6237):24-5. Review.
17. Zielinski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczk Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC. **Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene.** *Genomics* 1991; **10**:214-28.
18. Costantino L, Claut L, Paracchini V, Coviello DA, Colombo C, Porcaro L, Capasso P, Zanardelli M, Pizzamiglio G, Degiorgio D, Seia M. **A novel donor splice site characterized by CFTR m RNA analysis induces a new pseudo-exon in CF patients.** *J Cyst Fib* 2010; **9**: 411-418.
19. **CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM** – Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Human Mutation*, 4:167-177, 1994
20. Denning CR, Huang NN, Cuasay LR, Shwachman H, Tocci P, Warwick WJ, Gibson LE. **Cooperative study comparing three methods of performing sweat tests to diagnose cystic fibrosis.** *Pediatrics.* 1980 Nov;66(5):752-7
21. Gibson LE, Cooke RE. **A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis.** *Pediatrics* 1959; 23(3): 545-549.
22. Tsui LC, Rommens, J, Kerem BS, et al. **Molecular genetics of cystic fibrosis.** *Pediatr Pulmonol* (suppl 5): 58-9, 1990
23. Schultz SG, Curran PF. **The role of sodium in non-electrolyte transport across animal cell membranes.** *Physiologist.* 1969 Nov;12(4):437-52. Review.

24. Mercier B, Raguénès O, Estivill X, Morral N, Kaplan GC, McClure M, Grebe TA, Kessler D, Pignatti PF, Marigo C, et al. **Complete detection of mutations in cystic fibrosis patients of Native American origin.** Hum Genet. 1994 Dec;94(6):629-32.
25. Raskin S, Phillips JA 3rd, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, et al. **DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards.** Am J Med Genet. 1993 Jul 1;46(6):665-9
26. Procianoy, EFA. **Nasal potencial difference: a new test for cystic fibrosis diagnosis.** Rev HCPA 2011; 31 (2): 125-130

ANEXOS

Relação de Anexos

1. Quadro clínico de fibrose cística
2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduos Saudáveis.
3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes com Fibrose Cística.
4. Protocolo metodológico de manipulação das soluções utilizadas no Teste de Diferença de Potencial Nasal e Cutâneo.
5. Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de Finger (mV).
6. Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de PDmax (mV).
7. Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de Δ amiloride (mV).
8. Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de Δ Chloride-free+isoproterenol.
9. Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de Índice de Wilschanski.
10. Tabela 1. Variáveis do potencial nasal em relação ao grupo de pacientes com fibrose cística da Universidade de Campinas e grupo controle
11. Artigo submetido a Revista Rhinology: *Nasal potential difference for the diagnosis of cystic fibrosis taking into account CFTR mutations* . Ronny Tah Yen Ng, Fernando Augusto de Lima Marson, Antônio Fernando Ribeiro, Carmen Sílvia Bertuzzo, José Dirceu Ribeiro, Eulália Sakano.

Anexo 1.

QUADRO CLÍNICO CONSISTENTE COM FC:

1) Doença pulmonar crônica manifestada por:

- a) Persistente colonização e infecção com patógenos típicos da FC: *Staphylococcus aureus*, *H. influenza* não tipável, *Pseudomonas aeruginosa* (não mucóide e mucóide) e *Burkholderia cepacia*.
- b) Tosse produtiva e crônica
- c) Anormalidades radiológicas persistentes; bronquiectasias, atelectasias, hiperinsuflação, infiltrados
- d) Obstrução das vias aéreas: chiado e áreas de aprisionamento de ar
- e) Baqueteamento digital
- f) Pólipo nasal

2) Anormalidades gastrintestinais e nutricionais:

- a) Intestinal: íleo meconial, síndrome da obstrução intestinal distal, prolapso retal
- b) Pancreático: insuficiência pancreática, pancreatite recorrente
- c) Doença hepatobiliar: evidência clínica ou histológica de cirrose biliar focal ou cirrose biliar multilobular
- d) Nutricional: desnutrição proteico-calórica, hipoproteinemia e edema, deficiência de vitaminas lipossolúveis

3) Anomalias urogenitais em homens

4) Síndrome da perda de sal

5) História familiar de FC (irmão)

Anexo 2.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, PARA INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Projeto:

Avaliação da diferença de potencial nasal em pacientes com fibrose cística com duas mutações identificadas.

Nome:

Gostaríamos que você participasse de um estudo para determinar a função do canal de cloro em mucosa do nariz. Estudos parecidos já foram realizados em adultos e crianças, mostrando resultados satisfatórios.

Este exame está incluído nos critérios diagnósticos para fibrose cística da Fundação de Fibrose Cística dos Estados Unidos (Cystic Fibrosis Foundation), juntamente com o teste de suor, a análise genética e a dosagem de Na e Cl no suor.

O exame para medir a diferença de potencial nasal é realizado colocando-se uma sonda de medição do potencial na cavidade nasal e um eletrodo no antebraço do paciente.

Apesar de a sonda nasal ser muito fina, você poderá sentir um leve desconforto no início do exame.

A medida da diferença de potencial nasal, entre o nariz e o antebraço, é um exame importante para confirmar diagnóstico de Fibrose Cística e verificar a ação de futuros medicamento para a doença.

Você terá direito de recusar e não participar da pesquisa a qualquer momento, mesmo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Será garantido o sigilo sobre os dados do paciente e, em nenhum momento, será citado o nome na pesquisa.

Anexo 3.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto:

Avaliação da diferença de potencial nasal em pacientes com fibrose cística com duas mutações identificadas.

Nome:

HC:

Gostaríamos que você participasse de um estudo para determinar a função do canal de cloro em mucosa do nariz. Estudos parecidos já foram realizados em adultos e crianças, mostrando resultados satisfatórios.

Este exame está incluído nos critérios diagnósticos para fibrose cística da Fundação de Fibrose Cística dos Estados Unidos (Cystic Fibrosis Foundation), juntamente com o teste de suor, a análise genética e a dosagem de Na e Cl no suor.

Não será necessário coletar nenhum exame a mais além dos que fazem parte da rotina de controle dos pacientes com Fibrose Cística da Unicamp.

O exame para medir a diferença de potencial nasal é realizado colocando-se uma sonda de medição do potencial na cavidade nasal e um eletrodo no antebraço do paciente.

Apesar de a sonda nasal ser muito fina, você poderá sentir um leve desconforto no início do exame.

Em pacientes com suspeita de fibrose cística, quanto mais precocemente se estabelece o diagnóstico e conseqüentemente o tratamento, melhor será o prognóstico. Dessa maneira, a diferença de potencial nasal será um exame importante nos casos duvidosos associados a sinais e sintomas sugestivos da doença e com o teste do suor normal ou duvidoso.

Este estudo não vai interferir no seu tratamento e acompanhamento no ambulatório de Fibrose Cística da Unicamp.

Anexo 4. Protocolo de preparação de soluções para Teste de diferença de potencial nasal e cutâneo

Solução A – Ringer Lactato

1. Obtenha 1 litro de Ringer Lactato
2. Adicione 0.42 gm/L K₂HPO₄
3. Adicione 0.05 gm/L KH₂PO₄
4. Adicione 0.24 gm/L MgCl₂•6H₂O
5. Ajuste pH para 7.4 (variação 7.0 - 7.6)
 - calibre o pH para 4.0, 7.0, and 10.0
 - Adicione 1N NaOH to raise pH, 1N HCl to lower pH
6. Em capela: Filtre com filtro de 0.22-micrometros
7. Em capela: distribua em tubos cônicos individuais de 50 ml (n=20).
8. Nomeie cada tubo com a etiqueta Solução A, data de preparação e conserve em refrigerador (estável 3 meses) ou freezer (estável 6 meses)

Solução B (Amiloride)

1. Obtenha 1 litro de Ringer Lactato
2. Adicione 0.42 gm/L K₂HPO₄
3. Adicione 0.05 gm/L KH₂PO₄
4. Adicione 0.24 gm/L MgCl₂•6H₂O
5. Adicione 30 mg/L amiloride HCl
6. Ajuste pH para 7.4 (variação 7.0 - 7.6)

Calibre o pH para 4.0, 7.0, and 10.0

Adicione 1N NaOH para subir o pH, 1N HCl para abaixar o pH

7. Em capela: Filtre com filtro de 0.22-micrometros

8. Em capela: distribua em tubos cônicos individuais de 50 ml (n=20).

9. Nomeie cada tubo com a etiqueta Solução B, data de preparação e conserve em refrigerador (estável 3 meses) ou freezer (estável 6 meses)

Solução C – livre de Cloreto

1. Prepare 1 litro de ddH₂O

2. Adicione 32.2 gm/L Na gluconato

3. Adicione 0.97 gm/L Ca gluconato

4. Adicione 0.95 gm/L K gluconato

5. Adicione 0.42 gm/L K₂HPO₄

6. Adicione 0.05 gm/L KH₂PO₄

7. Adicione 0.30 gm/L MgSO₄•7H₂O

8. Adicione 30 mg/L amiloride HCl

6. Ajuste pH para 7.4 (variação 7.0 - 7.6)

Calibre o pH para 4.0, 7.0, and 10.0

Adicione 1N NaOH para subir o pH, 1N HCl para abaixar o pH

7. Em capela: Filtre com filtro de 0.22-micrometros

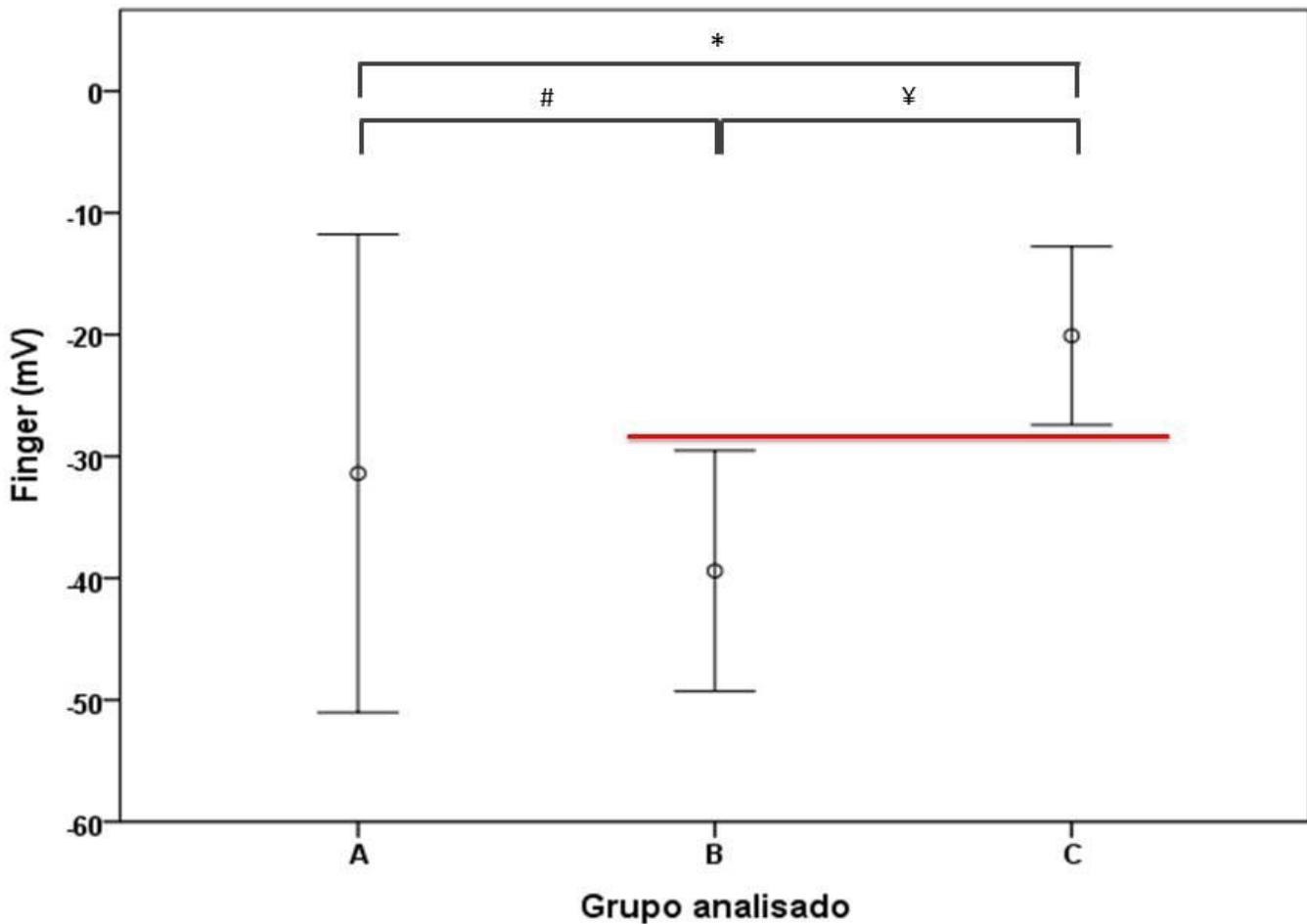
8. Em capela: distribua em tubos cônicos individuais de 50 ml (n=20).

9. Nomeie cada tubo com a etiqueta Solução C, data de preparação e conserve em refrigerador (estável 3 meses) ou freezer (estável 6 meses)

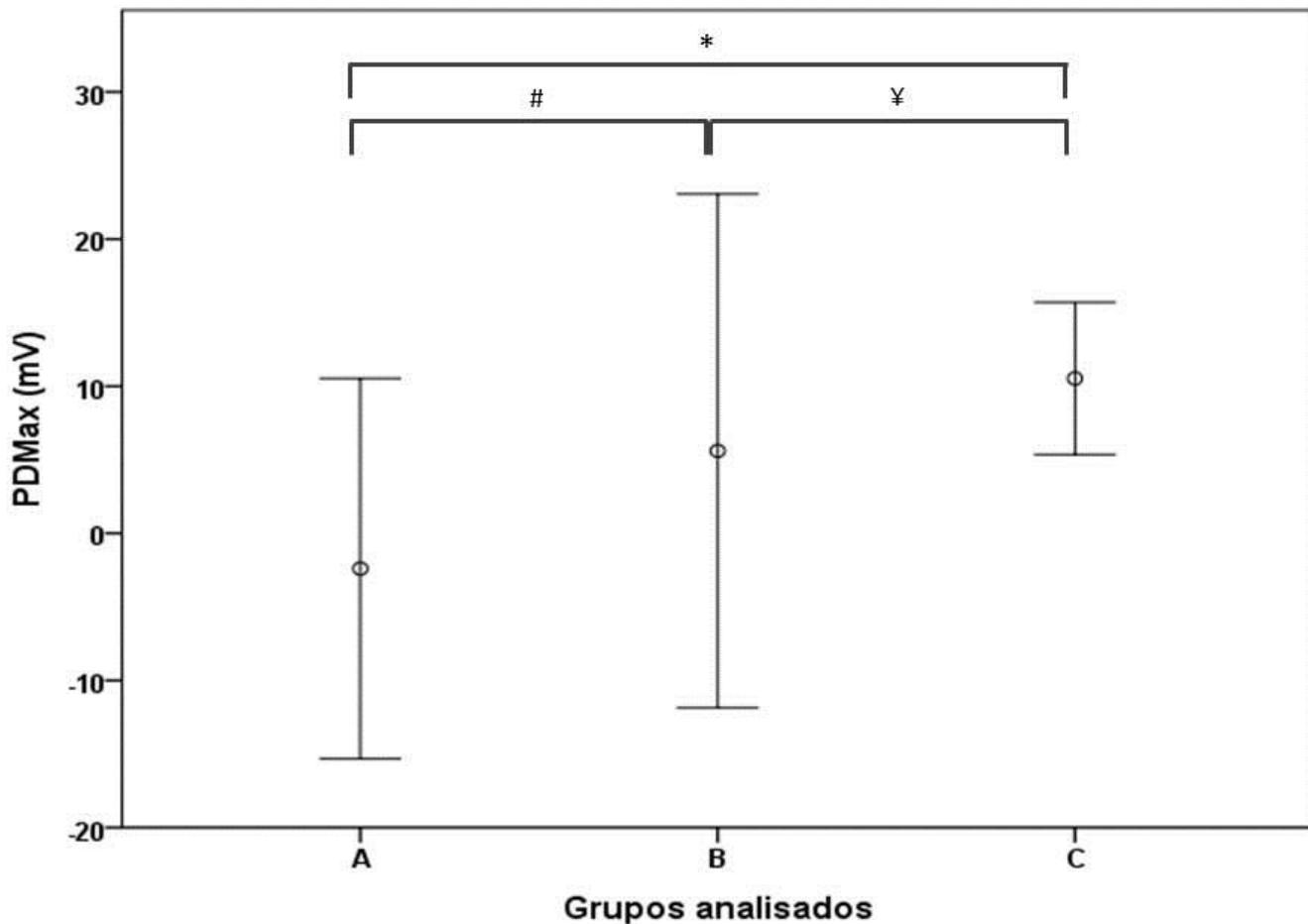
Solução D – Isoproterenol

1. Prepare 1 litro de ddH₂O
2. Adicione 32.2 gm/L Na gluconato
3. Adicione 0.97 gm/L Ca gluconato
4. Adicione 0.95 gm/L K gluconato
5. Adicione 0.42 gm/L K₂HPO₄
6. Adicione 0.05 gm/L KH₂PO₄
7. Adicione 0.30 gm/L MgSO₄•7H₂O
8. Adicione 30 mg/L Isoproterenol HCl
6. Ajuste pH para 7.4 (variação 7.0 - 7.6)
 - Calibre o pH para 4.0, 7.0, and 10.0
 - Adicione 1N NaOH para subir o pH, 1N HCl para abaixar o pH
7. Em capela: Filtre com filtro de 0.22-micrometros
8. Em capela: distribua em tubos cônicos individuais de 50 ml (n=20).
9. Nomeie cada tubo com a etiqueta Solução D, data de preparação e conserve em refrigerador (estável 3 meses) ou freezer (estável 6 meses)

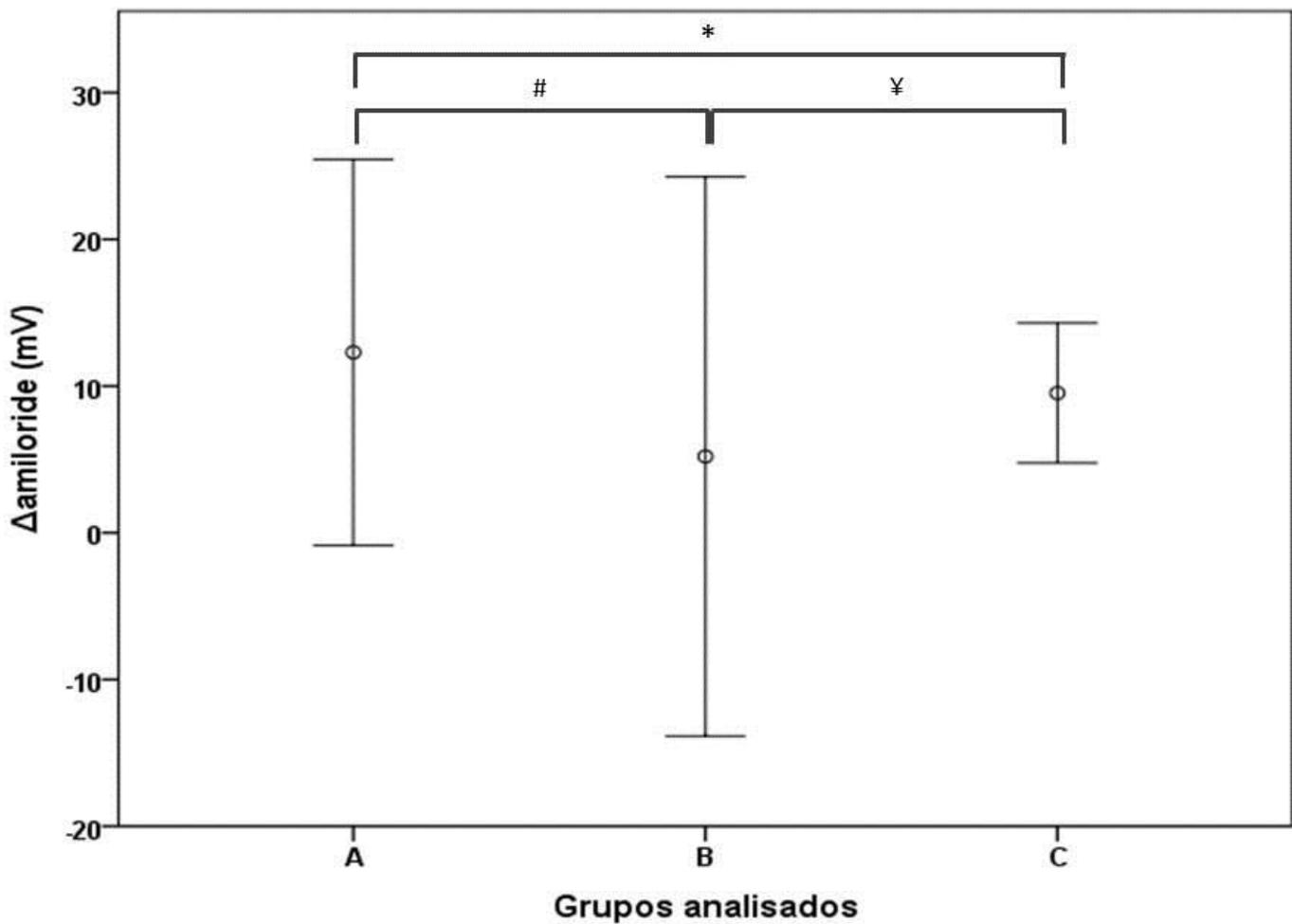
Anexo 5. Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de Finger (mV). (A) grupo de pacientes com fibrose cística com duas mutações identificadas no gene *CFTR* pertencentes à classe I, II e III. (B) grupo de pacientes com pelo menos uma mutação no gene *CFTR* identificada pertencente à classe IV, V e VI. (C) grupo de indivíduos controles. * $p= 1$; # $p= 0,021$; ¥ $p= 0,003$. A comparação entre os grupos A e B, B e C, e A e C foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, considerando $\alpha= 0,05$. mV = milivolts,



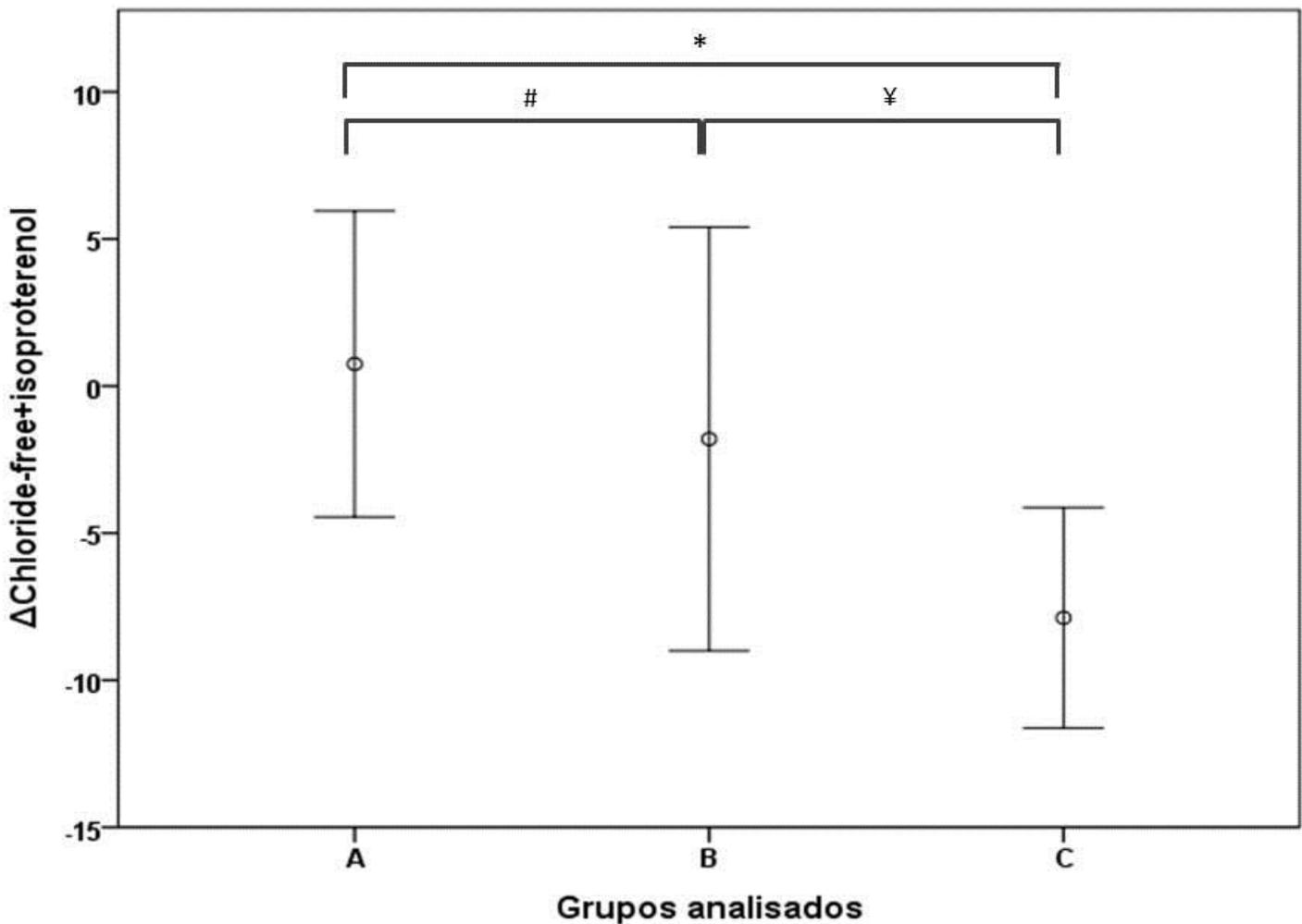
Anexo 6. Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de PDmax (mV). (A) grupo de pacientes com fibrose cística com duas mutações identificadas no gene *CFTR* pertencentes à classe I, II e III. (B) grupo de pacientes com pelo menos uma mutação no gene *CFTR* identificada pertencente à classe IV, V e VI. (C) grupo de indivíduos controles. * $p= 0,426$; # $p= 0,040$; ¥ $p= 0,416$. A comparação entre os grupos A e B, B e C, e A e C foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, considerando $\alpha= 0,05$. mV = milivolts,



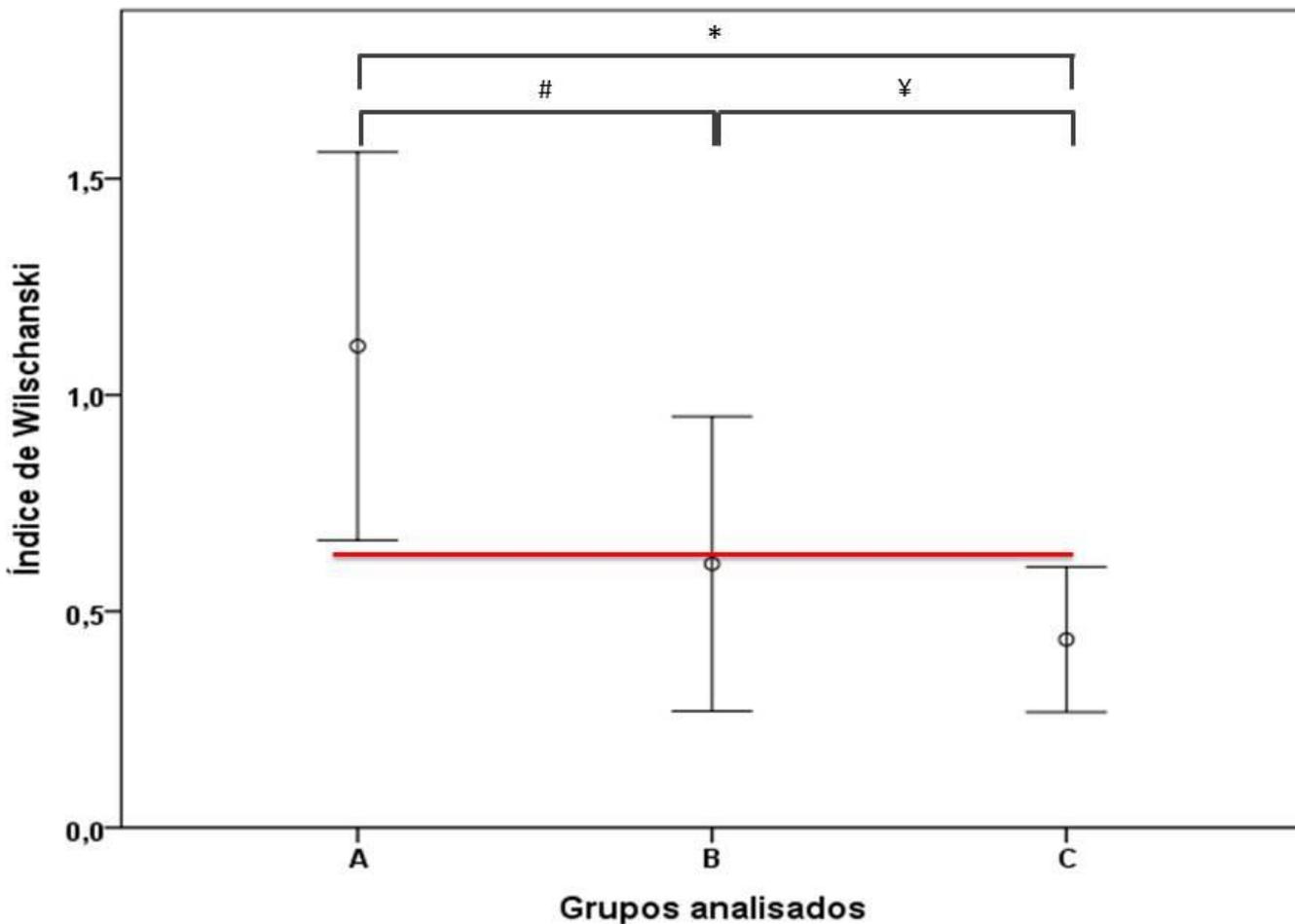
Anexo 7. Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de Δ amiloride (mV). (A) grupo de pacientes com fibrose cística com duas mutações identificadas no gene *CFTR* pertencentes à classe I, II e III. (B) grupo de pacientes com pelo menos uma mutação no gene *CFTR* identificada pertencente à classe IV, V e VI. (C) grupo de indivíduos controles. * p= 0,394; # p= 0,554; ¥ p= 0,474. A comparação entre os grupos A e B, B e C, e A e C foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, considerando $\alpha=0,05$. mV = milivolts.



Anexo 8. Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de $\Delta\text{Chloride-free+isoproterenol}$. (A) grupo de pacientes com fibrose cística com duas mutações identificadas no gene *CFTR* pertencentes à classe I, II e III. (B) grupo de pacientes com pelo menos uma mutação no gene *CFTR* identificada pertencente à classe IV, V e VI. (C) grupo de indivíduos controles. * $p= 0,390$; # $p= 0,007$; ¥ $p= 0,125$. A comparação entre os grupos A e B, B e C, e A e C foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, considerando $\alpha= 0,05$. mV = milivolts.



Anexo 9. Grupos de pacientes com fibrose cística e controles saudáveis em comparação para o valor de Índice de Wilschanski. (A) grupo de pacientes com fibrose cística com duas mutações identificadas no gene *CFTR* pertencentes à classe I, II e III. (B) grupo de pacientes com pelo menos uma mutação no gene *CFTR* identificada pertencente à classe IV, V e VI. (C) grupo de indivíduos controles. * $p= 0,050$; # $p= 0,002$; ¥ $p= 0,345$. A comparação entre os grupos A e B, B e C, e A e C foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, considerando $\alpha= 0,05$. mV = milivolts.



Anexo 10 . Tabela 1 - Variáveis do potencial nasal em relação ao grupo de pacientes com fibrose cística da Universidade de Campinas e grupo controle

Tabela 1. Associação das variáveis do potencial nasal em relação ao grupo de pacientes com fibrose cística da Universidade de Campinas e grupo controle.

Medidas do potencial nasal	Grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Intervalo de confiança		Mínimo	Máximo	p-value
						5%	95%			
Finger (mV)	A	10	-31,40	27,452	8,681	-51,04	-11,76	-57	37	0.004
	B	5	-39,40	7,956	3,558	-49,28	-29,52	-52	-31	
	C	21	-20,10	16,078	3,508	-27,41	-12,78	-41	36	
	Total	36	-25,92	20,090	3,348	-32,71	-19,12	-57	37	
PDmax (mV)	A	10	-2,40	18,075	5,716	-15,33	10,53	-42	21	0.111
	B	5	5,60	14,064	6,290	-11,86	23,06	-12	23	
	C	21	10,52	11,378	2,483	5,34	15,70	-14	28	
	Total	36	6,25	14,594	2,432	1,31	11,19	-42	28	
Δamiloride (mV)	A	10	12,30	18,379	5,812	-0,85	25,45	-20	42	0.611
	B	5	5,20	15,353	6,866	-13,86	24,26	-10	27	
	C	21	9,52	10,482	2,287	4,75	14,29	-5	45	
	Total	36	9,69	13,469	2,245	5,14	14,25	-20	45	
ΔChloride-free+isoproterenol	A	10	0,750	7,270	2,299	-4,450	5,950	-12,0	12,5	0.016
	B	5	-1,800	5,805	2,596	-9,008	5,408	-7,0	7,0	
	C	21	-7,881	8,235	1,7971	-11,630	-4,132	-26,5	6,0	
	Total	36	-4,639	8,482	1,4137	-7,509	-1,769	-26,5	12,5	
Índice de Wilschanski	A	10	1,112	0,627	0,198	0,664	1,561	0,535	2,718	0.005
	B	5	0,610	0,274	0,123	0,269	0,950	0,223	0,883	
	C	21	0,435	0,362	0,081	0,267	0,603	0	1,051	
	Total	36	0,648	0,526	0,088	0,469	0,826	0	2,718	

N= número de pacientes; FC = fibrose cística; mV = milivolts; Δ = delta (variação); PDmax = diferença de potencia basal máximo; IC = intervalo de confiança; % = porcentagem; índice de Wilschanski = eΔChloride free + isoproterenol/Δamiloride.

O cálculo foi realizado pelo teste de Kruskal-Wallis.

Os dados que apresentaram valor positivo com p-value menor que 0,05 está em negrito.

Anexo 11. Artigo submetido a Revista Rhinology Journal

Nasal potential difference for the diagnosis of cystic fibrosis taking into account *CFTR* mutations

Ronny Tah Yen Ng¹, Fernando Augusto de Lima Marson^{2,3}, Antônio Fernando Ribeiro², Carmen Sílvia Bertuzzo³, José Dirceu Ribeiro², Eulália Sakano^{1,#}

¹Department of Otolaryngology, State University of Campinas – Unicamp, Brazil.

²Department of Pediatrics, University of Campinas - Unicamp, Center for Pediatrics Research - CIPED, Brazil.

³Department of Medical Genetics, University of Campinas – Unicamp - Brazil.

Author to request reprint: phone - ++ 55 19 3521 8983, fax – ++ 55 19 3521 8907, e-mail - eulalia.s@terra.com.br. Tessália Vieira de Camargo, 126. Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Campinas - SP - Brasil- CEP: 13083-887. Department of Otolaryngology. University of Campinas - Unicamp.

Running title: Nasal potential and CF

Key words: *CFTR* gene, mutation, diagnosis, nasal potential difference, cystic fibrosis.

Summary

The cystic fibrosis (CF) diagnosis is associated with chloride and sodium values above 60 mEq/L. The ions concentration is not altered in some patients, therefore, the *CFTR* gene sequencing is the principal tool for the CF diagnosis. Considering the time-expending and high costs for the sequencing, other tests are being studied. The nasal potential difference (NPD) is one tool. In our data, the comparison among CF patients with two *CFTR* mutations class I, II or III and with two *CFTR* mutations class IV, V or VI was realized in association with healthy subjects. No difference was observed among patients and healthy controls for the PDMax, Δ Amiloride and Δ Chloride+Free+Amiloride variables, measured in NPD test. For the Finger value, difference between patients with *CFTR* mutations class IV, V or VII and healthy subjects was found. Wilchanski index values were different between patients with *CFTR* mutations class I, II or III and healthy subjects. In this case, our data showed that NPD is useful for CF diagnosis when *CFTR* mutations class I, II or III is presented, but if the class IV, V or VI are considered, this test shows similar results of sweat test with overlap values with health subjects.

Key words: *CFTR* gene, mutation, diagnosis, nasal potential difference, cystic fibrosis.

Introduction

The cystic fibrosis disease (CF) is an autosomal disorder with high clinical variability associated with *CFTR* mutations, environmental and modifier genes¹⁻⁹. After 1989¹⁰⁻¹², with the discovered of the *CFTR* gene and medical advances about the disease was observed that the CF is a complex disease in clinical presentation¹⁻³. Since 1959, the CF diagnosis is principally associated with the Gibson and Cooke test - sweat test¹³. The sweat test is an important tool that can provide CF diagnosis in the major part of the patients, with a low cost, but in some cases, is not the better tool for the CF diagnosis, especially when we consider the *CFTR* mutation class¹⁴⁻¹⁶. Patients with mutations class IV, V and VI, can have normal values for the Chloride and Sodium in the sweat¹⁷.

When the sequencing of the *CFTR* gene was realized, the CF disease can be diagnosed in all patients, but it's expensive and time-consuming. The sequencing is used in some part of the world, but it is difficult to provide this tool to all patients. Therefore, other tools are in test to CF diagnosis, like: (i) concentration of Chloride and Sodium in the saliva¹⁸, (ii) β -Adrenergic sweat secretion¹⁹, (iii) measurements of *CFTR*-mediated Cl⁻ secretion in human rectal biopsies¹⁷, (iv) neonatal screening by Immunoreactive trypsin (IRT)²⁰ and (v) new sequencing generation. In developing countries, the CF diagnosis can be realized by the Chloride and Sodium and usually by the F508del mutation screening²¹.

The nasal potential difference (NPD) measurement is also a new diagnostic method that is more sensitive and specific, under investigation to provide, in vivo, evidences of abnormal ion transport due to dysfunction of the CFTR protein in nasal epithelial cells. The NPD is used to measure the voltage across the nasal epithelium, which results from transepithelial ion transport and reflects in part CFTR function²². The electrophysiologic abnormality in CF was first described nearly 50 years ago and correlates with features of the CF phenotype. NPD measurement is an important research tool used to assess the efficacy of new treatments such as gene therapy²³ and ion transport modulators.

Considering the CF diagnostic in a population admixed, our study compared three groups of subjects (patients with two *CFTR* mutations class I, II and III - group A; patients with at least one *CFTR* mutation class IV, V and VI - group B; healthy subjects - group C) in association with the NPD. Our objective was analyze the NPD as a diagnostic tool taking into account *CFTR* gene mutations screening and control subjects without CF or familial history for CF.

Materials and methods

Patients and control subjects

In our data were included 21 healthy subjects without CF disease, other diseases and familial history for CF disease (group C).

In the CF patients group were included 21 patients initially, considering the CF clinical characteristics plus Sodium and Chloride values above 60 mEq/L in sweat test. The F508del screening and *CFTR* sequencing was realized in 15 of 21 CF patients. In this case, the final study population was 15 CF patients and 6 (28.57%) were excluded (Group A= 10 patients and group

B= 5 patients). The sequencing method, in our study, was considered the gold standard to CF diagnostic.

The project was approved by the University Ethics Committee (#279/2007), all patients and/or their guardians signed an informed consent before the inclusion in the study.

Molecular analysis

A peripheral blood sample was collected from each patient. Genomic DNA was obtained by direct extraction from lymphocytes of peripheral blood according to standard procedures²⁴.

The *CFTR* mutations were determined in the following order: F508del identification using primers forward 5' - GGC ACC ATT AAA GAA AAT ATC - 3' and reverse 5' - TGG CAT GCT TTG ATG ACG C- 3'; *CFTR* exons sequencing, including exon/intron boundaries, was performed as previously described²⁵; duplications, deletions and LOH identification using SALSA MLPA[®] Kit P091-C1 *CFTR*-MRC-Holland was performed as the manufacturer instructions; and 1584-18672pb A>G (intron 10) identification was performed as previously described²⁶.

Nasal potential difference measurements

For DPN measures was used high-impedance voltmeter with storage capacity for 100 data (Knick Portamess 913[®], E) and AgCl electrodes with low impedance (minor than 10³ ohms). The voltmeter was set to record readings every 10 seconds and the measurements were transferred to a computer and stored in Paraly SW105 software (ProMinent Dosiertechnik GmbH, Germany).

The electrode 1 (reference) was positioned and fixed on the anterior left forearm in the scarified skin by diamond tip drill for odontology use. The electrode 2 (measurement) was positioned within of the larger channel of a silicone probe filled with cream conductor (Sigma Electrode Cream, Parker Laboratories[®]).

There was conducted the finger measure with the electrode 2 between the thumb and index finger, soaked in the conducted cream, and then positioned the probe tip to 3.0cm, 2.0cm, 1.5cm, 1.0cm and 0.5cm below and posterior to the inferior turbinate right with aid of rigid nasal endoscope. The DPN measures, in all positions, were achieves when it stabilizes for more than five seconds. The PDmax was considered as the most negative measure. The probe was leased at position of 1.5cm.

For the probe, four solutions are infused, with flow of 5 mL/min, controlled by an infusion pump, previously heated to the final temperature, inside the nasal cavity, of 37°C, by three minutes for each solution, sequentially, without pausing among them. The solutions were: solution A (1 liter of ddH₂O, 0.42mg/L K₂HPO₄, 0.05mg/L KH₂PO₄, 0.24mg/L MgCl₂.6H₂O); solution B (solution A + 30mg/L amiloride HCl); solution C (1 liter of ddH₂O, 32.2mg/L sodium gluconate, 0.97mg/L calcium gluconate, 0.95mg/L potassium gluconate, 1 liter of ddH₂O, 0.42mg/L K₂HPO₄, 0.05mg/L KH₂PO₄, 0.24mg/L MgCl₂.6H₂O, 30mg/L amiloride HCl), solution D (solution C with change of 30mg/L amiloride HCl for 30mg/L isoproterenol).

The voltmeter was programmed to perform a DPN measurement every 10 seconds for a total of 18 measurements for each solution. These values after each exam were immediately transferred to a desktop computer and stored.

The DPN test was performed in the right nasal cavity for all subjects included in the study. The same doctor was responsible to all tests performed.

In NPD tests were analyzed the variables: Finger, PDMax, Δ Amiloride Δ Chloride+Free+Amiloride and Wilchanski index. In this context, the NPD changes were recorded after perfusion with the following solutions: 100 μ M amiloride in saline solution (Δ amiloride), chloride-free solution with 100 μ M amiloride (Δ chloride-free), and 100 μ M amiloride plus 10 μ M isoproterenol in chloride-free solution (Δ isoproterenol). The sum of Δ chloride-free and Δ isoproterenol (Δ chloride-free–isoproterenol) served as an index of transepithelial CFTR-dependent chloride transport because it reflects the cAMP activation of nasal mucosa chloride permeability. The Wilchanski index was calculated by the formula $e^{\Delta\text{chloride}/\Delta\text{amiloride}^{27}}$.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software v.21.0 (version 21, SPSS Inc., Chicago, IL).

The sample power was performed with GPower 3.0.1 software²⁸. Considering the Kruskal-Wallis test as parameter for population power estimation, for the sample size of 36 subjects, with α error equal to 0.05 and effect size of 0.5, the statistical power of all tests realized is 0.812, being above of 0.80.

The data were compared using Mann-Whitey (comparison between groups A versus B, A versus C, and B versus C) and Kruskal-Wallis tests (comparison among groups A, B and C) for the NPD variables. To avoid spurious data because of multiple problematic tests²⁹, the significance level α was adjusted using the Bonferroni correction test (α corrected= 0.05/number of tests).

Results

Patient's characterization and *CFTR* mutation

In our study were included 15 patients [7 (46.67%) males] with CF and 21 healthy controls [7 (33.33%) males].

The CF patients were divided into two groups according to the identified mutation in the *CFTR* gene. Patients with two *CFTR* mutations class I, II and III were designated as group A (10 CF patients), and those with at least one *CFTR* mutation class IV, V and VI as group B (5 CF patients). The healthy subjects were classified as group C.

In group A, the follow *CFTR* genotypes were observed: F508del/F508del [8 (80%) patients - Class II], F508del/1717-1G> A [1 (10%) patient - mutation Class II/Class I], F508del/G542X [1 (10%) patient - mutation Class II/Class I] (Figure 1-A).

In group B, the follow *CFTR* genotypes were observed: F508del/1812-1G> A (1 patient - Class II mutation/Uncertain class), F508del/3272-26A> G (1 patient - mutation Class II/Class V) F508del/D1152H (1 patient - mutation Class II/IV), F508del/P205S (1 patient - mutation Class II/IV), V562I/IVS8-5T (1 patient - Uncertain/Class V). Each genotype corresponds to a value of 20% of patients with *CFTR* mutation class IV, V and VI (Figure 1-A).

Nasal potential difference

The data obtained by NPD test is shown in the Table 1 and Figure 1.

In table 1 is given the values of mean, standard deviation, maximum value, minimum value and confidence interval of probability to compare the CF patients groups and healthy subjects for the DPN variables: Finger ($p= 0.020$), PDMax ($p= 0.111$) Δ amiloride ($p = 1$), Δ chloride-free-isoproterenol ($p = 0.08$) and Wilschanski index ($p= 0.025$).

The complete data is shown in the figure 1-D. For the Finger values there was statistical difference between group A versus B ($p= 0.021$) and group B versus C ($p= 0.003$). For the PDMax there was statistical difference in group A versus B ($p= 0.04$). For Δ amiloride no

difference was observed. For Δ chloride-free-isoproterenol there was statistical difference between A versus B ($p= 0.007$). For Wilschanski index there was statistical difference between A versus C ($p= 0.050$) and A versus B ($p= 0.002$)

Discussion

The diagnosis and management of CF in Brazil shows variability among CF reference centers. Many problems are still observed as: (i) high proportion of undiagnosed cases, (ii) delayed diagnosis in many States, (iii) few CF centers in relation to actual demand, (iv) small number of health professionals involved, (iv) disease underestimated by health authorities (low investment and reduced current expenditure), (v) lack of IRT in most states, (vi) scientific production limited³⁰.

In the best of our knowledge this is the first study conducted in Brazil to verify DPN in CF patients diagnosed by determination of two *CFTR* mutations in comparison with healthy subjects. Our study showed that the DPN measures can differentiate CF patients with two severe mutation from healthy, however was not able to identify differences between patients with Class I, II and III (greater severity) of those with Class IV, V or VI (minor severity) *CFTR* mutations.

Studies have shown that the electronegativity of organs and systems in CF are compromised depending of the *CFTR* mutation class. This causes the sweat chloride values variation between different CF mutations class¹⁷. With the introduction of IRT in our state, from 2010, children with severe mutations will probably be early diagnosis and followed in CF reference centers.

Considering the difficulty of characterize the CF patients groups with class IV, V or VI mutation, taking into account the possibility of normal IRT values and sweat test, in association with a residual expression of the *CFTR* protein, new diagnostic tools should be provide, and a potential tool is the NPD. Considering this hypothesis, the electrophysiology studies would be important markers to confirm the *CFTR* protein dysfunction.

Currently, it is known that changes in the CFTR protein are showed in various methods^{10-13,17-19}, including NPD^{22,23,31}. In our data, the Wilschanski index is statistically different between group A and C, in this case, can be useful to CF diagnosis in patients with two class I, II and III mutations. Therefore it cannot be inferred that the NPD is diagnostic test for CF, taking into account that patients with class IV, V and VI (Group B) are not differentiated by this technique in comparison with the other groups (Groups A and C). The only possible test for certain CF diagnosis in all cases would be the gene sequencing.

Considering the future prospects, other methods to show the CFTR function have been proposed in the literature as beta adrenergic function studies of the sweat glands¹⁹. Studies in this line of research are realized to possibility the CF diagnosis when sweat chloride values are normal, and it is not possible to determine the *CFTR* mutation by sequencing.

In conclusion, the DPN showed statistically different values between CF patients with two known mutations and healthy subjects. However, it did not differentiate those with more severe mutations from less severe mutations.

Acknowledgments: Our group thanks to technical support of LAFIP (Laboratório de Fisiologia Pulmonar) for the realization of the NPD test and medical genetics laboratory (<http://laboratoriomultiusuario.com.br/>) to identify *CFTR* mutations. The authors thank to Terezinha Leal, Luciana Cardoso Bonadia and Carlos Emilio Levy for the collaboration and the Pharmacology Department from Unicamp.

References

1. Drumm ML, Ziady AG, Davis PB. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2012; 7: 267-282.
2. Knowles MR, Drumm M. The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(12): a009548.
3. Dorfman R. Modifier gene studies to identify new therapeutic targets in cystic fibrosis. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(5): 674-682.
4. Marson FA, Bertuzzo CS, Hortencio TD, Ribeiro JD, Bonadia LC, Ribeiro AF. The *ACE* gene D/I polymorphism as a modulator of severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med* 2012; 12: 41.
5. Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Polymorphisms in *ADRB2* gene can modulate the response to bronchodilators and the severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2012; 12(1): 50.
6. Lima CS, Ortega MM, Marson FA, Zulli R, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and glutathione S-transferase null genotypes in cystic fibrosis patients in Brazil. *J Bras Pneumol.* 2012; 38(1): 50-56.
7. Marson FAL, Rezende LM, Furgeri DT, Ribeiro AF, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. *ADRA2A* is a Cystic Fibrosis Modifier Gene. *International Journal of Genetics* 2013; 5(1)1: 125-131.
8. Marson FAL, Marcelino ARB, Ribeiro AF, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. 2013. *COX-2* Gene Polymorphisms: Genetic Determinants of Cystic Fibrosis Comorbidities. *International Journal of Genetics* 2013; 5(1): 132-138.
9. Marson FA, Bertuzzo CS, Secolin R, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Genetic interaction of GSH metabolic pathway genes in cystic fibrosis. *BMC Med Genet.* 2013; 14:60.

10. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080.
11. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073.
12. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-1065.
13. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23(3): 545-549.
14. Cotton SW, Bender LM, Willis MS. Multiple Positive Sweat Chloride Tests in an Infant Asymptomatic for Cystic Fibrosis. *Lab Medicine* 2012; 43:1-5.
15. Go LHT, Jain M. Diagnosis of Cystic Fibrosis in Adults. *Clinical Pulmonary Medicine* 2012; 19(4): 159-164.
16. Simmonds NJ, Bush A. Diagnosing cystic fibrosis: what are we sweating about? *Thorax*. 2012; 67(7): 571-573.
17. Sousa M, Servidoni MF, Vinagre AM, Ramalho AS, Bonadia LC, Felício V, et al. Measurements of CFTR-mediated Cl⁻ secretion in human rectal biopsies constitute a robust biomarker for Cystic Fibrosis diagnosis and prognosis. *PLoS One*. 2012; 7(10):e47708.

18. Gonçalves AC, Marson FA, Mendonça RM, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Paschoal IA, Levy CE. Saliva as a potential tool for cystic fibrosis diagnosis. *Diagn Pathol*. 2013; 8:46.
19. Quinton P, Molyneux L, Ip W, Dupuis A, Avolio J, Tullis E, Conrad D, et al. β -adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 186(8): 732-739.
20. Wagener JS, Zemanick ET, Sontag MK. Newborn screening for cystic fibrosis. *Curr Opin Pediatr*. 2012; 24(3): 329-335.
21. Bieger AM, Marson FA, Bertuzzo CS. Prevalence of $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene among cystic fibrosis patients from a Brazilian referral center. *J Pediatr (Rio J)*. 2012; 88(6): 531-534.
22. Knowles MR, Carson JL, Collier AM, Gatzky JT, Boucher RC. Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. *Am Rev Respir Dis*. 1981; 124(4): 484-490.
23. Chinet TC. Use of in vivo nasal transepithelial potential difference to evaluate efficacy in CF gene therapy phase I trials. *Eur Respir J*. 1994; 7(11): 1917-1920.
24. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
25. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. *Genomics* 1991; 10: 214-228.
26. Costantino L, Claut L, Paracchini V, Coviello DA, Colombo C, Porcaro L, et al. A novel donor splice site characterized by *CFTR* mRNA analysis induces a new pseudo-exon in CF patients. *J Cyst Fib* 2010; 9: 411-418.

27. Wilschanski M, Famini H, Strauss-Liviatan N, Rivlin J, Blau H, Bibi H, et al. Nasal potential difference in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2001; 17: 1208-1215.
28. Faul F, Erdfelde E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 2007; 39: 175-191.
29. Drăghici S. Data analysis tools for DNA microarrays. Chapman & Hall/CRC: New York, 2003.
30. Camargos PA. Cystic fibrosis in Brazil: the pediatrician's turn. *J Pediatr (Rio J).* 2004; 80(5): 344-346.
31. Rowe SM, Clancy JP, Wilschanski M. Nasal potential difference measurements to assess CFTR ion channel activity. *Methods Mol Biol.* 2011; 741: 69-86.

Corresponding author: phone - ++ 55 19 3521 8983, fax – ++ 55 19 3521 8907, e-mail - eulalia.s@terra.com.br. Tessália Vieira de Camargo, 126. Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Campinas - SP - Brasil- CEP: 13083-887. Department of Otolaryngology. University of Campinas – Unicamp.

Table 1. Association of nasal potential difference between cystic fibrosis patients and health subjects.

NPD variables	Groups	N	Mean	Standard deviation	Standard error	Confidential interval		Minimum	Maximum	p-value	p ^{corrected}
						5%	95%				
Finger (mV)	A	10	-31.40	27.452	8.681	-51.04	-11.76	-57	37	0.004	0.020
	B	5	-39.40	7.956	3.558	-49.28	-29.52	-52	-31		
	C	21	-20.10	16.078	3.508	-27.41	-12.78	-41	36		
	Total	36	-25.92	20.090	3.348	-32.71	-19.12	-57	37		
ΔDmax (mV)	A	10	-2.40	18.075	5.716	-15.33	10.53	-42	21	0.111	0.555
	B	5	5.60	14.064	6.290	-11.86	23.06	-12	23		
	C	21	10.52	11.378	2.483	5.34	15.70	-14	28		
	Total	36	6.25	14.594	2.432	1.31	11.19	-42	28		
Δamiloride (mV)	A	10	12.30	18.379	5.812	-0.85	25.45	-20	42	0.611	1
	B	5	5.20	15.353	6.866	-13.86	24.26	-10	27		
	C	21	9.52	10.482	2.287	4.75	14.29	-5	45		
	Total	36	9.69	13.469	2.245	5.14	14.25	-20	45		
ΔChloride-free+isoproterenol	A	10	0.750	7.270	2.299	-4.450	5.950	-12.0	12.5	0.016	0.08
	B	5	-1.800	5.805	2.596	-9.008	5.408	-7.0	7.0		
	C	21	-7.881	8.235	1.7971	-11.630	-4.132	-26.5	6.0		
	Total	36	-4.639	8.482	1.4137	-7.509	-1.769	-26.5	12.5		
Wilschanski index	A	10	1.112	0.627	0.198	0.664	1.561	0.535	2.718	0.005	0.025
	B	5	0.610	0.274	0.123	0.269	0.950	0.223	0.883		
	C	21	0.435	0.362	0.081	0.267	0.603	0	1.051		
	Total	36	0.648	0.526	0.088	0.469	0.826	0	2.718		

Table 1. Legend

N= number of patients; CF= cystic fibrosis; mV= milivolts; PDmax= maximum DPN;

Wilschanski index= $e^{\Delta\text{chloride}/\Delta\text{amiloride}}$.

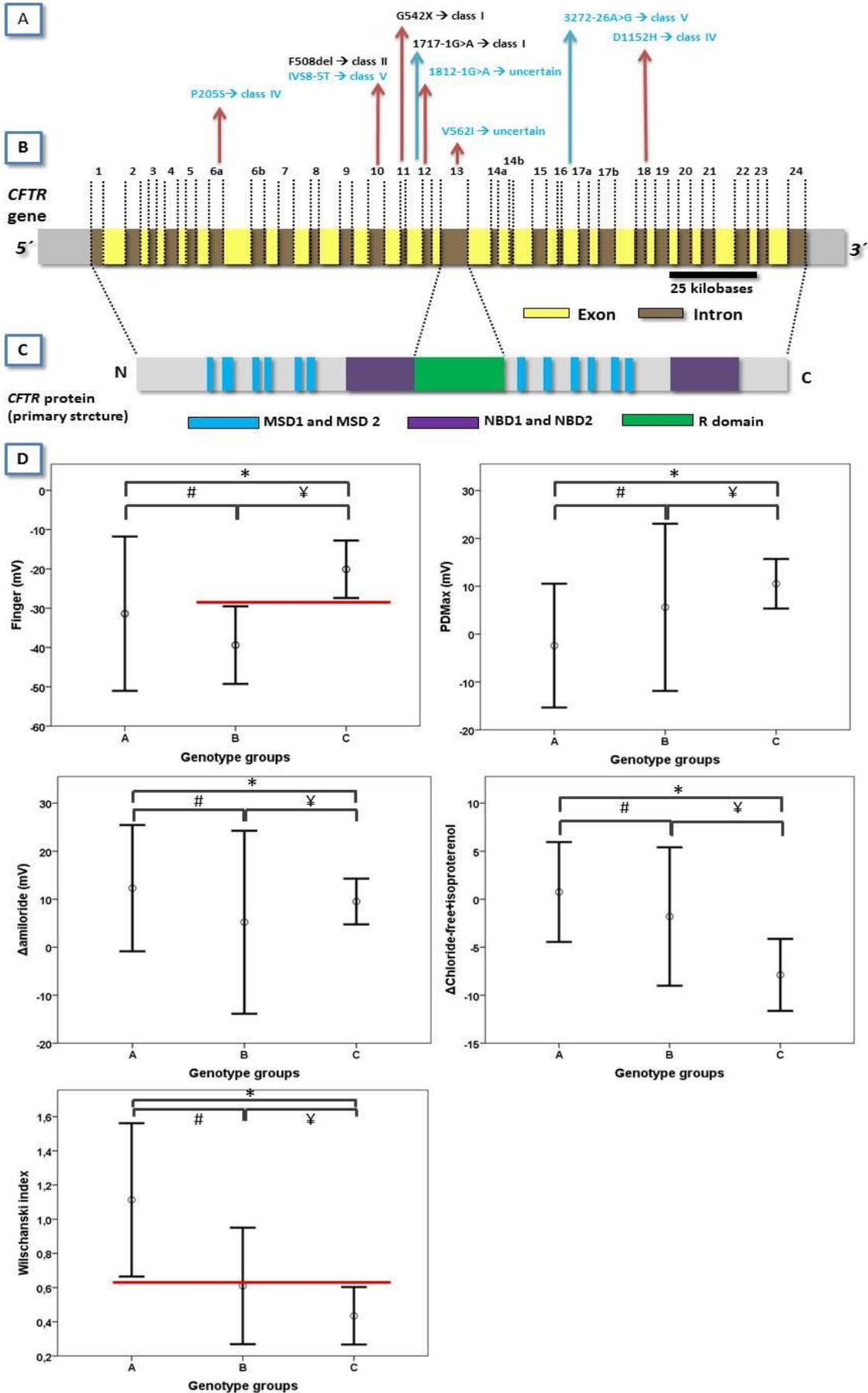
The statistical test was performed by Kruskal-Wallis.

The positive p-value is in bold.

The p-value was corrected by Bonferroni test. Five analyzes were performed on the same sample group.

Figure 1

A. *CFTR* mutation distributed by exon/intron localization and class. B. *CFTR* gene with exons and intron description. C. *CFTR* protein domains. D. To all data, consider: (A) Cystic fibrosis patients with two *CFTR* mutation class I, II and III; (B) Cystic fibrosis patients with two *CFTR* mutation class IV, V and VI; (C) health subjects. The comparison was realized by Mann-Whitney test considering the associations: A versus B, A versus C, and B versus C. α considered was 0.05. For the Finger (mV) - * $p= 1$; # **$p= 0.021$** ; ¥ **$p= 0.003$** . For the PDmax (mV) - $p= 0.426$; # **$p= 0.040$** ; ¥ $p= 0.416$. For the Δ amiloride (mV) - * $p= 0.394$; # $p= 0.554$; ¥ $p= 0.474$. For the Δ Chloride-free+isoproterenol - * $p= 0.390$; # **$p= 0.007$** ; ¥ $p= 0.125$. For the Wilschanski index * **$p= 0.050$** ; # **$p= 0.002$** ; ¥ $p= 0.345$. The maximum difference was observed by Finger (B versus C) and for Wilschanski index (A versus C). *CFTR*= Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator, MSD= membrane-spanning domains, NBD= nucleotide-binding domains, R= regulator, mV= millivolts.



APÊNDICES

Apêndice 1. Comprovante de apresentação trabalho congresso Rhinology 2013



VI RHINOLOGY

April 18-20, 2013

São Paulo - Brazil

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

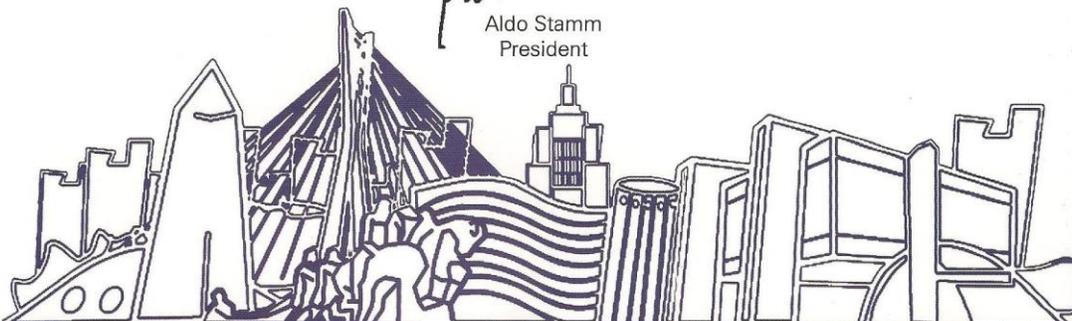
The Executive Committee
hereby certifies that

Ng, R. T. Y.; Sakano, E.; Ribeiro, J. D.; Ribeiro, A. F.;

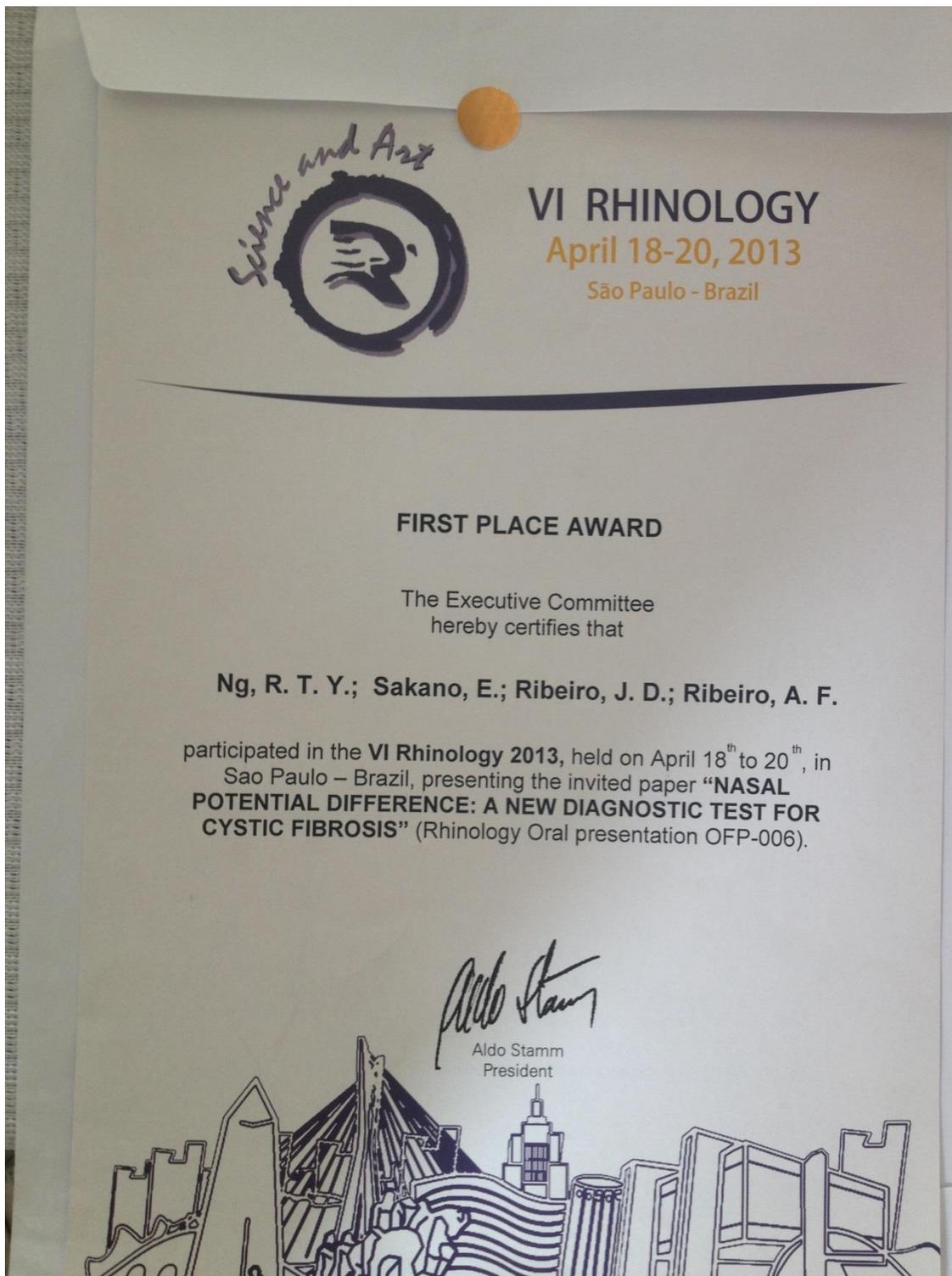
participated in the **VI Rhinology 2013**, held on April 18th to 20th, in
Sao Paulo – Brazil, presenting the invited paper **“NASAL
POTENTIAL DIFFERENCE: A NEW DIAGNOSTIC TEST FOR
CYSTIC FIBROSIS”** (Rhinology Oral presentation OFP-006).



Aldo Stamm
President



Apêndice 2. Certificado de premiação: Melhor Trabalho – categoria apresentação oral, congresso Rhinology 2013



Apêndice 3. Capa da Rhinology Journal: edição vigente



