



**Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,  
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**O DESAFIO DO DIAGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA NO BRASIL:  
REVISÃO NARRATIVA E ANÁLISE DA MEDIDA DA  
DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL**

**Izabela Rocha Sad**

**Rio de Janeiro  
Outubro de 2015**





**Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,  
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**O DESAFIO DO DIAGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA NO BRASIL:  
REVISÃO NARRATIVA E ANÁLISE DA MEDIDA DA  
DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL**

**Izabela Rocha Sad**

Tese apresentada a Pós-Graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira como parte dos requisitos na obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Maria Virginia Marques Peixoto

Co-orientadora: Laurinda Yoko Shinzato Higa

**Rio de Janeiro  
Outubro de 2015**

S124 Sad, Izabela Rocha.

O desafio do diagnóstico da Fibrose Cística no Brasil: revisão narrativa e análise da medida da diferença de potencial nasal / Izabela Rocha Sad. – Rio de Janeiro, 2015. 149 f.; il.

Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, RJ, 2015.

Orientadora: Maria Virginia Marques Peixoto  
Co-orientadora: Laurinda Yoko Shinzato Higa

Inclui Bibliografias

1. Fibrose Cística. 2. Triagem Neonatal. 3. Diagnóstico. 4. Desenvolvimento Tecnológico. 5. Diferença de Potencial Nasal. 6. Brasil. I. Título.

CDD 22.ed. 616.372

*Aos pacientes com fibrose cística.*

*Não teria sentido  
se não fosse por eles,  
com eles e para eles.*

## **Agradecimentos**

Aos meus pais,  
por tudo.

Ao meu marido, por me compreender, me apoiar e permanecer ao meu lado,  
especialmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, por compreenderem minha ausência.

À Laurinda Higa, à Maria Virginia Peixoto e à Tania Folescu, sem as quais esse  
sonho não teria se tornado uma realidade.

À Teresinha Leal, pelo estímulo e incessante apoio que foram e continuarão  
sendo fundamentais nessa trajetória.

Às minhas amigas-irmãs, Josefina Monteiro de Barros, Tatiana Antunes,  
Priscila Reis, Camila Lara e Daniele Vieira, pelo apoio e encorajamento  
presentes desde o início.

À Ana Claudia Almeida, Alice Takitani, Raisal Martins e D. Maria pela parceria  
incondicional.

Às chefes Cristine Delgado, Christina Lins e Cintia Salles, pela ajuda nas  
questões práticas de horários e plantões.

Às colegas Glaucia Calixto, Rachel Rizério, Ana Rafaela, Daniele Honorato,  
Daniela Mohaupt, M Eduarda Glicério, Renata Sabroso e tantas outras que me  
ajudaram quando o tempo valia mais que tudo.

À Renata Pizarro, Maira Timbó, Aleksandra Norek, Nico Derichs, e a todos que  
contribuíram de alguma forma.

À Elisabeth Moreira e à Katia Sidrônio, por acreditarem no projeto e me apoiarem em momentos decisivos.

Aos colegas da Pneumologia do IFF, pelo apoio.

Às equipes do Dpto de Compras, de Manutenção, em especial ao Meirelles, pelo suporte logístico.

À Dora, do CEP/IFF e à Fernanda Canalonga, da Comunicação do IFF, pela enorme ajuda em momentos fundamentais.

Ao Jorge Batista, de BioManguinhos, pela imensa colaboração e apoio.

À Vice-Diretoria de Pesquisa do IFF, equipe do PIP e da Fiotec.

À Pós-Graduação em Pesquisa Aplicada a Saúde da Mulher e da Criança do IFF, em especial à Rose.

À equipe do Programa de Doutorado no Exterior da Capes – Ciências sem Fronteiras.

À banca examinadora da qualificação e da defesa da tese, pelas facilidades institucionais, comentários, sugestões e críticas enriquecedoras.

Em especial,

Aos pacientes com fibrose cística e aos seus familiares.

**Lista de siglas e abreviaturas**

AMPc	Adenosina-Monofosfato Cíclica
CaCC	Canal de Cloreto Ativado pelo Cálcio
CFF	<i>Cystic Fibrosis Foundation</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
Cl <sup>-</sup>	Cloreto
DP	Diferença de Potencial
DP <sub>máx</sub>	Diferença de Potencial Basal Máximo
DPN	Diferença de Potencial Nasal
ECFS	<i>European Cystic Fibrosis Society</i>
ENaC	<i>Epithelial Na channel</i>
FC	Fibrose Cística
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IFF	Instituto Nacional de Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IP	Insuficiência Pancreática
MCI	Medida da corrente intestinal
Na <sup>+</sup>	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PTN	Programa de Triagem Neonatal
QPIT	<i>Quantitative Pilocarpine Iontophoresis Test</i>
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucleico Mensageiro
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	<i>Total Chloride Response</i>
TIR	Tripsina Imonurativa
TN	Triagem Neonatal
TS	Teste do Suor



VS            Voluntários Sadios  
Δamil        Delta Amilorida

## Resumo

**Introdução:** Apesar do grande avanço no conhecimento da fisiopatologia e da genética da fibrose cística, o número de diagnósticos inconclusivos vem crescendo. A conclusão diagnóstica ainda representa um dos maiores desafios para clínicos e geneticistas, e portanto, inovações tecnológicas envolvendo testes diagnósticos vem sendo realizadas. A implementação sistemática da triagem neonatal deu origem a uma nova coorte de pacientes assintomáticos.

**Objetivos:** Analisar as evidências na literatura sobre as estratégias para a triagem e diagnóstico de FC. Analisar os processos de triagem e de diagnóstico no cenário brasileiro. Realizar a prospecção de novas tecnologias diagnósticas. Avaliar a repetibilidade e valor diagnóstico dos parâmetros da medida da diferença de potencial nasal e dos escores de discriminação entre normais e patológicos, tais como Wilschanski e Sermet.

### **Métodos:**

No primeiro artigo, foi realizada uma revisão narrativa e crítica da literatura, de caráter descritivo e discursivo. A análise abrangente foi baseada em quatro eixos temáticos, na qual a busca por publicações foi realizada em bases de dados eletrônicas ou foi decorrente de referências cruzadas.

No segundo artigo foi realizado um estudo transversal prospectivo numa amostra de conveniência hospitalar, no qual a medida da diferença de potencial nasal foi realizada em sujeitos saudáveis, pacientes sem fibrose cística e pacientes com fibrose cística, no centro de referência do Rio de Janeiro. A repetibilidade dos principais parâmetros e dos escores de Wilschanski e Sermet foram avaliados por diagramas de dispersão e por gráficos de Bland-Altman.

### **Resultados:**

As estratégias de TN utilizadas ao redor do mundo diferem entre si. Sua escolha, em geral é baseada nas características genéticas da população, no sistema de saúde e nas condições sócio-econômicas locais. A estratégia que adota duas dosagens da tripsina imunorreativa é adequada para países com grande miscigenação como o Brasil, porém depende da coleta de 2 amostras de sangue, o que propicia maior taxa de perda. As estratégias que incluem a análise genética são as mais utilizadas no mundo, porém estão associadas a identificação elevada de portadores, demanda aumentada de teste do suor e de assistência em centro de referência para um número maior de lactentes com diagnósticos inconclusivos. A maioria das inovações tecnológicas no diagnóstico de FC capta as alterações provocadas na fisiologia do suor pela disfunção da proteína CFTR.

Diferenças significativas foram encontradas ao se comparar os parâmetros da medida da diferença de potencial nasal no grupo de pacientes com FC, com os dos outros grupos ( $p=0.000$ ). Em cada grupo de participantes, as médias dos escores diagnósticos foram concordantes com as condições de doente/não-doente. Os parâmetros da medida da diferença de potencial nasal e os escores de Wilschanski e Sermet obtiveram diferença não significativa entre a primeira e segunda medida, se localizando dentro dos respectivos limites de concordância na análise gráfica de Bland-Altman.

**Conclusões:**

Existe uma crítica nos estudos que descreveram estratégias que incluem a análise genética na TN no sentido de avaliar o custo efetividade de opções que possam reduzir os desfechos indesejados. Há indicações de que os programas de triagem neonatal incluirão o teste da proteína associada a pancreatite em suas estratégias. No atual estágio tecnológico do SUS, a estratégia que inclui duas dosagens de tripsina imunorreativa é a mais adequada, pois não existe um painel de mutações para a análise genética que responda ao grau de diversidade da população brasileira. Novas tecnologias diagnósticas que possam ser realizadas em lactentes são necessárias

A repetibilidade verificada nos gráficos de Bland-Altman, sugerem que a medida da diferença de potencial nasal pode ser realizada no centro de referência do IFF para estudos de validação da técnica e para pesquisa clínica nas quais este teste exerce o papel de biomarcador.

**Palavras-chave:** fibrose cística, triagem neonatal, diagnóstico, inovações tecnológicas, diferença de potencial nasal, Brasil.

## Abstract

**Introduction:** The newborn screening led to the creation of a new cohort of patients, asymptomatic to the diagnosis. Despite the great advance in the knowledge about cystic fibrosis, the inconclusive number of diagnosis increased. The diagnostic conclusion still represents one of the biggest challenges for clinicians and geneticists and therefore technological innovations involving diagnostics tests have been performed.

**Objectives:** This study aimed to analyze the evidences in the literature about the strategies for the screening and diagnosis of CF. Aimed also to analyze the screening and diagnosis processes in the Brazilian scenario. To carry out prospections about new diagnostic technologies. To evaluate the repeatability and the diagnostic value of the measure of the parameters of nasal potential difference and the Wilschanski and Sermet scores.

### Methods:

At the first article, it was made a narrative and critical literature review, with a descriptive and discursive character. The comprehensive analysis was based on four thematic axes, in which the search for publications was made in electronic databases or was due of the cross-references.

In the second article, it was made a transversal prospective study in the hospital convenience sample, in which the nasal potential difference measure was made in healthy persons, patients without cystic fibrosis and patients with the cystic fibrosis, in the Rio de Janeiro reference center. The repeatability of his main parameters and Wilschanski and Sermet scores were evaluated by scatter and by Bland-Altman plots.

### Results:

The NBS strategies utilized around the world differ from each other, because their choice has to be based on genetic characteristics of the population, in the health system and the local socio-economic conditions. The strategy that adopted two doses of immunoreactive trypsin is suitable for the countries with great miscegenation as Brazil, but it depends of the two blood samples collection, which provides a higher rate of loss. The strategies that include the genetic analysis are the most used in the world, however they are associated with the high identification of scaffolds, increase in the sweat's test and the assistance in a reference center for a greater number of infants with inconclusive diagnostics. The majority of the technological innovations in the FC diagnosis addresses the changes caused in sweat's physiopathology by the CFTR protein dysfunction.

Significant differences were found when comparing the DPN parameters in the FC group, with the other groups ( $p=0.000$ ). In each group of participants, the averages of diagnostic scores were in agreement with the conditions of the CF/non-CF. The parameters of nasal potential difference measure and the Wilschanski and Sermet scores obtained non-significant difference between the first and the second measures, localized within the respective limits of concordance on the graphical analysis of Bland-Altman.

**Conclusions:** There is a critical in the studies that described strategies that include the genetic analysis in NBS in the sense to evaluate the cost-effectiveness of options that can reduce the unwanted effects. There are indications that the newborn screening programs will include the pancreatitis-associated protein test in their strategies. In the current technological stage of the SUS, the strategy that includes two doses of immunoreactive trypsin is the most appropriate, because doesn't exist a panel of mutations for the genetic analysis that responds to the degree of diversity of the Brazilian population. New diagnostic technologies that can be performed in infants are required.

The repeatability seen in Bland-Altman plots, suggests that the measure of nasal potential difference can be performed in the reference center of the IFF for technical validation studies and for the clinical research in which this test plays the role of biomarker.

**Keywords:** cystic fibrosis, newborn screening, diagnosis, technological innovations, nasal potential difference, Brazil.

## Sumário

<b>CAPITULO 1</b>	19
<b>1.1 Introdução</b>	20
1.1.1 Justificativa	20
1.1.2 Hipóteses	22
1.1.3 Objetivos	23
<b>1.2 Marco teórico</b>	24
1.2.1 Fibrose cística	24
1.2.2 Evolução histórica	25
1.2.3 Incidência e prevalência	27
1.2.4 O gene <i>CFTR</i>	28
1.2.5 A proteína CFTR	31
1.2.6 Genótipo x fenótipo	34
1.2.7 Diagnóstico	35
1.2.7.1 Teste do suor QPIT	37
1.2.7.2 Análise genética	41
1.2.7.3 Medida da diferença de potencial nasal	42
<b>1.3 Detalhamento metodológico .</b>	49
1.3.1 do Artigo 1: "Desafios diagnósticos da fibrose cística no Brasil"	49
1.3.2 do Artigo 2: "Repeatability and diagnostic value of nasal potential difference in a genetically admixed population"	50
<b>1.4 Referências</b>	57
<b>CAPITULO 2</b>	63
<b>2.1 Artigo 1: Desafios do diagnóstico de fibrose cística no Brasil</b>	64
<b>2.2 Artigo 2: Repeatability and diagnostic value of nasal potential difference in a genetically admixed population</b>	99
<b>CAPITULO 3</b>	138
<b>3.1 Conclusão e considerações finais</b>	139
<b>Apendices</b>	143
TCLE para maiores de idade	143
TCLE para menores de idade	146
<b>Anexos</b>	149
Folha de rosto de Aprovação do CEP	149

## Lista de figuras

- Figura 1.1 Classes das mutações CFTR e respectivos mecanismos causais.
- Figura 1.2 Diagrama de dos componentes e de duas etapas presentes no modelo de Schwartz-Thaysen de secreção da glândula exócrina que explica a composição final do fluido excretado da glândula.
- Figura 1.3 Cascata da patogênese da fibrose cística no pulmão. O mecanismo de disfunção da FC inicia-se com o defeito primário no gene e culmina na disfunção pulmonar severa.
- Figura 1.4 Cascata da fisiopatologia da doença respiratória na FC.
- Figura 1.5 Relação esquemática entre sintoma e fenótipo da FC segundo o tempo e a gravidade
- Figura 1.6 Exemplos de traçados de DPN em indivíduo sadio e em paciente com FC.
- Figura 1.7 Os principais parâmetros utilizados na interpretação da DPN.
- Figura 1.8 Critérios de busca de artigos por eixos temáticos.
- Figura 1.9 Fluxograma de pacientes FC.

### **Lista de tabelas**

Tabela 1.1 Classes de mutações agrupadas de acordo com o comprometimento funcional ocasionado pela expressão dos genes.

Tabela 1.2 Diferença de potencial resultante em cada uma das etapas da medida de DPN de acordo com a solução instilada, no sujeito sadio e no paciente com FC.



## **Apresentação da tese**

Esta tese é apresentada no formato de coletânea de artigos e segue as normas do Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher do Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz (IFF).

O **capítulo 1** compreende a introdução, o marco teórico, o detalhamento metodológico e as referências. Na introdução estão incluídos a justificativa, os objetivos e as hipóteses. O marco teórico inicialmente aborda a evolução histórica e a epidemiologia da fibrose cística (FC), seguida das bases fisiopatológicas para melhor compreensão das questões relacionadas ao diagnóstico. Os métodos, técnicas e materiais não incluídos nos artigos foram descritos no detalhamento metodológico, inclusive as questões éticas envolvidas. Ao final do capítulo 1 as referências estão relacionadas e numeradas conforme sua ordem de citação no texto.

O **capítulo 2** é formado pelos dois artigos que constituem o corpo dessa tese, formatados segundo as regras para publicação dos periódicos nos quais serão publicados. O primeiro deles, “Desafios no processo diagnóstico da fibrose cística no Brasil”, é um artigo de revisão narrativa e integrativa, no qual o diagnóstico da FC no Brasil é problematizado e amplamente discutido de forma matricial, em quatro eixos temáticos – triagem neonatal, processo diagnóstico, cenário brasileiro e inovações tecnológicas, perpassados pelas evidências e atualizações internacionais. Após a apreciação da banca, este

artigo será submetido para publicação em periódico nacional de larga abrangência, ex. Jornal Brasileiro de Pediatria (JPed). O artigo 2 “*Repeatability and diagnostic value of nasal potential difference in a genetically admixed population*” tem como tema a medida da diferença de potencial nasal, teste capaz de avaliar *in vivo* a função da proteína CFTR (reguladora da condutância transmembrana da fibrose cística). O objetivo do artigo foi analisar a repetibilidade e o valor diagnóstico do exame em voluntários saudáveis, em doentes não fibrocísticos e em pacientes com FC, ao ser realizado no IFF, centro de referência do Rio de Janeiro. Este artigo foi aceito para publicação no periódico canadense “*Journal of Clinical Medicine Research*”.

O **capítulo 3** inclui a conclusão e as considerações finais da tese. Em Anexo, encontram-se o parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do IFF e as normas para submissão nos dois periódicos citados anteriormente. Nos apêndices estão incluídos os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) utilizados para maiores e menores de idade.

**1.1 Introdução****1.2 Marco teórico****1.3 Detalhamento metodológico****1.4 Referências**

## 1.1 Introdução

### 1.1.1 Justificativa

A triagem neonatal levou a criação de uma nova coorte de pacientes assintomáticos. Apesar do grande avanço no conhecimento sobre a fibrose cística, o número de diagnósticos inconclusivos vem crescendo. A conclusão diagnóstica ainda representa um dos maiores desafios para clínicos e geneticistas e, portanto, inovações tecnológicas neste campo vêm sendo realizadas.

A globalização dos programas de triagem neonatal (PTN) levaram os países a se defrontar com um número crescente de diagnósticos em indivíduos pré-sintomáticos, o que aumenta a chance de retardar a progressão da morbimortalidade nos pacientes com FC e permite que um número de pacientes, cada vez maior, alcance desfechos relevantes como a maior sobrevida e a melhor qualidade de vida.

Apesar da oferta de novas tecnologias diagnósticas, a frequência dos casos inconclusivos também aumentaram, constituindo um dos maiores desafios no enfrentamento da FC. Tal fato ocorre mesmo diante da ampliação dos conhecimentos nos campos da fisiopatologia, genética, biologia molecular, nos estudos da relação genótipo x fenótipo e na pesquisa clínica.

Para que a morbimortalidade seja reduzida é essencial que o diagnóstico de FC seja definido com acurácia e em tempo hábil, para se assegurar o acesso universal dos pacientes às terapias apropriadas em serviços multidisciplinares especializados (1).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS), ao incluir a FC no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) – Portaria MS nº822, de 06 de junho de 2001, assumiu o compromisso de realizar políticas públicas de saúde relacionadas à prevenção secundária que resultam em crescente demanda de seus exames diagnósticos. Ademais, é de responsabilidade do SUS a disponibilização de medicamentos que assegurem os tratamentos mais efetivos para os doentes. Dez anos depois da criação do PNTN, o estado do Rio de Janeiro foi habilitado a realizar a Fase III do Programa (2).

Desde a publicação da Portaria MS nº 745, de 22 de dezembro de 2005 (3), o Instituto Fernandes Figueira (IFF) é reconhecido como centro de referência em FC. O seu papel no SUS é pesquisar temas de interesse para a saúde pública e, no que tange a FC, buscar, analisar e discutir as evidências mais atuais da literatura sobre a triagem neonatal e a problemática do processo diagnóstico que lhe sucede. Cabe também ao centro de referência, incorporar e avaliar as inovações tecnológicas.

É neste cenário que a medida da diferença de potencial nasal (DPN) se inclui. Sua principal aplicabilidade é o esclarecimento diagnóstico da FC e seu segundo grande papel é exercer a função de biomarcador em pesquisas clínicas que envolvem moduladores da proteína CFTR.

Dessa forma, este estudo pretende contribuir para a identificação e recomendação, tanto para o Ministério de Saúde como para as demais unidades de saúde do SUS, das estratégias diagnósticas mais adequadas à realidade brasileira e para a incorporação de novo teste diagnóstico no centro de referência para FC do estado do Rio de Janeiro.

## Hipóteses

Existe suficiente evidência para identificar e recomendar estratégias de triagem e diagnóstico da FC.

Os parâmetros do teste da DPN, realizado segundo o protocolo de Leal e cols. no IFF, alcançam valores similares em exames repetidos nos mesmos sujeitos.

Os escores diagnósticos de Wilschanski e Sermet obtidos a partir da primeira e segunda medida da DPN são semelhantes e consistentes na discriminação das condições de FC e não FC.

### 1.1.2 Objetivos

#### Objetivo geral

Explorar o diagnóstico de FC e analisar a medida da DPN

#### Objetivos específicos

Analisar as evidências da literatura sobre as estratégias para a triagem e o diagnóstico da FC.

Analisar os processos de triagem e de diagnósticos de FC no cenário brasileiro.

Realizar a prospecção de novas tecnologias diagnósticas.

Avaliar a repetibilidade e o valor diagnóstico da medida da DPN e dos escores diagnósticos de Wilshanski e Sermet no IFF

## 1.2 Marco teórico

### 1.2.1 Fibrose cística

A FC é a doença genética autossômica recessiva mais comum entre os caucasianos, causada por mutações no gene *CFTR* que codifica a proteína de mesmo nome. A proteína CFTR, normalmente presente na membrana epitelial, é um canal iônico cuja principal função é o transporte transepitelial de cloreto em glândulas sudoríparas e sistemas respiratório, digestório e reprodutor (4,5). Trata-se de uma doença multissistêmica, caracterizada por insuficiência pancreática e infecções respiratórias crônicas associadas à perda de função pulmonar, exacerbações pulmonares de repetição e falência respiratória (6).

Nas últimas décadas, foi observado um aumento progressivo da sobrevivência dos pacientes com FC conforme novas terapias direcionadas aos sintomas da doença foram sendo desenvolvidas e incorporadas à rotina de tratamento desses pacientes (7). O futuro parece ainda mais promissor para a nova coorte de pacientes, diagnosticados precocemente a partir da triagem neonatal e antes mesmo do surgimento de sinais e sintomas. A medicina personalizada, na qual a droga é indicada para a correção do defeito de base especificamente relacionado a mutação genética presente em cada indivíduo, já é uma realidade para 4-5% dos pacientes (8). A perspectiva futura, a curto e médio prazo, é a ampliação dessa realidade para a maioria dos pacientes com FC, homocigotos ou heterocigotos compostos para F508del (8).



### 1.2.2 Evolução histórica

Desde o século XVI, a associação entre suor salgado e doença letal grave já era conhecida. O folclore europeu relatava feitiço e risco de morte precoce em crianças que, quando beijadas na fronte, tivessem sabor salgado (9).

Em 1938, na ocasião da primeira descrição da “doença fibrocística do pâncreas” por Dorothy Andersen (EUA), a expectativa de vida era de 6 meses, o diagnóstico era realizado por necrópsia e acreditava-se que a doença era causada por obstrução dos ductos das glândulas exócrinas por tampões mucosos (10).

No verão de 1948, em Nova Iorque, uma onda de calor intenso ocasionou muitos casos de desidratação grave, febre e choque. Kessler, Andersen e Di Sant’Agnese observaram que pacientes com FC eram os mais suscetíveis à essa prostração decorrente do calor e identificaram neles concentrações elevadas de eletrólitos no suor (11).

As técnicas inicialmente utilizadas para estimular a sudorese envolviam o “estresse térmico”, no qual o paciente era mantido numa sala aquecida a 32,2°C durante 1-2hs. Em 1955, o método foi simplificado: uma bolsa plástica envolvia o paciente por inteiro, até o pescoço, e ele era mantido assim sob lençóis por aproximadamente 60-90min. Métodos com menor risco para os pacientes foram desenvolvidos utilizando placas ou papéis, contendo nitrato de prata que, ao entrarem em contato com o suor dos dedos, mudavam de coloração. Porém, esses métodos nunca foram completamente validados (11).

Em 1959, Gibson & Cooke (12) publicaram a técnica de estimulação localizada de sudorese, utilizando a aplicação tópica de pilocarpina através da iontoforese - método *quantitative pilocarpine iontophoresis test* (QPIT). Durante 25 anos, esse foi o único teste reconhecido para a coleta de suor.

O primeiro registro nacional de pacientes foi criado em 1966 pela *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) e desde então, este e os registros subsequentes, vêm sendo anualmente atualizados (13). Nesse período, outro marco na história da FC foi a implementação de programas agressivos de tratamento baseados na recuperação nutricional, na desobstrução de vias aéreas e no tratamento de infecção pulmonar, realizados em centros de referência (10).

A década de 80 foi caracterizada por grandes avanços no campo de conhecimento da fisiopatologia da doença. Knowles e cols. descreveram o transporte alterado de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e sódio ( $\text{Na}^+$ ) pelo epitélio respiratório de pacientes com FC (14), seguidos por Quinton e colaboradores que descreveram a impermeabilidade de suas glândulas sudoríparas ao  $\text{Cl}^-$  (15).

Em 1983, a Wescor® (Logan, Utah) criou um sistema fechado de coleta de suor para evitar a evaporação, no qual a iontoforese é realizada através de discos em gel contendo pilocarpina. O suor produzido é coletado diretamente em tubos capilares espirais, sem necessitar de eluição e, posteriormente e analisado. A preferência pela utilização desse método tem sido cada vez maior devido à sua simplicidade e à automação do estímulo à sudorese (11).

Em 1989, o gene da FC foi descoberto (16,17), e mais adiante foi comprovado que o defeito básico se encontrava no canal de  $\text{Cl}^-$  regulado pelo monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (10) e as mutações de maior

frequência foram identificadas. A partir daí novos testes diagnósticos foram propostos, principalmente voltados para a elucidação de casos atípicos, entre eles a DPN (18,19).

A triagem neonatal de FC foi introduzida na Austrália em 1983 com a dosagem da tripsina imunorreativa (TIR) dosada em amostras de sangue seco colhidas na 1ª e 3ª/4ª semanas de vida. A primeira estratégia utilizada foi a TIR/TIR. Esta permaneceu vigente até o início dos anos 90, quando a descoberta do gene *CFTR* propiciou a substituição da segunda TIR pela análise genética denominada DNA, estratégia reconhecida como IRT/DNA (20).

### 1.2.3 Prevalência e incidência

Atualmente aproximadamente 70.000 pessoas têm FC no mundo (21), porém, a prevalência da doença difere de acordo com variações geográficas e étnicas. Entre os caucasianos da comunidade europeia, a incidência varia de 1:1700 nascidos vivos na Irlanda até 1:7700 nascidos vivos na Finlândia (5). Na América do Norte a incidência é 1:3 500 nascidos vivos (22). Em populações com etnia não caucasiana a incidência é menor, 1:4000 a 1:10000 nascidos vivos na América Latina, 1:15000 a 1:30000 em africanos e 1: >100000 em asiáticos (6).

No Brasil, a partir do PNTN, estudos demonstraram incidência de FC de 1:9 520 nascidos vivos no Paraná (23), 1:9 115 em Minas Gerais (24) e 1:8 776 em Santa Catarina (25). Com base na estimativa de Cabello e cols. (26) e nos registros do DATASUS sobre número de nascidos vivos no estado do Rio de Janeiro em 2013 (27) seria esperado o nascimento de 33 crianças com FC, a cada ano, neste estado.

#### 1.2.4 O gene *CFTR*

O gene *CFTR* é grande, mede aproximadamente 250kb, contém 27 *exons* e está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q31.2). O RNAm codificado por ele tem 6.5kb de extensão e traduz uma proteína com 1480 aminoácidos. Em circunstâncias normais o gene passa pelo processo de transcrição e é traduzido na proteína CFTR que trafega até a membrana apical celular, onde funciona principalmente como um canal de Cl<sup>-</sup> (5).

A maioria das mutações do gene *CFTR* são mudanças em três ou menos nucleotídeos que levam a substituições de aminoácidos, em sítios de recomposição – *splicing sites* ou *frameshifts*, ou mutações sem sentido. A mutação F508del, por exemplo, refere-se à deleção de três pares de base que codificam a fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR.

As mutações podem alterar a função da proteína CFTR por diversos mecanismos e sua compreensão é importante, pois tem relação direta com as estratégias terapêuticas das drogas que visam a correção da sua disfunção (5).

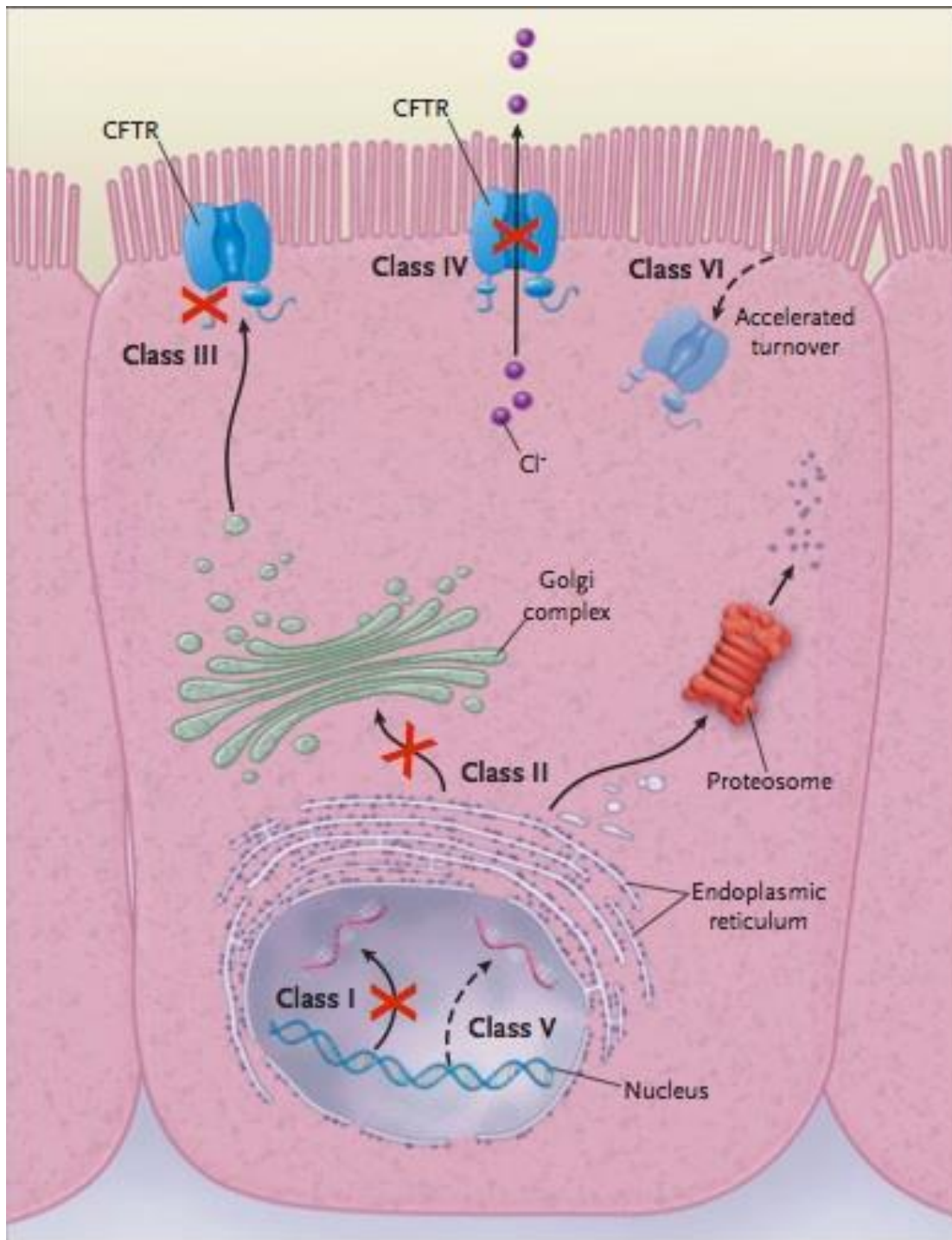


Figura 1.1: Classes das mutações CFTR e respectivos mecanismos causais (retirado de Rowe et al., 2005).

As mutações são agrupadas em seis classes, de acordo com a repercussão que causam na síntese da proteína CFTR ou na sua função (28,29) (Figura 1.1 e Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Classes de mutações agrupadas de acordo com o comprometimento funcional ocasionado pela expressão dos genes.

CLASSE	Local de ação	Repercussão do gene <i>CFTR</i> na síntese ou função proteína CFTR
I	BIOSSÍNTESE	não ocorre a síntese
II	TRANSPORTE	é sintetizada mas fica retida no retículo endoplasmático, sendo degradada sem alcançar o ápice celular
III	ATIVACÃO	é sintetizada e transportada até o ápice celular, porém sua ativação e regulação pelo ATP e AMPc são interrompidas
IV	CONDUTÂNCIA	sintetizada e expressa no ápice celular, porém a condutância do Cl <sup>-</sup> é reduzida
V	TRANSCRIÇÃO	síntese e o processamento são parcialmente incompletos
VI	ESTABILIDADE	redução da estabilidade na membrana celular ou da condutância de íons, diferentes de Cl <sup>-</sup>

Mutações das classes I-III e VI estão associadas a fenótipos mais graves pois levam a ausência da proteína na membrana apical ou a sua disfunção. Já as mutações das classes IV e V, preservam algum grau de função residual do canal e portanto, estão relacionadas a fenótipos mais leves (5).

A gravidade da doença e suas complicações variam de acordo com os órgãos acometidos. Em alguns órgãos, como o pâncreas exócrino, a gravidade é diretamente relacionada ao genótipo CFTR. Já a expressão da doença pulmonar é multifatorial, sofrendo maior influência dos genes modificadores e dos fatores ambientais (30).

### 1.2.5 A proteína CFTR

A CFTR é uma proteína que funciona como um canal iônico transepitelial, participando do transporte de cloreto, gluconato e bicarbonato (5). Esse canal é ativado pela fosforilação da proteína quinase A, num processo dependente e modulado pelo AMPc. Sua principal função é o transporte de  $\text{Cl}^-$ , podendo também desempenhar outras funções, como: inibição do transporte de  $\text{Na}^+$  realizado pelos canais epiteliais de  $\text{Na}^+$  - ENaC, sensíveis à amilorida; regulação dos canais de  $\text{Cl}^-$  ativados pelo cálcio - CaCC; regulação dos canais de potássio; controle de processos de exocitose e endocitose celular e formação de complexos moleculares na membrana plasmática. A ausência da proteína CFTR, além de comprometer o transporte iônico transepitelial, também influencia respostas inflamatórias, processos de maturação, regulação de pH intracelular e de sinalizações celulares (5,29).

#### Nos tecidos e órgãos

A disfunção na CFTR explica as alterações nos diversos órgãos envolvidos na FC. A CFTR se expressa nas células epiteliais do trato respiratório, pâncreas, intestino, nas glândulas sudoríparas e salivares e no sistema reprodutor (29).

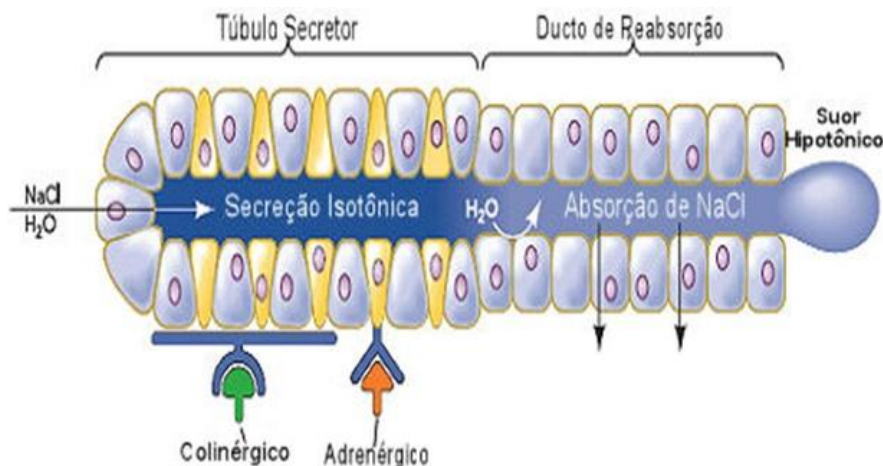


Figura 1.2: Diagrama de dois componentes e de duas etapas presentes no modelo de Schwartz-Thaysen de secreção da glândula exócrina que explica a composição final do fluido excretado da glândula. (Retirada e traduzida de Quinton, 2007).

Sabe-se que a reabsorção de  $\text{Cl}^-$  é feita através da CFTR, que se encontra entre as membranas plasmáticas da superfície apical das células situadas ao longo do ducto da glândula sudorípara. Nas glândulas sudoríparas de indivíduos hígidos, o  $\text{Na}^+$  da perspiração é paulatinamente reabsorvido nos ductos luminiais, junto com o  $\text{Cl}^-$ , resultando na produção de suor com pouco sal (31).

A diferença básica do paciente com FC para o indivíduo sadio está na habilidade em reabsorver o  $\text{Cl}^-$  antes da eliminação do suor na superfície da pele. Segundo a teoria dos “dois passos”, a alta concentração de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  no suor dos FC seria determinada pela alteração da secreção primária (isomótica) ao longo da glândula sudorípara e pela alteração no transporte de NaCl em seus túbulos de reabsorção (31). Nos pacientes com FC, a ausência ou disfunção da CFTR tornam suas células epiteliais impermeáveis ao  $\text{Cl}^-$ . Como não há outra forma efetiva para a reabsorção do NaCl, este permanece no



lúmen, levando a eliminação de suor com alto teor de sal, “suor salgado” (Figura 1.2) (10).

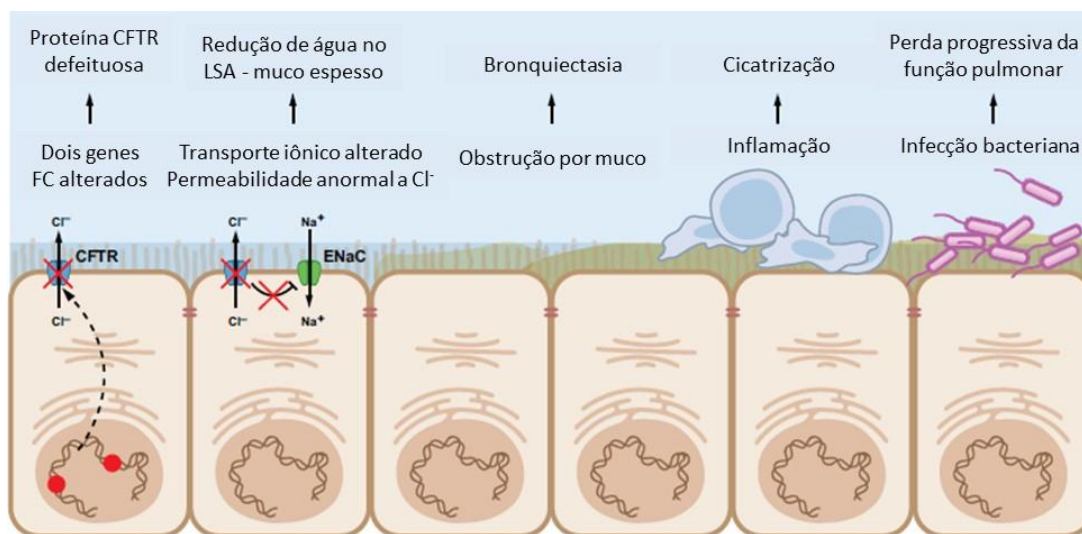


Figura 1.3 – Cascata da patogênese da fibrose cística no pulmão. O mecanismo de disfunção da FC inicia-se com o defeito primário no gene e culmina na disfunção pulmonar severa. CFTR: regulador de condutância transmembrana, ASL: líquido da superfície das vias aéreas; ENaC canal epitelial de  $\text{Na}^+$  (Retirado e traduzido de Amaral, 2015)

Nas vias aéreas é diferente. A ausência ou disfunção da proteína CFTR ocasiona a redução na secreção de  $\text{Cl}^-$  e o aumento da absorção do  $\text{Na}^+$  (32,33). Este último é causado pela ausência da inibição do canal ENaC pela CFTR. O transporte alterado de sal provoca a desidratação da camada líquida epitelial superficial e, conseqüentemente, as secreções ficam viscosas, levando a alterações na depuração mucociliar. A partir daí, ocorrem infecções e inflamações respiratórias crônicas, e posteriormente, destruição pulmonar e insuficiência respiratória (34) (Figuras 1.3 e 1.4).

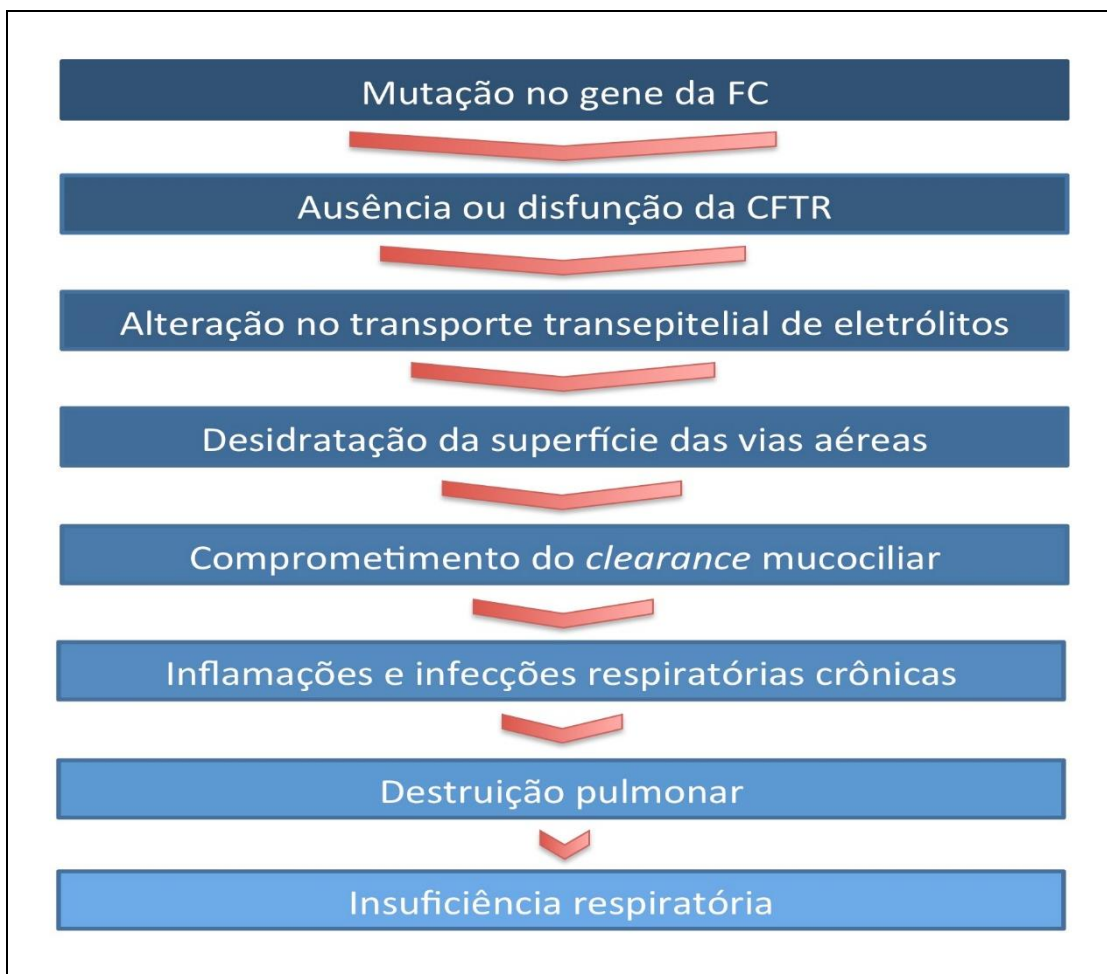
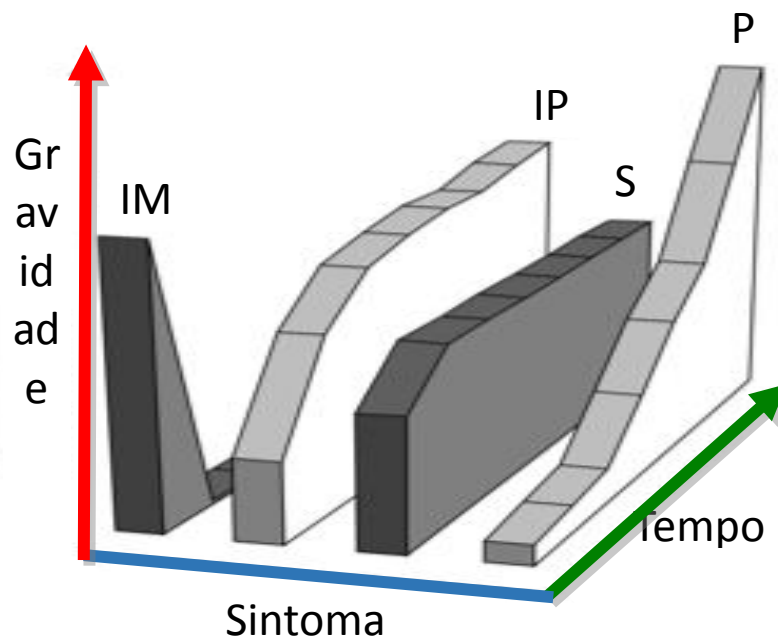


Figura.1.4. – Cascata da fisiopatologia da doença respiratória na FC.

### 1.2.6 Genótipo x fenótipo

A expressão fenotípica da FC varia ao longo do tempo de forma diferente entre os órgãos acometidos. A figura 1.5 ilustra os diversos estágios de desenvolvimento de doença - relação fenótipo *versus* tempo. O íleo meconial é o exemplo de manifestação clínica que pode estar presente somente no período perinatal, necessitando ou não de intervenção cirúrgica para sua resolução. O nível elevado de  $Cl^-$  no suor ocorre desde o nascimento e se mantém estável por toda a vida. Já a insuficiência pancreática e doença pulmonar podem não estar presentes ao nascimento mas assim que se

manifestam, apresentam severidade crescente ao longo do tempo e sua progressão pode ser mais ou menos acelerada (28).



**IM: íleo meconial, IP: insuficiência pancreática,  
S: eletrólitos alterados no suor, P: doença pulmonar**

Figura 1.5: Relação esquemática entre sintoma do fenótipo da FC segundo o tempo e a gravidade (traduzido e adaptado de Zielenski et al., 2000)

### 1.2.7 Diagnóstico

Até alguns anos atrás, a maioria dos pacientes era diagnosticada no primeiro ano de vida a partir de suspeita clínica, devido à doença pulmonar crônica e/ou insuficiência pancreática (IP). Atualmente, vem-se observando um número crescente de pacientes diagnosticados na idade adulta com formas mais leves da doença (35). A grande mudança no paradigma, porém, vem ocorrendo na faixa etária de lactentes, na qual o diagnóstico precoce e pré-sintomático, à partir da TN, vem sendo cada vez mais frequente.

A suspeita diagnóstica pode estar relacionada à história familiar, à TN positiva ou à presença de manifestações clínicas compatíveis com FC. No caso de história familiar, a investigação pode ser realizada tanto no período pré-natal como no pós-natal. Nesse caso, dependendo da faixa etária do indivíduo suspeito, a TN ou o TS são realizados.

Desde a década de 70, quando foi iniciada, a TN vem se expandindo ao redor do mundo. Os protocolos usam a dosagem sérica da tripsina imunorreativa (TIR) como teste inicial e o teste do suor QPIT para a confirmação diagnóstica (36). As estratégias de triagem variam entre si em relação ao número de etapas e de exames utilizados em cada uma delas.

As manifestações clínicas costumam ser multissistêmicas, podendo variar de acordo com a faixa etária (6).

As diretrizes propostas pela *European Cystic Fibrosis Society* - ECFS (37) e *Cystic Fibrosis Foundation* - CFF (1) indicam os testes diagnósticos capazes de confirmar a doença: TS por QPIT, análise genética de mutações e medida da DPN.

A seguir, esses três testes diagnósticos (37) serão abordados, porém de forma introdutória e complementar ao que se encontra exposto no corpo do 1º artigo da tese: “Desafios diagnósticos da fibrose cística no Brasil”.

### 1.2.7.1 Teste do suor por QPIT

A medida quantitativa das concentrações de eletrólito no suor é reconhecido como o principal teste que possibilita o diagnóstico da FC desde a sua padronização em 1959 por Gibson e Cooke (1,12,37).

A confirmação do papel de transporte de eletrólito na fisiopatologia da FC possibilitou conferir a racionalidade bioquímica ao teste do suor relacionando o íon cloreto à disfunção da proteína CFTR (1,37). Assim, a medida da concentração do cloreto no suor é capaz de diferenciar a FC dos sujeitos normais (37).

A execução do teste do cloreto no suor compreende as etapas da estimulação da sudorese, coleta do suor, medida da quantidade coletada, em peso ou volume, e a medida quantitativa do cloreto no suor (38,39). A sudorese localizada é produzida pela estimulação eletro-química, durante 5 minutos, produzida pela passagem de uma corrente elétrica sobre um fármaco colinérgico – nitrato de pilocarpina, propelindo-o repulsivamente através da derme para as glândulas sudoríparas. Com isso, os receptores muscarínicos dessas glândulas exócrinas estimulam a secreção do suor (38). Habitualmente a coleta é feita no braço ou coxa. Não convém estimular nem coletar na fronte por causar queimadura, tronco por cruzar o coração, ou área inflamada – eczema ou erupção, ou secreção serosa ou sanguínea para evitar contaminação (39).

Em seguida a pele é lavada com água destilada ou deionizada e seca. Segue-se a coleta e quantificação de suor em gaze, papel de filtro, ou em espiral *Macroduct* (Wescor Inc, Logan, Utah) (40) por um período de 30 minutos. Nessa etapa, é necessária uma taxa de sudorese mínima de

1g/m<sup>2</sup>/min para conseguir uma massa ou volume suficiente de suor como sendo  $\geq 75$  mg de suor obtido pelo método Gibson-Cooke ou 15  $\mu$ L obtido pelo método de coleta em sistema fechado, constituído por um dispositivo com tubo plástico espiral *Macroduct* (1,37,40). Decorrido o tempo de coleta, remove-se a gaze ou papel de filtro pesando novamente. O aumento no peso corresponde ao volume (massa/densidade) do suor coletado. O suor então é separado da gaze ou papel de filtro via eluição. Uma alíquota é usada na determinação do cloreto (39). Finaliza com a análise da concentração do cloreto (1,37,39).

A análise do Cl<sup>-</sup> pode ser realizada pela titulação coulométrica, utilizando um cloridômetro; pela titulação manual usando a técnica de Schales e Schales com nitrato de mercúrio ou por analisadores automatizados, usando eletrodo de íon seletivo (38,39). Outros métodos, como as medidas com eletrodo de íon seletivo, *ion-selective electrode* (ISE) e métodos manuais necessitam ser validados antes de sua introdução na prática (39).

Ocasionalmente, é sugerido realizar o teste bilateral, ou coletar amostras simultaneamente em dois braços como um meio de obter amostra adequada, e ou aumentar a confiabilidade do resultado (1).

Como pré-requisito para realizar o teste, nos recém nascidos assintomáticos, recomenda-se realizar com 2 semanas de vida e peso acima de 2 Kg (1) ou acima de 3 Kg (37), medidas que possibilitam a coleta de suor suficiente. Nessa faixa, foi observado um declínio gradual dos valores de cloreto da primeira semana até seis semanas de vida. Esses dados sugerem haver menor dificuldade na interpretação se os testes forem feitos após duas semanas de vida. No entanto, os valores de cloreto no suor permanecem inconclusivos por meses ou até anos em um percentual de lactentes (1). Por

outro lado, o teste deve ser protelado nas seguintes condições de doença aguda ou desidratação, edema, eczema, ou sob oxigenioterapia (37).

Antes da interpretação do resultado, frente a um determinado resultado, convém analisar as condições do paciente e doença que podem influenciar no resultado. O conhecimento prévio dos fatores que influenciar no volume do suor coletado. A idade no momento em que o teste é feito é uma consideração importante por ocasião da interpretação do valor do cloreto no suor. Além disso, são importantes na interpretação do resultado dispor de dados referentes ao sexo, peso corporal, etnia, condição da pele, e sistema de coleta usado (1). Existem condições transitórias que ocasionam alteração nos níveis de cloreto, elevando ou reduzindo, sem haver relação com a FC: - podem estar elevados nos lactentes que estão abaixo do peso ou desidratadas, ou diminuídos quando há edema, ou uso de esteróide sistêmico. Em contrapartida, não são afetados pelo uso de diuréticos ou administração de líquidos via venosa. Há também, condições clínicas não usuais, mas possíveis de diferenciar, que apresentam cloreto  $>60$  mmol/L na ausência de FC (37).

Os protocolos descrevem, além da padronização do método, os parâmetros de qualidade, confiabilidade e interpretação do QPIT (38,39,41,42). Preferencialmente, o teste deve ser realizado em centros de referência, por profissionais experientes e em laboratórios certificados e submetidos regularmente a procedimentos de controle de qualidade (43).

Apesar dos falsos-positivo representarem a maioria, resultados falsos-negativo também são possíveis. Falsos-negativo podem ocorrer na vigência de edema ou hipoproteinemia, enquanto que falsos-positivo podem ser obtidos em insuficiência adrenal, desnutrição e *failure to thrive*, entre outros (44). A

possibilidade de erro no teste de suor (TS) varia de 10 a 15%. A maior parte deles se deve à método não confiável, à coleta inadequada de suor, assim como à problemas técnicos e de interpretação dos resultados.

Ao longo dos anos o teste do suor provou ser um teste robusto para o uso no diagnóstico de FC, além de contribuir para a maior compreensão da fisiopatologia da doença. Mais recentemente ele também está sendo utilizado como biomarcador em ensaios clínicos que avaliam a função da proteína CFTR em resposta ao uso de potenciadores (11).

Poucos testes na medicina clínica possuem o poder discriminatório do TS (10), porém, o resultado deste único teste laboratorial pode não ser conveniente para definir o diagnóstico (43).

Para lactentes com até seis meses de idade, a diretriz recomenda os intervalos de referência do cloreto: se cloreto  $\leq 29$  mmol/L a FC é improvável, se 30-59 mmol/L é intermediário, se  $\geq 60$  mmol/L é indicativo de FC (37). Diante de resultados intermediários deve-se repetir o teste do cloreto, ser referido para um centro com expertise no diagnóstico de FC na infância. Incluir na avaliação adicional a avaliação clínica pormenorizada, análise da mutação do gene CFTR extensa, repetir o teste do cloreto e seguir com intervalo de 6 a 12 meses até o esclarecimento do diagnóstico (1).

Para idade acima de 6 meses, o Comitê recomenda os seguintes intervalos de referência do cloreto do suor: se  $\leq 39$  mmol/L a FC é improvável, se 40-59 mmol/L, intermediário, se  $\geq 60$  mmol/L é indicativo de FC (1). Em pacientes com concentrações de  $\text{Cl}^-$  no suor nas faixas consideradas normais ou intermediárias, o diagnóstico deve ser estabelecido através da análise das mutações genéticas ou da medida da DPN (1,43,45).



### 1.2.7.2 Análise genética

O banco de dados *CF Mutation Database* (46) já recebeu o registro de 2001 mutações relacionadas a FC, desde 1989, quando foi criado. A velocidade de identificação de novas mutações se mantém elevada, porém nem todas as mutações encontradas possuem relevância clínica comprovada. O Projeto CFTR2 foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a expressão fenotípica das mutações relacionadas à doença através da análise de dados clínicos e laboratoriais de pacientes do mundo todo. Segundo seu relatório mais recente, 252 mutações são consideradas causadoras de FC – *CF mutation causing* (47).

O diagnóstico genético é confirmado pela identificação de mutação causadora de FC nos dois alelos. Pode ser realizada a busca em painel de mutações específicas ou a varredura completa do gene (48). Os fatores que maximizam a acurácia na primeira técnica são a inclusão preferencial de mutações causadoras de FC nesse painel e a adequação do perfil investigado às mutações mais frequentes na população-alvo (36).

Durante muito tempo a confirmação diagnóstica da FC foi considerada a principal utilidade da análise genética do gene *CFTR*. Entretanto, a análise genética não deve ser utilizada para a exclusão do diagnóstico de FC (43), por ser um teste altamente específico mas pouco sensível, devido ao grande número de mutações existentes (36).

A aplicabilidade da análise genética foi ampliada em função da expansão dos PTN e dos avanços tecnológicos na biologia molecular. Ela vem sendo utilizada na investigação das subpopulações de recém-nascidos e

lactentes com elevado risco de doença, selecionados através da TN, e também de possíveis carreadores em famílias com história de FC.

Os recentes avanços na farmacoterapia aumentaram a importância da identificação das mutações e suas respectivas classes. Na medicina personalizada, drogas moduladoras recuperam a CFTR mutante, corrigindo a disfunção da proteína CFTR. O uso do potencializador Ivacaftor (Kalydeco®, VX-770) já é uma realidade para os pacientes que possuem mutações da classe III, por ex. G551D. A perspectiva é que, nos próximos anos, pacientes homocigotos ou heterocigotos compostos para F508del, possam fazer uso de drogas corretoras, que atuam na recuperação do defeito de tráfego da proteína CFTR até o ápice celular, por ex. Lumacaftor, VX-809 (8).

#### 1.2.7.3 Medida da diferença de potencial nasal

Nos indivíduos normais, o potencial elétrico transepitelial no sistema respiratório é mantido pelo equilíbrio entre a absorção de  $\text{Na}^+$  e a secreção de  $\text{Cl}^-$ , resultando numa delicada regulação do volume líquido periciliar e do conteúdo iônico, ambos fundamentais para a manutenção do *clearance* mucociliar normal.

A alteração eletrofisiológica nas vias aéreas de pacientes com FC foi inicialmente descrita, há mais 35 anos, por Knowles e cols. (14) O primeiro protocolo *in vivo* da DPN foi proposto por Middleton e cols. em 1994 (49) para aferir a voltagem resultante do transporte transepitelial de íons enquanto a proteína CFTR era exposta a diferentes soluções com as quais a sua integridade era questionada.

A premissa da DPN é que a anormalidade bioelétrica observada na via aérea superior dos fibrocísticos reflete a das vias aéreas inferiores, já que a partir de 1cm do orifício da cavidade nasal, o epitélio escamoso torna-se epitélio ciliado pseudocolunar, com as mesmas características das vias aéreas distais. Como a cavidade nasal é acessível, isso a torna um sítio apropriado para se examinar as características do transporte iônico do epitélio respiratório (43,50).

A voltagem máxima é determinada e, a seguir, a resposta elétrica da mucosa nasal à perfusão de drogas e soluções iônicas é captada e registrada. Posteriormente, se verifica se as alterações características dos pacientes com FC estão presentes (43,51,52).

A Tabela 1.2 contém a descrição das cinco etapas do exame de acordo com a diferença de potencial (DP) gerada durante a exposição celular a cada solução instilada, no sujeito sadio e no paciente com FC.

Tabela 1.3 - DP resultante em cada uma das etapas da medida de DPN de acordo com solução instilada, no sujeito sadio e no paciente com FC.

	DP NO SUJEITO SADIO	PACIENTE COM FC
Solução 1 BASAL	entre -15 e -25mV A absorção de Na <sup>+</sup> através do canal ENaC gera uma DP basal negativa.	2 a 3 vezes maior Como a CFTR é ausente ou precariamente funcionante, ela deixa de inibir o ENaC e ocorre hiperabsorção de Na <sup>+</sup> extracelular. Hiperpolarização.
Solução 2 AMLORIDA	-10 e 0 mV A amilorida bloqueia o transporte direto de sódio através da inibição do canal ENaC. Ocorre a despolarização, isto é, a superfície epitelial fica menos negativa já que o transporte de Na <sup>+</sup> pelo canal ENaC é reduzido.	A variação da DP é muito mais acentuada já que a DP basal é inicialmente maior. Maior despolarização
Solução 3 ZERO CLORO	por volta de -15mV O epitélio nasal exposto a um meio pobre em Cl <sup>-</sup> é estimulado indiretamente a secretar Cl <sup>-</sup> , seja pelos canais CFTR seja por outros canais como o CaCC. O resultado é uma rápida e elevada hiperpolarização – a superfície epitelial fica mais negativa.	algo mais negativo Dependendo do grau de função residual de CFTR que cada paciente apresenta, pode-se observar discreta e passageira polarização. Pouca ou nenhuma resposta ao estímulo indireto a secreção de Cl <sup>-</sup> .
Solução 4 ISOPROTERENOL	ao redor de -20 a -30mV O canal CFTR é ativado pelo AMPc. O isoproterenol é um agente disponibilizador intracelular de AMPc. O transporte de Cl <sup>-</sup> mediado especificamente pela CFTR é estimulado farmacologicamente.	não varia Sem canal CFTR funcioante, não ha secreção de Cl <sup>-</sup> após o estímulo com isoproterenol. Observa-se um platô no gráfico. Nenhuma resposta ao estímulo direto a secreção de Cl <sup>-</sup> .
Solução 5 ATP	Pico O ATP ativa os canais de Cl <sup>-</sup> alternativos, resultando em hiperpolarização independente de CFTR.	por volta de -40 mV Como o ATP estimula canais não de Cl <sup>-</sup> não-CFTR, ocorre secreção desse íon e portanto, Hiperpolarização súbita e acentuada.

(Adaptado de Rowe, 2011 e Vermeulen, 2011)

Devido à ausência da proteína CFTR ou a sua disfunção, ocorrem duas alterações na medida de DPN consideradas características de FC (Figura 1.6):

- hiperpolarização basal, duas a três vezes maior que o normal
- ausência ou mínima resposta aos estímulos indiretos e diretos a secreção de Cl<sup>-</sup>

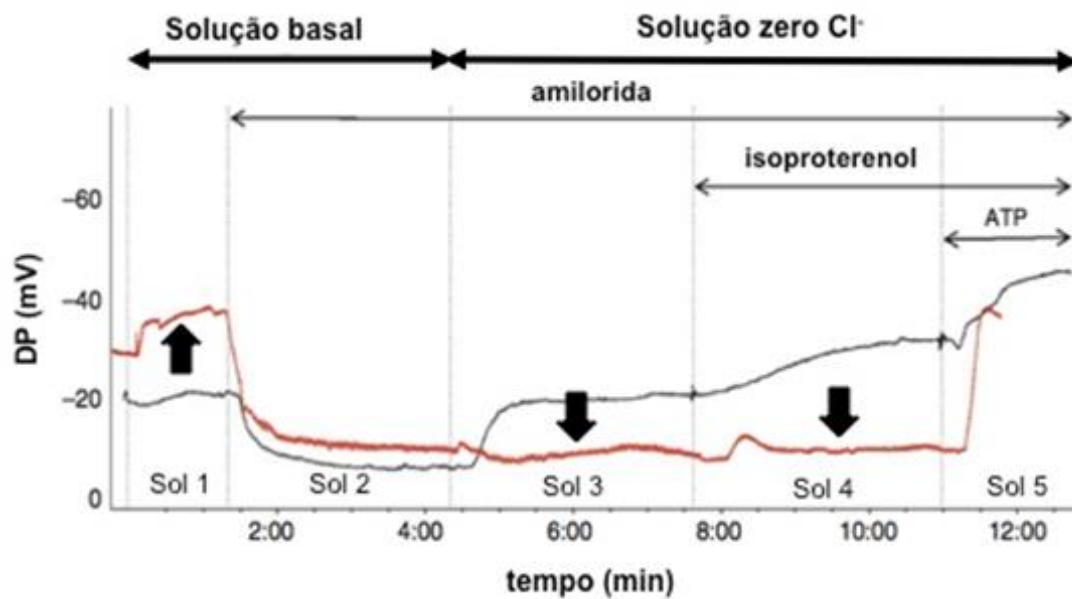


Figura 1.6: Exemplos de traçados de DPN em indivíduo normal (preto) e em paciente com FC (vermelho). As setas horizontais se referem a composição inicial das soluções a aos fármacos que lhe são adicionados sequencialmente, para a composição das soluções instiladas. As etapas do teste estão separadas por linhas verticais tracejadas, com as respectivas soluções discriminadas de 1 a 5. A seta apontando para cima destaca a hiperpolarização basal e as setas apontando para baixo destacam a ausência de resposta aos estímulos indireto e direto a secreção de  $\text{Cl}^-$ , alterações características da FC (retirado e adaptado de Rowe, 2011)

A análise dos parâmetros da DPN ocorre após a verificação de qualidade mínima dos traçados – variação inferior a 1mV na DP, durante os 30 segundos finais de cada etapa. Os principais parâmetros utilizados na interpretação do teste encontram-se listados a seguir e demonstrados graficamente na Figura 1.7. Os dois primeiros são relativos ao transporte de  $\text{Na}^+$  e o último ao transporte de  $\text{Cl}^-$ :

- $\text{DP}_{\text{máx}}$ : DP máxima é a DP obtida ao final da perfusão com solução basal de ringer;
- $\Delta_{\text{amil}}$ : delta amilorida representa a variação da DP decorrente da perfusão da solução amilorida;

- TCR (*total chloride response*): a resposta total ao cloreto, refere-se a soma das variações na DP observadas após a perfusão das soluções zero-Cl<sup>-</sup> e isoproterenol.

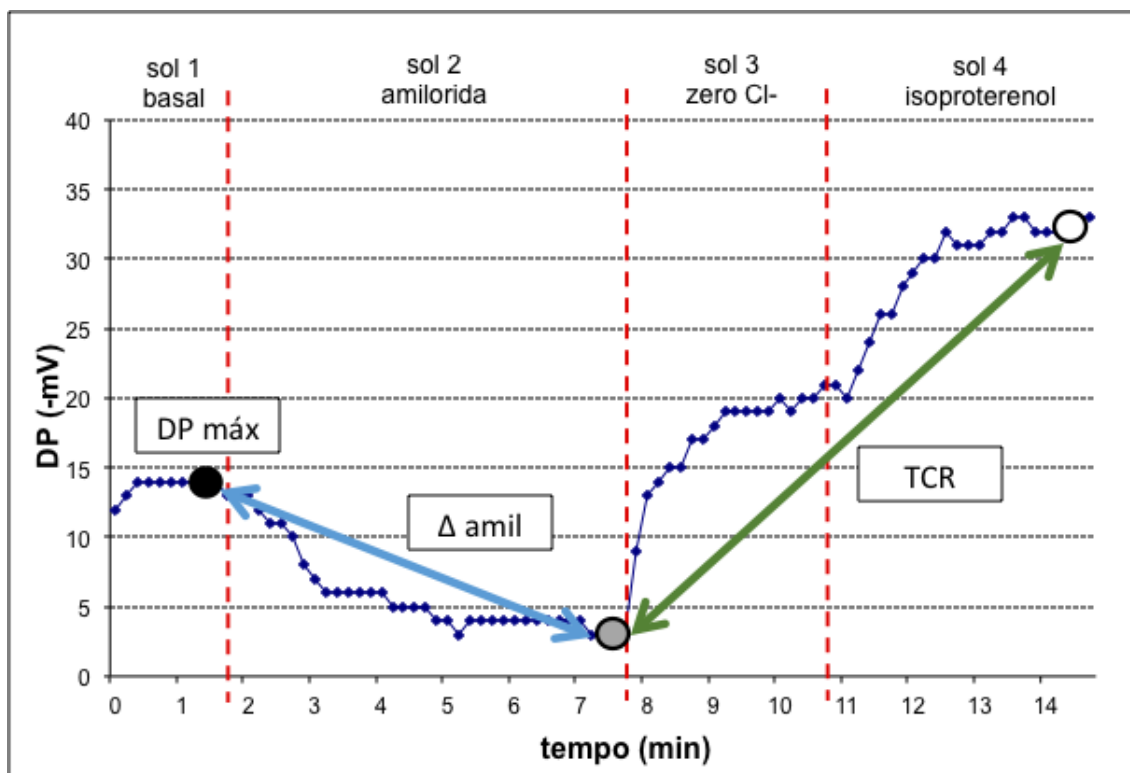


Figura 1.7 - Os principais parâmetros utilizados na interpretação da DPN representados no traçado de um exame realizado num sujeito normal no INSMCAFF. O ponto preto corresponde ao valor de diferença de potencial basal máxima - DPmáx. A seta azul representa a variação na DP após a perfusão da solução amilorida -  $\Delta$ amil. A seta verde representa a variação na DP após a perfusão das duas soluções (zero Cl<sup>-</sup> e isoproterenol) que estimulam a secreção de Cl<sup>-</sup>-TCR.

Os escores diagnósticos propostos por Wilschanski e cols e Sermet e cols. (53,54) são aplicados com o objetivo de discriminar numericamente os resultados da DPN compatíveis ou não com a FC.

$$\text{Wilschanski index} = e^{\frac{TCR}{\Delta\text{amil}}}, \text{ FC se } >0,7$$

$$\text{Sermet score} = (-(0,11 \times TCR) - (0,05 \times \Delta\text{amil})), \text{ FC se } \leq 0,27$$

A medida da DPN é um exame complementar ao teste de suor no diagnóstico da FC, indicado principalmente em pacientes com testes inconclusivos. É importante também nas avaliações da relação genótipo x fenótipo (55). Por ser a única medida *in vivo* capaz de avaliar separadamente o transporte epitelial de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , a DPN é utilizada como biomarcador (56) em ensaios clínicos multicêntricos envolvendo drogas moduladoras, direcionadas ao defeito básico de transporte de íons da FC (57-60).

Ao longo das últimas décadas a técnica da medida da DPN foi sendo implementada para fins diagnósticos em diversos centros de referência, com a utilização de diferentes protocolos (4,43,51,52,61). A necessidade de amostra de pacientes para os ensaios clínicos suscitou a necessidade de padronização da técnica para que a comparabilidade dos resultados intercentros fosse possível. Durante o projeto *EuroCareCF*, representantes europeus, israelenses e australianos analisaram os procedimentos operacionais padrões de nove centros e criaram um protocolo único da técnica da medida da DPN, que inclui desde equipamentos aos procedimentos para o controle de qualidade e a interpretação dos valores. (43,50).

A qualidade e confiabilidade do teste é altamente dependente de pessoal especificamente treinado e capacitado para a realização da técnica. Mesmo seguindo os protocolos, alguns problemas podem ser encontrados. As fontes de variabilidade do teste da DPN são numerosas e principalmente a DP varia de acordo com a localização do ponto escolhido para a sua aferição na cavidade nasal (49,61).

Os riscos da DPN são mínimos. As doses de amilorida e isoproterenol utilizadas topicamente estão bem abaixo das concentrações farmacologicamente ativas (52,62). Caso o eletrodo de controle seja posicionado no subcutâneo, pode haver sensação dolorosa no momento da inserção da agulha no antebraço. Durante o posicionamento do cateter Marquat® no assoalho da cavidade nasal, sensação de prurido local ou espirros podem ser relatados, porém cessam após sua fixação.



### 1.3 Detalhamento metodológico

#### 1.3.1 Artigo 1: “Desafios no processo diagnóstico da fibrose cística no Brasil”

Desenho do estudo:

Trata-se de uma revisão da literatura narrativa e crítica de caráter descritivo-discursivo com uma visão abrangente sobre o processo diagnóstico da FC.

O critério de busca de artigos foi implementado em quatro eixos temáticos: programas de triagem neonatal, processos diagnósticos, o cenário brasileiro e inovações tecnológicas no campo diagnóstico (Figura 1.8).

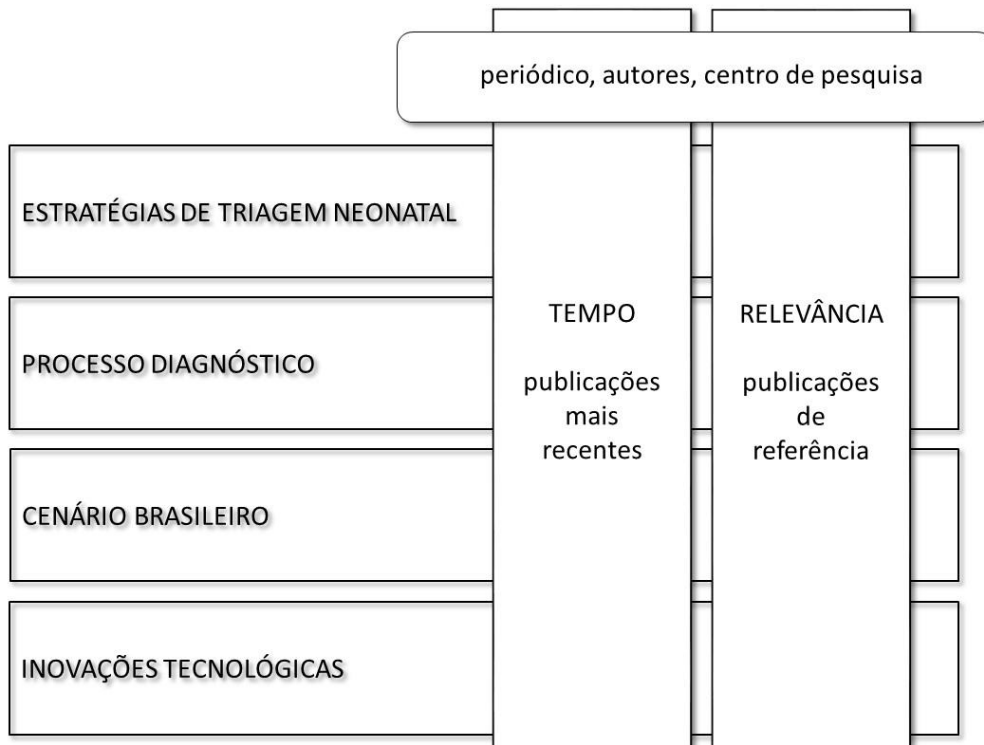


Figura 1.8 – Critérios de busca por eixos temáticos.

Dentro de cada eixo temático foram trabalhados eixos transversais para selecionar os artigos de interesse: (1) fator temporal: publicações mais recentes; (2) fator relevância: publicações de referência nos eixos temáticos – diretrizes e protocolos (*guidelines*).

A seguir, os artigos inicialmente selecionados foram submetidos a nova etapa de seleção, sendo avaliados de acordo com os seguintes elementos de qualidade: fator de impacto do periódico, local de realização e grupos de pesquisa ou autores incluídos na autoria.

A busca aos artigos e publicações foi realizada em bases de dados eletrônicas (Pubmed, Scielo, sites de sociedades civis e do governo do Brasil), mas também foram decorrentes de referências cruzadas.

No arcabouço dessa estrutura matricial os achados, por cada eixo temático, foram apresentados e discutidos nas seções da revisão. Ao final produziu-se a síntese conclusiva.

### 1.3.2 Artigo 2: “*Repeatability and diagnostic value of nasal potential difference in a genetically admixed population*”

#### Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal prospectivo numa amostra de conveniência hospitalar realizado entre 2009 e 2010. O desenho previa a realização de no mínimo um exame por participante, podendo ser repetido de acordo com sua aceitação e disponibilidade. Como se tratava de uma técnica

delicada, complexa e passível de incorreções, suas medidas seriam avaliadas e se necessário, o exame deveria ser repetido em data de conveniência do voluntário, com intervalo mínimo de um dia.

#### Local e população do estudo

O estudo foi realizado no IFF, centro de referência (CR) pediátrico em FC do estado do Rio de Janeiro. As soluções foram preparadas em colaboração com BioManguinhos, na Seção de Soluções e Diluentes. Ao todo 78 sujeitos participaram, distribuídos em 3 grupos - pacientes com FC (FC), pacientes sem FC (não FC) e controles sadios (CS). Os critérios de seleção e de inclusão em cada grupo foram:

- (1) grupo FC (n=11): pacientes com 2 TS, com mutações de FC identificadas nos dois alelos e vinculados ao CR de FC do IFF;
- (2) grupo não FC (n=19): pacientes com outros diagnósticos que não a FC, vinculados ao ambulatório de Pneumologia Pediátrica do IFF;
- (3) grupo VS (n=48): sujeitos sadios, sem vínculo assistencial no IFF e sem relato de doença respiratória ou digestiva.

Os TS e as análises genéticas já haviam sido realizados anteriormente, no próprio IFF e no Laboratório de Genética Humana do Instituto Oswaldo Cruz/IOC/FIOCRUZ, respectivamente. O fluxograma da Figura 1.9 ilustra como foi realizada a seleção dos pacientes FC.

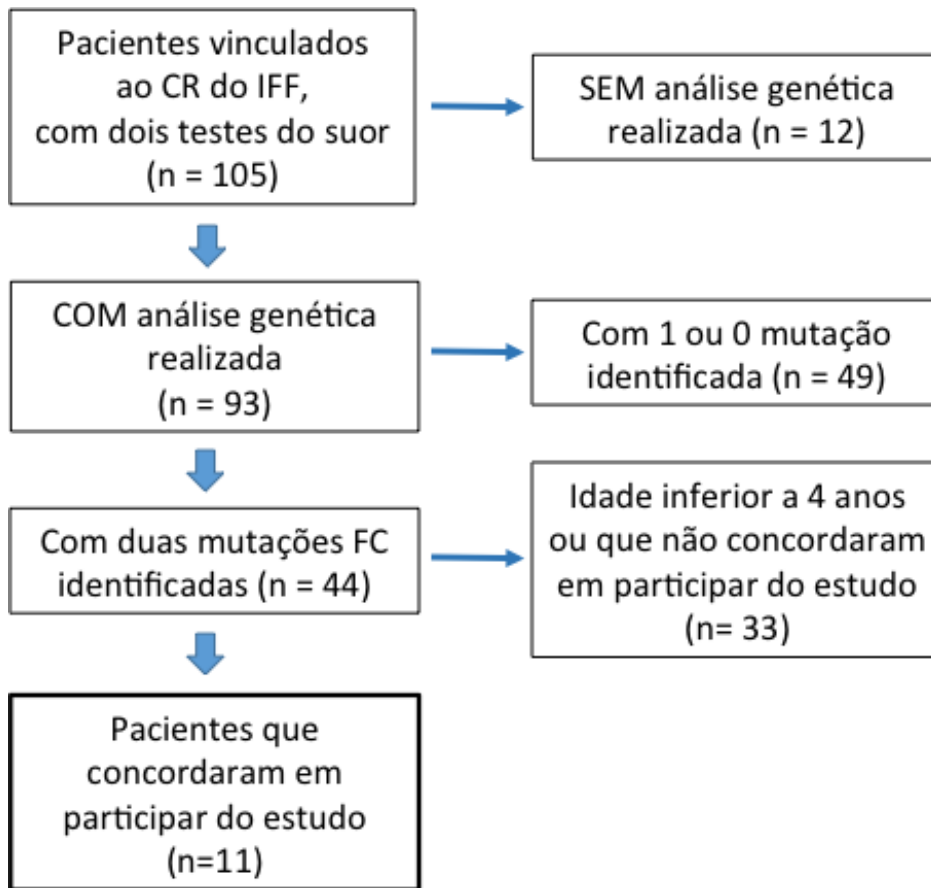


Figura 1.9 – Fluxograma de seleção dos pacientes do grupo FC.

Os critérios de exclusão usados foram as contra-indicações da DPN: história de cirurgia nasal prévia, presença de pólipos nasais, tabagismo, gestação ou amamentação. A presença de rinite aguda e/ou infecção aguda de vias aéreas, demandaram o adiamento do exame por no mínimo quatro semanas. O uso de medicação não constituiu um critério de exclusão, foram observados intervalos mínimos entre sua administração e o exame, e o registro de tais fármacos foi realizado.

#### Técnica do teste da medida da DPN

Todas as medidas da DPN foram realizadas por um único examinador, previamente capacitado na realização da técnica segundo o protocolo de Leal

e cols. (52).

Eletrodos de controle e de aferição (eletrodos Ag/AgCl da *SLE instruments*, South Croydon, Grã-Bretanha), posicionados nesses dois sítios, são conectados ao voltímetro (Knick Portamess® 913, *Elektronische Meßgerate*, Berlim, Alemanha) de alta impedância ( $>10^{12} \Omega$ ) que afere e armazena os valores de DPN a cada 10 segundos. O eletrodo de aferição é inserido na extremidade distal de uma sonda vesical duplo-lumen (Rusch, número 6, 100% silicone) cujo primeiro lumen é preenchido com creme de contato de eletrodo diluído (Signa *cream*/Ringer lactato 1:1 v/v) e o segundo lumen é perfundido por diferentes soluções de acordo com o protocolo. A impedância do eletrodo é  $<10^3 \Omega$ . O eletrodo de controle é coberto com creme condutor e colocado em contato com o epitélio levemente escarificado do antebraço. Essa escarificação é realizada por uma unidade motorizada portátil com uma broca dentária (Hi Di 541M, *Ash Instruments*, Plymouth, Grã-Bretanha). O eletrodo de aferição é introduzido na narina no sentido infero-medial ao longo do assoalho nasal e fixado geralmente a 2-4cm do corneto anterior, no local com voltagem mais estável e negativa aferida. O ponto zero dos eletrodos é determinado antes e depois das aferições. Valores de DPN são registrados e transferidos para um computador através de um cabo de interface e do programa (Paraly SW 105®).

A solução salina isotônica consiste em (mM): NaCl 140, KCl 4, MgCl<sub>2</sub>, N-[2-hidroxietil]-piperazina-n'-[2-ácido sulfônico etano] (HEPES) 10 e glicose 10. Uma solução considerada zero Cl<sup>-</sup> é preparada substituindo NaCl e KCl por gluconato equimolar, resultando numa concentração final de Cl<sup>-</sup> de 6mM

(302mOsm/l). As concentrações finais de amilorida e isoproterenol são 100 e 10 $\mu$ M, respectivamente. Todos os sais são da marca Sigma Chemical Co, St Louis, MI, EUA. O pH de todas as soluções é fixado em 7,4. As soluções são filtradas (filtro de seringa Acrodisc 0,2 $\mu$ m, Pall Co, Ann Harbor, MI, EUA) antes do uso e armazenadas em frascos estéreis.

Durante a instilação das soluções o paciente permanece sentado numa cadeira de flebotomia, com o tórax reclinado para trás. As soluções são aquecidas em banho-maria, enquanto bombas peristálticas (Miniplus II, Gilson, Villiers le Bel, France) determinam seu gotejamento na faringe numa velocidade constante de 3ml/min, para serem posteriormente deglutidas

Ao se instilar a solução basal (1), aguarda-se a estabilização da DP máxima durante, no mínimo, 1 minuto. Em sequência, as demais soluções são instiladas: amilorida em solução basal (2), amilorida em solução de zero Cl<sup>-</sup> (3) e isoproterenol e amilorida em solução de zero Cl<sup>-</sup> (4). Cada etapa tem duração aproximada de 3 a 5 minutos.

O valor de DP (-mV) representante de cada fase do exame é obtido da seguinte maneira: etapas 1, 3 e 4 = maior valor absoluto final, da etapa 2 = menor valor absoluto final. A qualidade dos traçados é baseada na presença de estabilidade dos valores de DP, isto é, registro do mesmo valor durante 30 segundos.

#### Análise estatística

Um segundo observador foi responsável pela identificação numérica randomizada de cada exame. A análise das variáveis foi realizada de maneira

cega para as condições dos indivíduos que se submeteram ao exame.

Os traçados obtidos e os principais parâmetros da DPN foram inicialmente explorados no programa Excel®. A descrição e comparação dos parâmetros foram feitos pela ANOVA e por testes não paramétricos enquanto a reprodutibilidade foi verificada pelo teste de Bland-Altman. A apresentação gráfica e a análise dos resultados dados foram realizadas no programa SPSS versão 22.

### Considerações éticas

Este projeto foi registrado no Departamento de Pesquisa do IFF e submetido à apreciação do Comitê de Ética do IFF, com CAAE (certificado de apresentação para apreciação ética) nº 0037.0.008.000-06. O projeto foi aprovado em 18/08/2006 através do parecer consubstanciado (Anexo 1).

De forma clara e detalhada, o pesquisador explicou aos voluntários e seus responsáveis legais, a finalidade, a natureza e a relevância do projeto de pesquisa. Alguns pontos foram ressaltados nessa explanação: 1. a participação se daria de forma voluntária, 2. o consentimento poderia ser suspenso a qualquer momento, 3. em hipótese alguma qualquer resposta negativa a sua inclusão no estudo afetaria a assistência recebida no IFF. No caso de concordância em participar do estudo, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) previamente aprovado pelo CEP/IFF, foi assinado pelo próprio voluntário ou por seu responsável legal (Apêndices 1 e 2). O resultado de cada exame foi disponibilizado ao respectivo voluntário.

Os pesquisadores se comprometeram a cumprir os temas descritos na

Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - Diretrizes e Normas Regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos (63). O projeto foi conduzido segundo as normas de boas práticas clínicas garantindo a segurança do sujeito da pesquisa e a qualidade dos dados.



## 1.4 Referências

1. Farrell PMP, Rosenstein BJB, White TTB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J*. 2008;153(2):S4–14.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria nº 983, de 27 dezembro de 2011. Brasília, 2011a. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2011/prt0983\\_27\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2011/prt0983_27_12_2011.html) Acesso em 27/09/2015.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria nº 745, de 22 dezembro de 2005. Brasília, 2005. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2005/PT-745.htm>. Acesso em 27/09/2015.
4. Solomon GM, Konstan MW, 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):919–28.
5. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem* [Internet]. The Canadian Society of Clinical Chemists 2012;45(15):1132–44.
6. O’Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009;373(9678):1891–904.
7. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, et al. Lumacaftor–lvacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015.
8. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med* 2015;277(2):155–66.
9. Quinton P. Physiological Basis of Cystic Fibrosis: A Historical Perspective. *Physiol Rev* 1999;79(1):S3–22
10. Davis PB. Cystic Fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:475-482.

11. Collie JTB, Massie RJ, Jones O a H, Legrys V a., Greaves RF. Sixty-five years since the New York heat wave: Advances in sweat testing for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2014;49(2):106–17.
12. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959;23:545-9.
13. FitzSimmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J Pediatr* 1993;122(1):1–9.
14. Knowles, Michael, John Gatzky, and Richard Boucher. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine* 1981; 1489-1495.
15. Quinton, Paul M. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 1983; 421-422.
16. Kerem, B. S., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., & Tsui, L. C. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245(4922), 1073-1080.
17. Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B. S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z. & Chou, J. L. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245(4922), 1066-1073.
18. Alton EW, Currie D, Logan-Sinclair R, Warner JO, Hodson ME, Geddes DM. Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. *Eur Respir J Off J Eur Soc Clin Respir Physiol* 1990;3(8):922–6.
19. Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC, Al KET. In Vivo Nasal Potential Difference: Techniques and Protocols for Assessing Efficacy of Gene Transfer in Cystic Fibrosis. *Human gene therapy* 1995; 445-455.
20. Massie, R. J., Curnow, L., Glazner, J., Armstrong, D. S., & Francis, I. Lessons learned from 20 years of newborn screening for cystic fibrosis. *Med J Aust* 2012;196(1), 67-70.
21. Sosnay, P. R., Siklosi, K. R., Van Goor, F., Kaniecki, K., Yu, H., Sharma, N. & Cutting, G. R. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature genetics* 2013;45(10), 1160-1167.

22. Paranjape SM, Zeitlin PL. Atypical cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;35(3):116–23.
23. Santos GPC, Domingos TM, Wittig EO, Riedi CA, Rosário NA. Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. *J Pediatr* 2005;81: 240-244.
24. Reis F, Melo SO, Vergara AA. Programa de triagem neonatal para fibrose cística de Minas Gerais (PETN-FC): aspectos clínicos e laboratoriais. Tema livre. I Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, São Paulo. *J Bras Pneumol* 2006;32(Suppl 1)1.
25. Honorio LFO, Neto NL, Barbosa E et al. Avaliação da triagem neonatal para fibrose cística no Estado de Santa Catarina. Tema livre. I Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, São Paulo. *J Bras Pneumol* 2006; 32 (Suppl 1) 1.
26. Cabello Hum Biol Cystic Fibrosis - Low frequency of DF508 mutation in 2 Population samples from Rio de Janeiro - Brazil. *Human Biology* 1999; 189-196.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvrj.def>. Acesso em 27/09/2015.
28. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67:117-133.
29. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis: mechanisms of disease. *N Engl J Med* 2005;352:1992-2001.
30. Viel M, Leroy C, Hubert D, Fajac I, Bienvenu T. ENa $\beta$  and  $\gamma$  genes as modifier genes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2008;7:23-29.
31. Quinton PM. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology* 2007;22:212–25.
32. 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):220–6.

33. Middleton PG, House HH. Measurement of airway ion transport assists the diagnosis of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2010;45(8):789–95.
34. 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;46:145-152.
35. Kerem E. Mutation specific therapy in CF. *Paediatr Respir Rev* 2006;7 Suppl 1:S166–9.
36. Castellani C. CFTR2: How will it help care? *Paediatric Respiratory Reviews* 2013;4–7.
37. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006;61(7):627–35.
38. LeGrys V a., Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ. Diagnostic Sweat Testing: The Cystic Fibrosis Foundation Guidelines. *J Pediatr* 2007;151(1):85–9.
39. CLSI. Sweat testing: sample collection and quantitative analysis: approved guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2009.
40. Webster, H. Lewis. Laboratory diagnosis of cystic fibrosis. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 1983;18.4:313.
41. Multi Disciplinary Working Group. Guidelines for the performance of the sweat test for the investigation of cystic fibrosis in the UK, 1<sup>st</sup> edition. Multi Disciplinary Working Group: 2003.
42. The AACB sweat test working party. Australian guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Biochem Rev* 2006;27:S1-S7.
43. De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I, Sermet I, et al. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros. European Cystic Fibrosis Society* 2011;10(SUPPL. 2):S53–66.
44. Orenstein DM, Rosenstein BJ, Stern RC. Cystic fibrosis medical care. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

45. Goubau C, Wilschanski M, Skalická V, Lebecque P, Southern KW, Sermet I, et al. Phenotypic characterisation of patients with intermediate sweat chloride values: towards validation of the European diagnostic algorithm for cystic fibrosis. *Thorax* 2009;64(8):683–91.
46. CFMDB – *Cystic Fibrosis Mutation DataBase* – Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/app>. Acesso em 27/09/2015.
47. CFTR2 - *Clinical and functional translation of CFTR* - Disponível em: <http://cftr2.org>. Acesso em 27/09/2015.
48. Dequeker E, Stuhmann M, Morris M a, Casals T, Castellani C, Claustres M, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009;17(1):51–65.
49. 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(11):2050–6.
50. Rowe SM, Clancy JP & Wilschanky M. Nasal potential difference measurements to assess CFTR ion channel activity. Amaral MD, Kunzelmann K (eds). *Cystic Fibrosis. Methods in molecular biology* 2011;Chapter 6.69-86.
51. Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC, Al KET. In Vivo Nasal Potential Difference: Techniques and Protocols for Assessing Efficacy of Gene Transfer in Cystic Fibrosis. *Human gene therapy* 1995; 445-455.
52. Leal T, Lebacq J, Lebecque P, Cumps J, Wallemacq P. Modified method to measure nasal potential difference. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(1):61–7.
53. 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 Off J Eur Soc Clin Respir Physiol* 2001;17(6):1208–15.
54. Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Sands D, Stremmler N, Vavrova V, Deneuille E, 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(7):929–36.

55. Leal T, Fajac I, Wallace HL, Lebecque P, Lebacq J, Hubert D, et al. Airway ion transport impacts on disease presentation and severity in cystic fibrosis. *Clin Biochem* 2008;41(10-11):764
56. De Boeck K, Kent L, Davies J, Derichs N, Amaral M, Rowe SM et al. CFTR Biomarkers: time for promotion to surrogate endpoint? *European Respiratory Journal* 2012; erj00575-2012.
57. Accurso, F. J., Rowe, S. M., Clancy, J. P., Boyle, M. P., Dunitz, J. M., Durie, P. R. & Ramsey, B. W. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *New England Journal of Medicine* 2010; 363(21), 1991-2003.
58. Sloane PA & Rowe SM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2010;16:591-597.
59. Clancy JP, Jain M. Personalized medicine in cystic fibrosis: dawning of a new era. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(7):593–7.
60. Leonard A. Comparative Variability of Nasal Potential Difference Measurements in Human and Mice. *Open J Respir Dis* 2012;02(02):43–56.
61. Schüler D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Ballmann M, Dechaux M, Edelman A, et al. Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *J Cyst Fibros* 2004;3(SUPPL. 2):151–5.
62. Southern KW, Noone PG, Bosworth DG, Le Brys VA, Knowles MR, Barker PM. A modified technique for measurement of nasal transepithelial potential difference in infants. *J Pediatr* 2001;139:353-358.
63. Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS nº 466, de 12 dezembro de 2012. Brasília, 2012. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>. Acesso em 27/09/2015.

**2.1 Artigo 1:** “Desafios no processo diagnóstico da fibrose cística no Brasil”

**2.2 Artigo 2:** “*Repeatability and diagnostic value of nasal potential difference in a genetically admixed population*”

## 2.1 Artigo 1

**Título:** Desafios no processo diagnóstico da fibrose cística no Brasil

**Palavras-chaves:** triagem neonatal; diagnóstico; diferença de potencial nasal; Brasil.

### **Resumo**

**Introdução:** A triagem neonatal levou a criação de uma nova coorte de pacientes, assintomáticos ao diagnóstico. Apesar do grande avanço no conhecimento sobre a fibrose cística, o número de diagnósticos inconclusivos vem crescendo. A conclusão diagnóstica ainda representa um dos maiores desafios para clínicos e geneticistas e, portanto, inovações tecnológicas envolvendo testes diagnósticos vêm sendo realizadas.

**Objetivos:** Analisar as evidências na literatura sobre as estratégias para a triagem e diagnóstico de FC. Analisar os processos de triagem e de diagnóstico no cenário brasileiro. Realizar a prospecção de novas tecnologias diagnósticas.

**Método:** Trata-se de uma revisão narrativa e crítica da literatura, de caráter descritivo e discursivo. A análise abrangente foi baseada em quatro eixos temáticos, na qual a busca por publicações foi realizada em bases de dados eletrônicas ou foi decorrente de referências cruzadas.

**Resultado:** As estratégias de TN utilizadas ao redor do mundo diferem entre si, pois sua escolha deve ser baseada nas características genéticas da população, no sistema de saúde e nas condições sócio-econômicas locais. A estratégia que adota duas dosagens da tripsina imunorreativa é adequada para países com grande miscigenação como o Brasil, porém depende da coleta de 2 amostras de sangue, o que propicia maior taxa de perda. As estratégias que incluem a análise genética são as mais utilizadas no mundo, porém estão associadas a identificação elevada de carreadores, demanda aumentada de teste do suor e de assistência em centro de referência para um número maior de lactentes com diagnósticos inconclusivos. A maioria das inovações tecnológicas no diagnóstico de FC capta as alterações provocadas na fisiologia do suor pela disfunção da proteína CFTR.

**Conclusão:** Existe uma crítica nos estudos que descreveram estratégias que incluem a análise genética na TN no sentido de avaliar o custo efetividade de opções que possam reduzir os desfechos indesejados. Há indicações de que os programas de triagem neonatal incluirão o teste das proteínas associada a pancreatite em suas estratégias. No atual estágio tecnológico do SUS, a estratégia que inclui duas dosagens de tripsina imunorreativa é a mais adequada, pois não existe um painel de mutações para a análise genética que responda ao grau de diversidade da população brasileira. Novas tecnologias diagnósticas que possam ser realizadas em lactentes são necessárias.



**Title:** Challenges in cystic fibrosis diagnosis process in Brazil

**Keywords:** newborn screening; diagnosis; nasal potential difference; Brazil.

### **Abstract**

**Introduction:** The newborn screening led to the creation of a new cohort of patients, asymptomatic to the diagnosis. Despite the great advance in the knowledge about cystic fibrosis, the inconclusive number of diagnosis increased. The diagnostic conclusion still represents one of the biggest challenges for clinicians and geneticists and therefore technological innovations involving diagnostics tests have been performed.

**Objectives:** This study aimed to analyze the evidences in the literature about the strategies for the newborn screening and diagnosis of CF. Aimed also to analyze the screening processes and diagnosis in the Brazilian scenario and to carry out the search for new diagnostic technologies.

**Method:** It was made a narrative and critical literature review, with a descriptive and discursive character. The comprehensive analysis was based on four thematic axes, in which the search for publications was made in electronic databases or was due of the cross-references.

**Result:** The NBS strategies utilized around the world differ from each other, because their choice has to be based on genetic characteristics of the population, in the health system and the local socio-economic conditions. The strategy that adopted two doses of immunoreactive trypsin is suitable for the countries with great miscegenation as Brazil, but it depends of the 2<sup>nd</sup> blood samples collection, which provides a higher rate of loss. The strategies that include the genetic analysis are the most used in the world, however they are associated with the high identification of scaffolds, increase in the sweat's test and the assistance in a reference center for a greater number of infants with inconclusive diagnostics. The majority of the technological innovations in the FC diagnosis addresses the changes caused in sweat's physiopathology by the CFTR protein dysfunction.

**Conclusion:** There is a critical in the studies that described strategies that include the genetic analysis in NBS in the sense to evaluate the cost-effectiveness of options that can reduce the unwanted effects. There are indications that the newborn screening programs will include the protein's test associated with the pancreatitis in their strategies. In the current technological stage of the SUS, the strategy that includes two doses of immunoreactive trypsin is the most appropriate, because doesn't exist a panel of mutations for the genetic analysis that responds to the degree of diversity of the Brazilian population. New diagnostic technologies that can be performed in infants are required.

## 2.1 Introdução

A fibrose cística (FC) é uma doença genética de transmissão autossômica recessiva, cujo defeito básico é causado por mutações no gene *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que codifica a proteína responsável pelo transporte transmembrana celular de íons e água.

A FC é mais frequente em caucasianos e rara em asiáticos (1). As estimativas de incidência diferem entre as regiões do Brasil (2) devido à sua vasta miscigenação (3). As incidências calculadas pelos dados do Programa de Triagem Neonatal (PTN) foram de 1:9520 nascidos vivos no Paraná (4), 1:9115 em Minas Gerais (5), 1:8776 em Santa Catarina (6).

Avanços no conhecimento do genótipo, fenótipo e fisiopatologia (7) têm provocado constantes mudanças no enfrentamento da FC (8,9,10). A FC era classificada em forma clássica ou típica e forma não-clássica ou atípica (11), porém recentemente, a denominação de doenças relacionadas à CFTR (CFTR-RD) (7,12) foi incluída nos algoritmos diagnósticos.

A expansão dos PTN provocou uma mudança no paradigma (8,13) ao possibilitar o diagnóstico pré-sintomático, o que ocasionou mudanças na classificação diagnóstica, por ex. síndrome metabólica relacionada à CFTR (CRMS) (9), a FC positiva na triagem com diagnóstico inconclusivo (CFSPID) (10) e FC atrasada. Previamente inexistentes, os diagnósticos equivocados após TN positiva chegam a alcançar 10-20%, reverberando na classificação diagnóstica (14).

De acordo com as diretrizes, o diagnóstico se baseia na presença de TN

positiva, características clínicas ou história familiar de FC associadas a identificação de duas mutações no gene *CFTR* ou da disfunção da proteína CFTR, evidenciada principalmente pelo teste do suor (TS) (11,7).

O aumento do número de diagnósticos inconclusivos oriundos dos PTN (12,14) se reveste de maior gravidade em países onde o acesso à prevenção, ao diagnóstico e ao tratamento da doença são desiguais. Os caminhos para implementar tecnologias custo-efetivas e buscar intervenções adequadas à esta realidade são desafios que se sobrepõem. Portanto, este trabalho tem por objetivo buscar as melhores evidências para a realização de triagem neonatal e diagnóstico de FC, analisar as mais efetivas para o Brasil e apresentar novos testes, com ênfase no esclarecimento das incertezas.

## 2.2. Classificação diagnóstica de FC

No século passado a FC era reconhecida como uma doença multissistêmica cujo início das manifestações clínicas ocorria logo ao nascimento ou durante a primeira infância, com comprometimento pondero-estatural e sintomas respiratórios. A manifestação tardia, com comprometimento em um único órgão, era estimada em 2% (15). Nos últimos 25 anos, os PTN se expandiram tal como o conhecimento sobre o gene *CFTR*. Por conseguinte, o espectro fenotípico foi ampliado, com perda dos limites entre a FC e as doenças relacionadas às suas mutações (7,16). Reconhece-se a existência de um espectro contínuo na apresentação da doença indo da forma assintomática até as formas extremamente graves (1,16). A combinação entre as classes das mutações envolvidas, os genes secundários modificadores, a idade do paciente ao diagnóstico e os fatores ambientais, é o

que determina a gravidade da FC (12).

#### Diretrizes sobre o diagnóstico e classificação da FC

Nesta revisão foram utilizados as duas últimas diretrizes que propuseram algoritmos diagnósticos que consolidaram a experiência, organização e estruturação de centros de referência. Eles são baseados nos conhecimentos disponíveis até a sua publicação, portanto os autores são explícitos ao considerar seu caráter não definitivo. Suas recomendações devem ser encaradas como um trabalho em andamento (8).

No primeiro deles, proposto em 2006 pela *European Cystic Fibrosis Society* (ECFS), participaram autores membros do Grupo Europeu de Diagnóstico de FC (*ECFS Diagnostic Working Group*) (11). A segunda diretriz foi proposta em 2008 pela *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF), nos Estados Unidos (7).

As principais discordâncias entre as diretrizes são relacionadas às terminologias e a interpretação de exames. A discrepância na classificação da doença chega a aproximadamente 15% dos casos e na maioria das vezes é causada pela diferença dos pontos de corte nos valores de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) obtidos pelo teste do suor (TS) (16). Ambos consideram TS positivo quando a concentração no suor de  $\text{Cl}^- > 60 \text{ mmol/L}$ , porém discordam em relação aos valores de TS negativo e intermediário. Para a ECFS,  $\text{Cl}^- < 30 \text{ mmol/L}$  é interpretado como TS negativo, independentemente da idade, e valores entre 30 e 60 mmol/L são considerados intermediários (11). A CFF considera 40mmol/L como ponto de corte entre valores negativos e intermediários. No entanto, esse limite passa para 30 mmol/L, quando se refere a lactentes

menores de 6 meses (7).

Na ECFS a classificação da FC é baseada no TS. É considerada clássica ou típica quando o  $Cl^- > 60 \text{ mmol/L}$ , tendo, geralmente, comprometimento multissistêmico - doença sino-pulmonar crônica, anormalidades gastrointestinais, desnutrição, síndromes perdedoras de sal e azoospermia obstrutiva. A FC não clássica, ou atípica, ou doença relacionada à disfunção de CFTR, ocorre quando valores de  $Cl^- < 60 \text{ mmol/L}$  e expressão fenotípica leve ou até mesmo monossistêmica, estão associados a identificação de duas mutações causadoras de FC ou à medida de DPN alterada (11). A FC é improvável caso o  $Cl^-$  no suor se encontre entre 30-60mmol/L, duas mutações causadoras de FC não tenham sido identificadas, mesmo após o sequenciamento genético, e a medida de DPN não tenha evidenciado disfunção na proteína CFTR (11,12,17). Na CFF, a presença de duas mutações causadoras de FC confirma o diagnóstico, mesmo na ausência TS positivo (7).

Nas doenças relacionadas à CFTR - CFTR-RD os indivíduos apresentam sintomatologia de FC, porém não preenchem os critérios diagnósticos de FC, ou seja, os valores de  $Cl^- < 60 \text{ mmol/L}$  estão associados à identificação de, no máximo, uma mutação causadora de FC (12). A classificação da FC não clássica (11) se confunde a de CFTR-RD (7). Para diferenciá-las, a CFF e a ECFS consideram a idade do paciente e o número de sistemas acometidos. Então, na FC não clássica são incluídas as crianças com fenótipos leves, que podem vir a apresentar testes positivos no futuro e definir o diagnóstico e na CFTR-RD são incluídos os adultos com apresentação monossistêmica (12).

O processo diagnóstico tornou-se mais complexo e um novo dilema surgiu durante o seguimento de uma coorte de bebês e crianças que não preenchiam os requisitos de diagnóstico apesar de apresentar testes de triagem positivos (18). São os chamados “diagnósticos equivocados”, falsos-positivo da TN (8-10). Os autores norte-americanos utilizam a denominação de síndrome metabólica relacionada à CFTR - *CFTR-related metabolic syndrome* (CRMS) quando desejam se referir aos lactentes assintomáticos com hipertripsinogenemia, apresentando TS com valores intermediários em pelo menos duas ocasiões e a identificação de nenhuma ou somente 1 mutação causadora de FC na análise genética expandida, ou TS- e duas mutações identificadas, sendo no máximo uma delas causadora de FC (9). O termo CRMS tem codificação que torna possível o acesso à assistência médica nos EUA (9,18). Enquanto na Europa preferem a nomenclatura “diagnóstico inconclusivo de FC com triagem positiva” - *Cystic Fibrosis Positive Screening Inconclusive Diagnosis* (CFPSID), por considerá-la mais esclarecedora para os pais (10).

Muito se tem discutido sobre o desfecho, a longo prazo, desses lactentes que apresentaram triagem positiva sem a conclusão diagnóstica. (7,19). Os resultados de TS são intermediários em pelo menos 10% dos pacientes com TN positiva. Em 90% dos lactentes com somente uma mutação identificada, o TS é negativo e portanto, são considerados carreadores (14). Existem, no entanto, aqueles 8-10% de pacientes nos quais o diagnóstico é confirmado posteriormente e cuja recente classificação proposta é de FC tardia - *Delayed CF*.

Numa doença de tamanha complexidade, as controvérsias relacionadas

às suas definições e classificações diagnósticas são esperadas (18). O grupo europeu vai além ao afirmar ser impossível dispor de somente um algoritmo diagnóstico adequado tanto para os pacientes com suspeita clínica quanto para os lactentes provenientes da TN (17).

### 2.3 Triagem neonatal

Os PTN são uma das maiores e mais bem-sucedidas iniciativas da saúde pública dos últimos 45 anos (20), conseguindo postergar a morbimortalidade decorrente do atraso do diagnóstico (21). A FC foi incluída nos PTN em 1979 e estes foram se expandindo gradualmente pela Austrália, Canadá e países da Europa. Todavia, só após 1989, quando o gene *CFTR* e as mutações mais frequentes foram identificados, que os PTN se difundiram com maior velocidade (1). Desde então alguns países desenvolvidos passaram a adotar a análise genética na segunda etapa dos PTN (22).

#### Programa Nacional de Triagem Neonatal

A Portaria Ministerial N°822 (06/06/2001) criou o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) onde estava incluída a FC (23) ([http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822\\_06\\_06\\_2001.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822_06_06_2001.html)) O PNTN requer do SUS uma estruturação ampla e complexa, na qual a coleta de sangue constitui apenas a primeira etapa. A dimensão continental do Brasil, associada à heterogeneidade demográfica, étnica, cultural, política, econômica e estrutural da saúde, faz com que todas as etapas representem um grande desafio a ser vencido para que este programa de saúde pública se torne realmente eficaz (21). É necessária a criação ou a adequação de ampla rede de unidades básicas de coleta, laboratórios especializados e sistemas de

busca ativa de suspeitos, além de estrutura para confirmação diagnóstica, assistência multidisciplinar e acompanhamento de longo prazo dos pacientes diagnosticados em centros de referência (21). Nesta rede, para se evitar falhas de comunicação com os usuários, de coletas e armazenamento das amostras de sangue e para aumentar o comprometimento dos recursos humanos durante a busca ativa (25), é de particular importância tanto a produção de material informativo como a capacitação de recursos humanos (24).

A habilitação dos estados brasileiros para cumprir a fase III do PNTN se iniciou em 2001, no estado do Paraná. Apesar da existência de relatos de sua conclusão em 2013, (26) (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/1083-sas-raiz/dahu-raiz/programa-nacional-de-triagem-neonatal/l2-programa-nacional-de-triagem-neonatal/15204-programas-estaduais-interno>) é reconhecido que o acesso da população de nascidos vivos ao PNTN ainda é muito desigual e a cobertura é variável entre os estados (21).

A crescente participação da PNTN no processo diagnóstico de FC foi descrita pelo Registro Brasileiro de FC de 2012 (REBRAFC). Vale ressaltar que os dados devem ser interpretados com cautela, visto que no REBRAFC a população do registro é somente uma amostra da população que foi diagnosticada e que vem sendo assistida, provavelmente, em centros de referência de 15 estados do país. Por ora só existem dados de incidência para 3 estados. Mesmo assim o REBRAFC apresenta graficamente um crescimento percentual dos diagnósticos oriundos do PNTN, de 29,6% para 47,5% no período de 2009 a 2012 (27) ([http://www.gbefc.org.br/gbefc/Registro\\_Portugues.pdf](http://www.gbefc.org.br/gbefc/Registro_Portugues.pdf)). Este indicador é diferente daqueles apresentados pelos registros nacionais de países como a



Austrália, no qual o PTN existe há 30 anos (28) ([https://www.cysticfibrosis.org.au/media/wysiwyg/CF-Australia/PDF\\_files/40023-ACFDR\\_Annual\\_Report\\_2013vweb.pdf](https://www.cysticfibrosis.org.au/media/wysiwyg/CF-Australia/PDF_files/40023-ACFDR_Annual_Report_2013vweb.pdf)) e nos EUA, onde todos estados realizam a TN desde 2004 (29) ([https://www.cff.org/2013\\_CFF\\_Annual\\_Data\\_Report\\_to\\_the\\_Center\\_Directors.pdf](https://www.cff.org/2013_CFF_Annual_Data_Report_to_the_Center_Directors.pdf)). Seus registros informam o percentual anual de diagnósticos incidentes à partir da TN, que alcançou 70% na Austrália e 60% nos EUA em 2013.

#### Vantagens e desvantagens da TN

As vantagens do diagnóstico precoce, realizado principalmente pela TN (24,30), vão desde a possibilidade de intervenção clínica pré-sintomática, associada ao melhor prognóstico nutricional e cognitivo, até ao melhor custo-efetividade (1,31-33). Evidências clínicas, sociais e econômicas apontam que os PTN devem ser adotados universalmente, inclusive em populações de etnia não-caucasiana, nas quais têm-se observado maior gravidade da doença (33).

Na atualidade se discute a melhor forma de executar os PTN para detectar toda a população em risco de FC. O ideal é que o processo tenha o menor índice possível de falsos-negativo (FN) e que apresente um custo viável (1,34). Dependendo da estratégia utilizada, a TN pode estar associada à diferentes inconvenientes. A ansiedade familiar e resultados falsos-negativos (FP) podem ocorrer em qualquer uma delas. Contudo, as questões mais importantes são relacionadas aos diagnósticos equivocados. Nessas condições, o paciente é submetido ao risco de medicalização desnecessária, e à necessidade de monitoramento em centro de referência (8,10,14,35,36).

## Diversidade de estratégias de TN

Nenhuma estratégia de TN de FC tem aplicação universal, visto que deve ser escolhida de acordo com as características geográficas, raciais e econômicas da população a ser investigada, e de acordo com as prioridades do programa (1,22,36,37).

A grande maioria delas têm em comum a primeira etapa - a dosagem da tripsina imunorreativa (TIR) na amostra de sangue seco colhida entre o segundo e quinto dias de vida (22). A TIR é normalmente secretada no duodeno, mas devido à disfunção da CFTR, em bebês com FC ele fica acumulado nos ácinos pancreáticos, seguindo assim para a corrente sanguínea ao invés de ser liberado na luz intestinal (38). O aumento da TIR perdura até 30-60 dias de vida, tendo alta sensibilidade mas baixa especificidade. Portanto, no mínimo uma segunda etapa de triagem se faz necessária (36).

A quantidade de etapas sugeridas pelas estratégias de TN é variável. Na maioria das vezes, combinam uma ou mais dosagens de TIR com a investigação de mutações e finalizam com o encaminhamento da criança suspeita ao centro de referência, para a definição diagnóstica (22). Vale ressaltar que a TN somente identifica os recém-nascidos em risco para amplo espectro fenotípico, sendo sempre necessária a posterior confirmação diagnóstica por meio do TS, de outro teste que identifique a disfunção da CFTR ou por meio da identificação das mutações no *CFTR* (7,12).

## Estratégias que incluem a análise genética na TN

As estratégias mais utilizadas mundialmente (70%) são as que incluem análise genética, por ex. TIR/DNA, TIR/DNA/TIR e TIR/TIR/DNA (20,22,40). Nestas, a sensibilidade varia de acordo com os valores de pontos de corte da TIR, o painel de mutações utilizado e os procedimentos que visam reduzir as falhas dos programas.

No algoritmo TIR/DNA, diante da primeira dosagem elevada de TIR, as mutações prevalentes são investigadas em uma única amostra de sangue (7,14), tornando o processo mais rápido, com diagnósticos mais precoces. Todavia pressupõe a escolha do painel de mutações mais indicado para a testagem na população envolvida (22). Tal escolha pode ser difícil em populações caucasianas ditas hispânicas (14) e injusta para as minorias étnicas (40). Os painéis comercializados atualmente possibilitam a identificação das 30 mutações mais frequentes nos países ocidentais da Europa (40). Nesses países, permitem a identificação de mutações em 82% dos alelos de pacientes investigados (22). Porém, índices inferiores são esperados em países cuja etnia não descende majoritariamente da Europa (40).

As principais desvantagens das estratégias que incluem a análise genética estão relacionadas a identificação de somente uma mutação causadora de FC: identificação excessiva de heterozigotos sadios, necessidade de aconselhamento genético familiar e questões de paternidade (1).

As estratégias de três etapas buscam reduzir o número de encaminhamentos para a realização de TS e os demais inconvenientes

relacionados ao TIR/DNA, que encarecem o programa e aumentam a ansiedade dos pais (20,35,40).

### Implicações do TIR/DNA no Brasil

Um painel composto de 23 mutações utilizado na TN é capaz de identificar 85% dos alelos afetados na população americana em geral, contudo identifica apenas 68,5% de mutações relacionadas à FC na população hispano-americana (7). Tais variações entre áreas geográficas e origens étnicas são reconhecidas (41) e precisam ser consideradas.

No Brasil, estudos realizados em vários estados e envolvendo diferentes amostras populacionais mostram que frequência da mutação F508del e de outras mutações mais comuns em países da América do Norte e Europa, são baixas no nosso país (2,42-45). Tal evidência sugere que o painel de mutações deveria ser adaptado à realidade brasileira antes de ser utilizado no nosso país. Todavia, tal decisão aumentaria os custos do PNTN (35,37) e o número de carreadores identificados (40).

Marson e cols. verificaram que 26,7% de 180 pacientes com FC, não provenientes da TN, vinculados ao CR em Campinas teriam seu diagnóstico concluído com a pesquisa exclusiva da mutação F508del (46). No mesmo CR, Coutinho e cols. utilizando um painel com seis mutações (F508del, G542X, G551D, R553X, R1162X e N1303K) na análise de 70 pacientes FC, com dois TS positivos e não provenientes da TN, encontraram a mutação F508del em 50% dos alelos estudados. Dos 30 FC com dois alelos, nove foram identificados como heterozigotos compostos e 21 como homozigotos para

F508del (47). Ambos os trabalhos confirmaram que um percentual em torno de 30% teria o diagnóstico confirmado pela investigação da mutação F580del reiterando sua inclusão na estratégia no PNTN (46,47).

### Estratégia TIR/TIR no Brasil

A estratégia preconizada pelo PNTN é a TIR/TIR, que utiliza dosagens subsequentes de TIR e possui sensibilidade entre 80,2 e 96,8%, e, especificidade de 99,8% (35). Nas situações em que a primeira dosagem da TIR for positiva (>70ng/mL), a família deve ser contactada para que a coleta de uma segunda amostra de sangue do lactente seja realizada entre a terceira e quarta semanas de vida do bebê (26). Nesta ocasião a TIR apresenta valores preditivos negativos para FC mais elevados (24,36). A efetividade desse tipo de estratégia de TN está relacionada ao sucesso na coleta das duas amostras de sangue nos períodos determinados pelo programa (22).

Na TIR/TIR, a necessidade do retorno da criança à unidade de saúde para a segunda coleta de amostra de sangue, faz com que os familiares passem por um período de apreensão, diante da possibilidade diagnóstica de FC (24).

A estratégia TIR/TIR está relacionada ao maior índice de perda de casos suspeitos. Se a intenção do PNTN fosse não perder suspeito algum e identificar todos os casos, sem exceção, o valor de ponto de corte da TIR teria que ser reduzido, o que aumentaria demasiadamente a taxa de busca ativa (24,34). Uma solução para esses problemas foi encontrada a partir de 1996 no estado do Colorado (EUA), onde a segunda coleta tornou-se obrigatória para todos os recém-nascidos, conseguindo assim, reduzir de 20 para 2% a taxa de

falha no retorno familiar (34).

#### Novas tecnologias gerando novas estratégias

A dosagem da proteína associada à pancreatite (PAP), cuja concentração sérica encontra-se elevada nos recém-nascidos com FC, foi proposta em 2005 na França (48), como alternativa ao DNA na segunda etapa de triagem. As estratégias que envolvem PAP têm mostrado melhor custo-efetividade quando incluídas em pesquisas comparativas de diversos algoritmos de TN (49).

Outra opção recentemente proposta, substitui a fase de análise de DNA pelo sequenciamento de nova geração (NGS) do gene, de forma simplificada. Sua intenção é reduzir o período de tempo até o diagnóstico, a “exagerada” identificação de carreadores, de casos perdidos (*missing-cases*) e reduzir a necessidade de TS (14,40).

#### 2.4 Análise genética

Desde 1989, a base de dados “*CF Mutation Database*”, também conhecida como CFTR1, já registrou 2001 mutações no *locus* CFTR (50). Essas mutações são agrupadas em classes I-VI, conforme o tipo de alteração que causam na função ou produção da proteína CFTR (51), a fim de facilitar a compreensão da fisiopatologia e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas. Com o objetivo de compreender melhor a repercussão do genótipo na expressão fenotípica de cada mutação, o projeto CFTR2 (*Clinical and Functional Translation of CFTR*) foi criado em 2011 (52). Ele classifica as

mutações como: (a) causadoras de FC - *CF-causing*, (b) associadas às doenças relacionadas à CFTR (CFTR-RD), (c) sem consequências clínicas, (d) desconhecidas ou com relevância clínica incerta. A plataforma conta hoje com dados clínicos e laboratoriais de mais de 88 mil pacientes de 41 países, e reconhece 252 mutações como causadoras de FC dentre as 286 estudadas (52). A inclusão de dados provenientes de áreas menos estudadas, como América Latina, podem contribuir com a caracterização clínica da doença e aumentar o número de mutações com reconhecida relevância clínica (41).

Os métodos para a análise do gene *CFTR* podem buscar mutações específicas ou realizar uma varredura completa do gene (53). Atualmente, a análise genética não é capaz de confirmar o diagnóstico de FC, a não ser na presença de duas mutações *CF-causing* (54). A simples identificação de mutações nos dois alelos não é mais suficiente para o diagnóstico, ambas precisam levar a significativa perda da função CFTR para resultar em fenótipo de FC (7).

#### Epidemiologia genética

Em 2013, 98,9% dos pacientes, submetidos a análise genética nos EUA e presentes no registro da CFF, possuíam no mínimo um alelo com mutação

identificada

([www.cff.org/2013\\_CFF\\_Annual\\_Data\\_Report\\_to\\_the\\_Center\\_Directors.pdf](http://www.cff.org/2013_CFF_Annual_Data_Report_to_the_Center_Directors.pdf))

(29). Contudo, a identificação de mutações em americanos de origem hispânica, africana e asiática é sabidamente mais difícil (14). Para Wong e cols, a definição do termo “hispânico” envolve indivíduos da América Latina,

incluindo Caribe, América Central e do Sul, cuja descendência é resultante da miscigenação entre colonizadores e imigrantes europeus - provenientes principalmente de Portugal, Espanha e Itália, africanos escravizados e a população nativa (55). Tal conceito é importante para entender porque são necessárias 75 mutações para a identificação de 90% dos alelos de pacientes da Espanha enquanto um painel com cinco mutações é suficiente para identificar 97% dos alelos dos judeus Ashkenazi e um painel com 24 mutações é suficiente para identificar 80% dos alelos do norte da Europa e da América do Norte (55).

Na América Latina um painel de sete mutações, que detecta aproximadamente 75% das mutações presentes nos pacientes FC na Argentina e no Chile, detectaria somente 53% de mutações nos pacientes FC no Brasil (56). No nosso país a miscigenação ocorreu de forma distinta entre as regiões (3). Um gradiente decrescente na frequência da mutação F508del pode ser observado da região sul em direção a região norte. Os autores referiram frequências de F508del de 48,7% no Rio Grande do Sul (44), 44,5% em São Paulo (57), 25,7% no Rio de Janeiro (42) e 22,7% no Pará (45).

O uso exclusivo de testes comerciais cujos painéis são baseados nas frequências de mutações de populações caucasianas europeias e norte-americanas (55) são considerados inadequados e pouco efetivos para a utilização em países miscigenados como o Brasil (58). No Brasil e na América Latina painéis de mutação mais diversificados seriam necessários para ampliar a efetividade do diagnóstico genético (43,56). Outra opção seria aumentar o uso de técnicas de varredura, com análise sequencial de todo o gene (56). Todavia, isso pode acarretar a identificação de polimorfismos e de mutações de



importância clínica desconhecida (59). O NGS é mais preciso, menos laborioso e capaz de aumentar a capacidade diagnóstica molecular da FC mas a interpretação do resultado do exame ainda é uma limitação (54).

## 2.5 Teste do suor

O TS por QPIT (técnica de iontoforese quantitativa de pilocarpina) continua sendo o teste padrão de referência mais disponível e útil para a confirmação diagnóstica de FC (7,11). Em todos os protocolos atuais (60-63) o teste é constituído por quatro fases: estimulação da sudorese, coleta, quantificação do suor coletado e aferição da concentração de  $\text{Cl}^-$  (62).

A estimulação é realizada durante 5 minutos através da iontoforese de pilocarpina embebida em gaze, no método Gibson & Cooke, ou por dispositivo da Wescor<sup>®</sup> (62). O tempo de coleta do suor não deve exceder 30 minutos e a quantidade mínima a ser coletada depende do método utilizado: 75g – se gaze ou papel filtro e 15µl se cateter de plástico em espiral Macroduct<sup>®</sup>. Outra diferença importante entre os dois métodos de coleta é que no de Gibson & Cooke, a diluição do suor é necessária (64). Para evitar sua evaporação, principal erro técnico, o tempo máximo de armazenamento da amostra sob refrigeração a 4°C é de 72hs (62). A análise do  $\text{Cl}^-$  pode ser realizada pela titulação coulométrica, utilizando um cloridômetro; pela titulação manual usando a técnica de Schales e Schales com nitrato de mercúrio ou por analisadores automatizados, usando eletrodo de íon seletivo (62,63).

A consistência diagnóstica do TS deve ser obtida pela repetição do teste em momentos diferentes. O ideal é que o teste seja realizado nos dois braços. Resultados FP podem ser consequência de evaporação da amostra ou da presença de eczema no local onde o estímulo foi realizado. Já os FN podem ser resultantes de amostras com quantidade insuficiente ou edema local. Raramente o contato com os eletrodos pode causar queimadura, ardência ou bolhas no local estimulado (64).

É importante que o TS seja realizado em centros de referência creditados e por profissionais treinados e experientes em seguir estritamente os protocolos estabelecidos (7,11,54,62,63,64). De Boeck e cols. (54) afirmam que os laboratórios devem ser submetidos regularmente a procedimentos que garantissem rígido controle de qualidade.

Segundo o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), o recém-nascido precisa ter no mínimo duas semanas de vida e peso  $\geq$  2Kg para realizar o TS (63). De acordo com o Guia para Implementação de Programas de Triagem Neonatal da *Cystic Fibrosis Foundation*, o ideal é que o TS esteja disponível a uma distância máxima de 2 ou 3h, por via rodoviária, do local de residência da família (24).

Ao longo de 60 anos, o TS provou ser um teste robusto para o diagnóstico de FC. Mais recentemente, ele também tem sido utilizado como biomarcador em ensaios clínicos que avaliam a função da proteína CFTR em resposta ao uso de potenciadores (64).

Em 2008, Farrel e cols. (7) argumentavam que o reconhecimento da extensa variabilidade fenotípica da FC levaria ao aumento no número de

diagnósticos em pessoas com valores intermediários de  $\text{Cl}^-$  no suor, que na ocasião representavam 14% (7). Essa hipótese foi confirmada pelos dados do Registro da CFF (2013), onde cerca de 25% dos pacientes heterozigotos para F508del e 25% dos pacientes com mutações de classes IV-V apresentaram  $\text{Cl}^- < 60 \text{ mmol/L}$  nos últimos 5 anos (29).

## 2.6 Outros exames diagnósticos

A variabilidade na apresentação clínica da FC estimula o desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitem o diagnóstico de fenótipos leves (54). O TS pode não ser esclarecedor e levar a controvérsias diagnósticas. A análise genética é indicada como alternativa, porém é limitada quando identifica mutações sem relevância clínica ou quando não as identifica (41). As medidas da DPN e da corrente elétrica intestinal (MCI) aferem o potencial elétrico criado pelo fluxo iônico epitelial na superfície mucosa e permitem o acesso direto à fisiologia das células e dos canais iônicos. Portanto, têm sido utilizadas na avaliação da função da CFTR nas últimas décadas (54).

### 2.6.1 Medida da diferença de potencial nasal

A DPN avalia a função da CFTR a partir da premissa de que as anormalidades elétricas encontradas na cavidade nasal refletem as das vias aéreas inferiores (65,66). Os epitélios têm como propriedade a resistência elétrica, portanto a absorção ou secreção ativa de íons como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  induzem a uma diferença de potencial (DP) através de suas superfícies (54,66). As anormalidades elétricas do epitélio nasal são avaliadas quando este é

sequencialmente exposto a diferentes soluções que estimulam ou inibem o transporte iônico pelos canais CFTR, ENaC, CaCC, cujas funções encontram-se direta ou indiretamente comprometidas na FC. Os pacientes com FC diferem dos indivíduos sadios em todas as cinco fases do exame. Apresentam hiperpolarização basal e maior despolarização em resposta à perfusão com amilorida. Porém, a alteração mais característica no paciente com FC é a ausência de resposta aos estímulos à secreção de cloreto, isto é, mínima ou nenhuma hiperpolarização após a perfusão com soluções zero-cloro e isoproterenol (54,67).

A DPN é a única medida *in vivo* capaz de verificar separadamente o transporte epitelial de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . Diante disso, o teste vem sendo usado como biomarcador da eficácia de novos tratamentos direcionados ao defeito básico da FC, como a terapia com moduladores de transporte iônico. (66,68).

Desde 1998, a DPN foi incluída como critério diagnóstico de FC (15). A ECFS a mantém no algoritmo diagnóstico (11), todavia a última diretriz americana considera a DPN exame somente um teste auxiliar (7). Um argumento é que o acesso a DPN é limitado, porque há poucos centros de referência capacitados para realizá-la. Outro argumento é que pontos de corte e valores de referência da DPN ainda não foram claramente definidos. Porém, estudo recente verificou que os valores encontrados nos escores de Wilschanski e Sermet foram concordantes com as condições de doença/não-doença dos participantes (69).

Contudo, a CFF reconhece que a DPN pode ser útil no processo diagnóstico, principalmente ao excluir a FC quando há resposta significativa à perfusão de soluções zero-cloro (7,17).

### 2.6.2. Medida de corrente elétrica intestinal (MCI)

A MCI avalia a função da CFTR ao aferir a atividade elétrica transepitelial intestinal. Isso se dá porque além de transportar substâncias do lúmen para a corrente sanguínea, eletrólitos e água também passam pelos enterócitos.

Este exame está indicado quando há suspeita de FC em pacientes que apresentam sintomas leves ou subclínicos, associados a TS duvidosos ou intermediários e identificação de nenhuma mutação ou somente uma mutação causadora de FC. A MCI é preferida na presença de infecção aguda das vias aéreas superiores, extensa polipose nasal, após cirurgia nasal ou quando envolve lactentes ou crianças muito pequenas para cooperar no exame (68). A MCI também é utilizada em estudos de fenótipo-genótipo para monitorar a influência de genes modificadores no epitélio intestinal e para verificar a eficácia de novas terapias com potenciadores e corretores de CFTR (54,70).

Fragmentos provenientes de biópsias retais são posicionados em microcâmaras de Ussing e incubados a 37°C com solução tampão. Diferença de potencial basal ( $PD_{\text{basal}}$ ), corrente de curto-circuito ( $I_{\text{sc, basal}}$ ) e resistência transepitelial ( $R_{\text{t, basal}}$ ) são determinados. O  $I_{\text{sc}}$ , como medida direta do transporte iônico transepitelial ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$ ) é registrado durante 60-75 minutos (71). Durante esse tempo, o epitélio é sequencialmente banhado com 5 soluções com composições farmacológicas distintas (amilorida, indometacina, carbacol, 8-bromo-AMPC e forskolina, DIDS e histamina), de modo que a secreção de  $\text{Cl}^-$  mediada por canais CFTR possa ser diferenciada

da realizada por canais alternativos. A direção invertida e a magnitude reduzida da resposta ao carbacol e à histamina são usados como principais critérios diagnósticos para FC no MCI (70).

Algumas vantagens da MCI são descritas: fácil acesso ao tecido intestinal em qualquer idade, inclusive em lactentes após TN; mínima ou nenhuma destruição tecidual ou remodelamento devido a infecções bacterianas ou virais; viabilidade de testar novas terapias em tecido epitelial humano e *ex vivo*, sem risco para o paciente; capacidade de detectar quantidade bem reduzidas de CFTR funcionalmente ativas (71). Porém, trata-se de uma técnica extremamente laboriosa e delicada, cuja principal desvantagem é a necessidade de equipamentos laboratoriais especializados e técnicos treinados e experientes na sua realização, tornando-se assim ainda menos acessível na rotina diagnóstica que a DPN pois poucos centros de referência são capacitados a realizá-lo (70).

### 2.6.3 Suor

Áreas de sobreposição nos valores de  $Cl^-$  no suor são observadas entre os indivíduos saudáveis, os heterozigotos obrigatórios (pais de FC), os pacientes com doenças relacionadas a CFTR e até mesmo entre alguns pacientes com diagnóstico de FC (68). O aumento das pesquisas clínicas com drogas que recuperam a função da CFTR, a necessidade de novos biomarcadores, simples, confiáveis e práticos, tornou-se uma realidade (54). Grupos da Califórnia (EUA) e de Toronto (Canadá), desenvolveram métodos para acessar a função da CFTR através da glândula sudorípara (68): - *sweat potential difference* (SPD) - a diferença de potencial da glândula sudorípara (72), o teste

da secreção de suor  $\beta$ -adrenérgica ( *$\beta$ -adrenergic sweat secretion test*), ou evaporímetro (73) e medida radiométrica da secreção de suor dependente da CFTR (74).

#### Diferença de potencial da glândula sudorípara (DPS)

Trata-se da aferição da diferença de potencial devida a estimulação da glândula sudorípara por iontoforese de substâncias agonistas colinérgicas e  $\beta$ -adrenérgicas. A DPS é medida *in vivo* usando eletrodos padrão de EEG posicionados na epiderme e no tecido subcutâneo (72). Após a iontoforese, óleo mineral saturado é aplicado sobre a região estimulada para se evitar choque elétrico. Devido a maior perda de  $\text{Cl}^-$  através de suas glândulas de suor, a diferença de potencial é mais negativa em pacientes FC quando comparada com controles sadios (68).

#### Evaporímetro

Na secreção do suor, a via colinérgica está relacionada a termorregulação corpórea e é independente da CFTR, enquanto que a via  $\beta$ -adrenérgica é dependente da CFTR. Portanto, esta última encontra-se bastante reduzida ou ausente nos pacientes com FC. Quinton e cols. demonstraram que a secreção do suor é 50% menor em portadores do que em controles sadios (73).

O protocolo do evaporímetro inclui injeções intradérmicas de soluções intercaladas por períodos de aferição da sudorese no evaporímetro. Cada período tem a duração de 10-15 minutos, e as seguintes soluções são sequencialmente aplicadas - agonista colinérgico, atropina (para inibir a

secreção colinérgica de suor), e um coquetel de estímulo  $\beta$ -adrenérgico, incluindo isoproterenol, aminofilina e atropina. A aferição do suor secretado é realizada ao se posicionar o evaporímetro (probe) sobre a área da pele previamente estimulada e tratada com óleo mineral saturado de água. Nesse exame é possível discriminar os valores de controles sadios dos valores de heterozigotos e de pacientes com FC, sendo portanto o primeiro a identificar os carreadores de uma mutação CFTR (68).

#### Medida radiométrica da secreção de suor dependente da CFTR

As glândulas sudoríparas são excelentes para demonstrar a função da CFTR pois são acessíveis e raramente afetadas por infecção ou inflamação. Neste exame a função da CFTR é monitorada *in vivo* através de fotografias seriadas das glândulas sudoríparas (74).

O teste é constituído por dois períodos sequenciais de estímulo: colinérgico e  $\beta$ -adrenérgico. No primeiro, a meticolina (agente colinérgico) é injetada no subcutâneo do antebraço do paciente e durante 15 minutos permanece estimulando a secreção do suor (suor-M) pelo canal de cálcio (CaCC) de forma independente da CFTR. Na fase seguinte, um coquetel de soluções  $\beta$ -adrenérgicas é injetado no mesmo local. Após 20-30 minutos espera-se que os receptores muscarínicos tenham sido bloqueados, o AMPc tenha sido disponibilizado e que a secreção de suor (suor-C) dependente de CFTR tenha sido estimulada. Numa única fotografia, com a ajuda de um ponto de referência na área de 7x9,5mm, é possível identificar aproximadamente 50 glândulas sudoríparas e medir o diâmetro de cada uma delas. Como as fotografias são realizadas de forma sequencial, as mesmas glândulas são reconhecidas nas imagens subsequentes e o aumento individual de cada



glândula pode ser registrado ao longo do tempo. A razão entre a fase  $\beta$ -adrenérgica (dependente de CFTR) e a fase colinérgica (independente de CFTR) é então calculada: suor-C/suor-M. O que Wine e cols. (74) observaram foi que essa razão é zero nos pacientes com FC (F508del/F508del) e que nos heterozigotos (pais ou irmãos de FC) ela é 50% dos valores encontrados em indivíduos controles saudáveis. O grupo de Wine, portanto, propõe que o exame seja utilizado para medir a função da CFTR *in vivo*, de forma mais simples e menos invasiva, e também para avaliar o efeito de tratamento direcionado a disfunção da CFTR através de comparações intra-sujeitos das medidas repetidas (74)

## 2.7 Conclusão

A ampliação da cobertura da triagem neonatal provocou uma mudança no paradigma de diagnóstico da fibrose cística ao permitir a identificação de lactentes com a síndrome metabólica relacionada à CFTR (CRMS) ou com diagnóstico inconclusivo de FC com triagem positiva (CPSPID) cuja incidência pode variar de acordo com o algoritmo de triagem neonatal aplicado, com os pontos de corte da tripsina imunorreativa (TIR) e até do local onde se deu a triagem.

O objetivo da triagem neonatal não é concluir diagnóstico e portanto, independente da estratégia e algoritmo escolhidos, sempre haverá casos falsos-positivo e falsos-negativo, sendo necessário portanto a avaliação dos custos, riscos e benefícios relacionados a ambos. As diferenças entre os

protocolos de triagem neonatal são apropriadas e refletem questões geográficas, recursos do sistema de saúde e população.

O algoritmo TIR/DNA é muito efetivo em caucasianos não hispânico e portanto, para populações miscigenadas como o Brasil, a escolha pelo TIR/TIR foi mais acertada pois este é capaz de diagnosticar fibrose cística em diferentes etnias. Por outro lado, como a segunda coleta de sangue não é mandatória no país, o risco de perda de casos pode significar uma desvantagem, principalmente em populações mais vulneráveis, sem acesso adequado aos serviços de saúde. Portanto deve ser realizado um estudo de custo-efetividade da segunda coleta mandatória para verificar se tal estratégia no Brasil seria capaz de diminuir o número de perdas devido ao não retorno das crianças no período adequado.

Estratégias que incluem a dosagem da proteína associada à pancreatite (PAP) no algoritmo de triagem neonatal vem sendo reconhecidas como a melhor escolha para países com importante diversidade étnica. Além disso, vêm mostrando melhor custo-efetividade ao serem comparadas com as estratégias que incluem a análise genética. Podem portanto, ser uma opção para o Brasil. Porém, a indicação de tal estratégia dependeria da execução de estudos de custo-efetividade que importariam em dispor de painel de mutações adequado para serem comparados com a dosagem da proteína associada à pancreatite (PAP).

Os Programas de Triagem Neonatal identificam crianças em risco, todavia sua efetividade como prevenção secundária só se realiza diante da confirmação diagnóstica em tempo hábil e com elevada acurácia para se evitar estresse familiar, testes, medicalização e custos desnecessários.

A redução da variabilidade diagnóstica pode ser alcançada com o uso do sistema *Macroduct*® para estimular e coletar o suor, e da coulometria para analisá-lo.

A carência de uma classificação diagnóstica adequada numa coorte específica de casos indeterminados continua sendo um problema. Portanto, esforços para a criação de um único algoritmo diagnóstico uniformizando, inclusive, as terminologias são encorajados.

Os novos testes apresentados ainda carecem de estudos comprobatórios .

## 2.8 Referências

1. Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Dankert Roelse J, Duff A, Farrell M, et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros. European Cystic Fibrosis Society* 2009;8(3):153–73.
2. Raskin, S., Pereira-Ferrari, L., Reis, F. C., Abreu, F., Marostica, P., Rozov, T. et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p. F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros* 2008;7(1), 15-22.
3. Pena SDJ, di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FDSG, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011;6(2).
4. Santos GPC, Domingos MT, Wittig EO, Riedi CA, Rosário NA. Neonatal cystic fibrosis screening program in the state of Paraná: evaluation 30 months after implementation. *J Pediatr (Rio J)* 2005;81(3):240–4.
5. Reis F, Melo SO, Vergara AA. Programa de triagem neonatal para fibrose cística de Minas Gerais (PETN-FC): aspectos clínicos e

- laboratoriais. Tema livre. I Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, São Paulo. *J Bras Pneumol* 2006;32(Suppl 1)1.
6. Honorio LFO, Neto NL, Barbosa E et al. Avaliação da triagem neonatal para fibrose cística no Estado de Santa Catarina. Tema livre. I Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, São Paulo. *J Bras Pneumol* 2006; 32 (Suppl 1) 1.
  7. Farrell PMP, Rosenstein BJB, White TTB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J* 2008;153(2):S4–14.
  8. Mayell SJ, Munck a., Craig J V., Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, et al. A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2009;8(1):71–8.
  9. Borowitz D, Parad RB, Sharp JK, Sabadosa K a, Robinson K a, Rock MJ, et al. Cystic Fibrosis Foundation practice guidelines for the management of infants with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome during the first two years of life and beyond. *J Pediatr Mosby, Inc.* 2009;155(6 Suppl):S106–16.
  10. Munck a., Mayell SJ, Winters V, Shawcross a., Derichs N, Parad R, et al. Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis (CFSPID): A new designation and management recommendations for infants with an inconclusive diagnosis following newborn screening. *J Cyst Fibros* 2015;European Cystic Fibrosis Society.
  11. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006;61(7):627–35.
  12. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011;10(SUPPL. 2):86–102.
  13. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med* 2015;277(2):155–66
  14. Baker MW, Atkins AE, Cordovado SK, Hendrix M, Earley MC, Farrell PM. Improving newborn screening for cystic fibrosis using next-generation sequencing technology: a technical feasibility study. *Genet Med* 2015;1–8.

15. Rosenstien BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *J Pediatr* 1998;132(4):589–95.
16. Ooi CY, Dupuis a., Ellis L, Jarvi K, Martin S, Gonska T, et al. Comparing the American and European diagnostic guidelines for cystic fibrosis: same disease, different language? *Thorax* 2012;67(7):618–24.
17. Goubau C, Wilschanski M, Skalická V, Lebecque P, Southern KW, Sermet I, et al. Phenotypic characterisation of patients with intermediate sweat chloride values: towards validation of the European diagnostic algorithm for cystic fibrosis. *Thorax* 2009;64(8):683–91.
18. Levy, Hara, and Philip M. Farrell. "New challenges in the diagnosis and management of cystic fibrosis." *The Journal of pediatrics* 2015;166.6: 1337-1341.
19. Ren CL, Fink a. K, Petren K, Borowitz DS, McColley S a., Sanders DB, et al. Outcomes of Infants With Indeterminate Diagnosis Detected by Cystic Fibrosis Newborn Screening. *Pediatrics* 2015;135(6).
20. Ross L. Newborn Screening for Cystic Fibrosis: A Lesson in public health disparities. 2009;153(3):308–13
21. Botler J, Camacho LAB, Cruz MM Da, George P. Triagem neonatal: o desafio de uma cobertura universal e efetiva. *Cien Saude Colet* 2010;15(2):493–508.
22. Southern KW, Munck A, Pollitt R, Travert G, Zanolla L, Dankert-Roelse J, et al. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros* 2007;6(1):57–65.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria nº 822, de 6 de junho de 2001. Brasília, 2001. Disponível em: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822\\_06\\_06\\_2001.html](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822_06_06_2001.html). Acesso em 27/09/2015.
24. Comeau AM, Accurso FJ, White TB, Campbell PW, Hoffman G, Parad RB, et al. Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation workshop report. *Pediatrics* 2007;119(2):e495–518.
25. Botler J, Camacho LAB, Cruz MM Da. Avaliação das unidades de coleta do Programa de Triagem Neonatal no Estado do Rio de Janeiro. *Rev Bras Saúde Matern Infant* 2012;12(4):425–35.
26. Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Triagem Neonatal. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/1083-sas-raiz/dahu-raiz/programa->

nacional-de-triagem-neonatal/l2-programa-nacional-de-triagem-neonatal/15204-programas-estaduais-interno. Acesso em 27/09/2015.

27. Grupo Brasileiro de Estudo em Fibrose Cística. Disponível em: [http://www.gbefc.org.br/gbefc/Registro\\_Portugues.pdf](http://www.gbefc.org.br/gbefc/Registro_Portugues.pdf). Acesso em 27/09/2015.
28. Cystic Fibrosis Australia. Disponível em: [https://www.cysticfibrosis.org.au/media/wysiwyg/CF-Australia/PDF\\_files/40023-ACFDR\\_Annual\\_Report\\_2013vweb.pdf](https://www.cysticfibrosis.org.au/media/wysiwyg/CF-Australia/PDF_files/40023-ACFDR_Annual_Report_2013vweb.pdf). Acesso em 27/09/2015.
29. Cystic Fibrosis Foundation. Disponível em: [https://www.cff.org/2013\\_CFF\\_Annual\\_Data\\_Report\\_to\\_the\\_Center\\_Directors.pdf](https://www.cff.org/2013_CFF_Annual_Data_Report_to_the_Center_Directors.pdf). Acesso em 27/09/2015.
30. Farrell PM. The meaning of “early” diagnosis in a new era of cystic fibrosis care. *Pediatrics* 2007;119(1):156–7.
31. Kleven DT, McCudden CR, Willis MS. Cystic fibrosis: newborn screening in America. *MLO Med Lab Obs* 2008;40(7):16–8, 22, 24–7.
32. Dijk, F. N., McKay, K., Barzi, F., Gaskin, K. J., Fitzgerald, D. A. Improved survival in cystic fibrosis patients diagnosed by newborn screening compared to a historical cohort from the same centre. *Archives of disease in childhood* 2011;96(12), 1118-1123.
33. Sims EJ, Mugford M, Clark A, Aitken D, McCormick J, Mehta G, et al. Economic implications of newborn screening for cystic fibrosis: a cost of illness retrospective cohort study. *Lancet* 2007;1187–95.
34. Sontag MK, Hammond KB, Zielenski J, Wagener JS, Accurso FJ. Two-tiered immunoreactive trypsinogen-based newborn screening for cystic fibrosis in Colorado: Screening efficacy and diagnostic outcomes. *J Pediatr* 2005;147(3 SUPPL.):83–8.
35. Vernooij-van Langen a. MM, Loeber JG, Elvers B, Triepels RH, Gille JJP, Van der Ploeg CPB, et al. Novel strategies in newborn screening for cystic fibrosis: a prospective controlled study. *Thorax* 2012;67(4):289–95.
36. Southern KW. Determining the optimal newborn screening protocol for cystic fibrosis. *Thorax* 2012;67(4):281–2.
37. Wilcken B. Newborn screening for cystic fibrosis: Techniques and strategies. *J Inherit Metab Dis* 2007;30(4):537–43.

38. Bender LM, Cotten SW, Willis MS. Kids in America: Newborn Screening for Cystic Fibrosis. *Lab Med.* 2011;42(10):595–601.
39. Sontag MK, Wright D, Beebe J, Accurso FJ, Sagel SD. A New Cystic Fibrosis Newborn Screening Algorithm: IRT/IRT1??/DNA. *J Pediatr* 2009;155(5):618–22.
40. Sarles J, Giorgi R, Berthézène P, Munck A, Cheillan D, Dagorn JC, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis: Comparing the performances of IRT/DNA and IRT/PAP. *J Cyst Fibros. European Cystic Fibrosis Society* 2014;13(4):384–90.
41. Castellani C. CFTR2: How will it help care? *Paediatric Respiratory Reviews* 2013;4–7.
42. Cabello, G. M., Cabello, P. H., Llerena, J. C., Fernandes, O., & Harris, A. The 3120+ 1GA Splicing Mutation in CFTR Is Common in Brazilian Cystic Fibrosis Patients. *Human biology* 2001;73(3), 403-409.
43. Cabello GMK, Cabello PH, Roig SRS, Fonseca A, Carvalho ECD, Fernandes O. Rastreamento da fibrose cística usando-se a análise combinada do teste de IRT neonatal e o estudo molecular da mutação deltaF508. *J Bras Patol e Med Lab* 2003;39(1).
44. Streit, C., Burlamaque-Neto, A. C., e Silva, F. D. A., Giugliani, R., & Pereira, M. L. S. (2003). CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Molecular genetics and metabolism*, 78(4), 259-264.
45. De Araujo, F. G., Novaes, F. C., Dos Santos, N. P. C., Martins, V. D. C., de Souza, S. M., dos Santos, S. E. B., & Ribeiro-dos-Santos, A. K. C. Prevalence of deltaF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Brazilian journal of medical and biological research* 2005;38(1), 11-15.
46. Marson FADL, Bertuzzo CS, Ribeiro MÂGDO, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol publicação Of da Soc Bras Pneumol e Tisiologia* 2013;39(3):306–16.
47. Coutinho, C. A. D. A. C., Marson, F. A. D. L., Ribeiro, A. F., Ribeiro, J. D., & Bertuzzo, C. S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations at a referral center for cystic fibrosis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2013;39(5), 555-561.
48. Sarles, J., Berthézène, P., Le Louarn, C., Somma, C., Perini, J. M., Catheline, M. & Dagorn, J. C. Combining immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein assays, a method of newborn screening for cystic fibrosis that avoids DNA analysis. *The Journal of pediatrics* 2005;147(3), 302-305.

49. van der Ploeg CPB, van den Akker-van Marle ME, Vernooij-van Langen a. MM, Elvers LH, Gille JJP, Verkerk PH, et al. Cost-effectiveness of newborn screening for cystic fibrosis determined with real-life data. European Cystic Fibrosis Society. *J Cyst Fibros* 2015;14(2):194–202.
50. Cystic Fibrosis Mutation Database. Disponível em: [www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca) Acesso em 27/09/2015.
51. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67:117-133.
52. CFTR2 - Clinical and functional translation of CFTR - Disponível em: <http://cftr2.org>. Acesso em 27/09/2015.
53. Dequeker E, Stuhmann M, Morris M a, Casals T, Castellani C, Claustres M, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009;17(1):51–65.
54. De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I, Sermet I, et al. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros. European Cystic Fibrosis Society* 2011;10(SUPPL. 2):S53–66.
55. Wong LJC, Wang J, Zhang YH, Hsu E, Heim R a., Michael Bowman C, et al. Improved detection of CFTR mutations in Southern California Hispanic CF patients. *Hum Mutat* 2001;18(4):296–307.
56. Pérez MM, Luna MC, Pivetta OH, Keyeux G. CFTR gene analysis in Latin American CF patients: Heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. *J Cyst Fibros* 2007;6(3):194–208.
57. Okay, T. S., Oliveira, W. P., Raiz-Júnior, R., Rodrigues, J. C., & Del Negro, G. M. B. Frequency of the deltaF508 mutation in 108 cystic fibrosis patients in Sao Paulo: comparison with reported Brazilian data. *Clinics* 2005;60(2), 131-134.
58. Trujillano D, Ramos MD, González J, Tornador C, Sotillo F, Escaramis G, et al. Next generation diagnostics of cystic fibrosis and CFTR-related disorders by targeted multiplex high-coverage resequencing of CFTR. *J Med Genet* 2013;50(7):455–62.
59. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009;373(9678):1891–904.



60. Multi Disciplinary Working Group. Guidelines for the performance of the sweat test for the investigation of cystic fibrosis in the UK, 1<sup>st</sup> edition. Multi Disciplinary Working Group: 2003.
61. The AACB sweat test working party. Australian guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Biochem Rev* 2006;27:S1-S7.
62. LeGrys V a., Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ. Diagnostic Sweat Testing: The Cystic Fibrosis Foundation Guidelines. *J Pediatr* 2007;151(1):85–9.
63. CLSI. Sweat testing: sample collection and quantitative analysis: approved guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2009.
64. Collie JTB, Massie RJ, Jones O a H, Legrys V a., Greaves RF. Sixty-five years since the New York heat wave: Advances in sweat testing for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2014;49(2):106–17.
65. Leal T, Lebacq J, Lebecque P, Cumps J, Wallemacq P. Modified method to measure nasal potential difference. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(1):61–7
66. Rowe SM, Clancy JP & Wilschanky M. Nasal potential difference measurements to assess CFTR ion channel activity. Amaral MD, Kunzelmann K (eds). *Cystic Fibrosis. Methods in molecular biology* 2011;Chapter 6.69-86.
67. 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):220–6.
68. Beekman JM, Sermet-Gaudelus I, de Boeck K, Gonska T, Derichs N, Mall M a., et al. CFTR functional measurements in human models for diagnosis, prognosis and personalized therapy. *J Cyst Fibros* 2014;13(4):363–72.
69. Sad, IR, Higa LYS, Leal T, Martins RS, Almeida AC, Ramos EG, Peixoto MVM. Repeatability and diagnostic value of nasal potential difference in a genetically admixed population. *Journal of Clinical Medicine Research*. [In press].
70. De Jonge HR, Ballmann M, Veeze H, Bronsveld I, Stanke F, Tümmler B, et al. Ex vivo CF diagnosis by intestinal current measurements

- (ICM) in small aperture, circulating Ussing chambers. *J Cyst Fibros.* 2004;3(SUPPL. 2):159–63.
71. Derichs N, Sanz J, Von Kanel T, Stolpe C, Zapf A, Tümmler B, et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax* 2010;65(7):594–9.
72. Gonska T, Ip W, Turner D, Han WS, Rose J, Durie P, et al. Sweat gland bioelectrics differ in cystic fibrosis: a new concept for potential diagnosis and assessment of CFTR function in cystic fibrosis. *Thorax* 2009;64(11):932–8.
73. Quinton P, Molyneux L, Ip W, Dupuis A, Avolio J, Tullis E, et al.  $\beta$ -Adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(8):732–9.
74. Wine JJ, Char JE, Chen J, Cho HJ, Dunn C, Frisbee E, et al. In Vivo Readout of CFTR Function: Ratiometric Measurement of CFTR-Dependent Secretion by Individual, Identifiable Human Sweat Glands. *PLoS One* 2013;8(10)

## 2.2 Artigo 2

**Title:** Repeatability and diagnostic value of nasal potential difference in a genetically admixed population

**Short title:** NPD repeatability

**Author's informations**

\*Izabela Rocha Sad<sup>a</sup>

Pediatric Pulmonology – Pediatric Department

Fernandes Figueira National Institute of Woman, Child and  
Adolescent Health, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ

Rio de Janeiro - Brazil

[izabela@iff.fiocruz.br](mailto:izabela@iff.fiocruz.br); [izabelasad@gmail.com](mailto:izabelasad@gmail.com)

\* Corresponding author

Laurinda Yoko Shinzato Higa<sup>a</sup>

Pediatric Pulmonology – Pediatric Department

Fernandes Figueira National Institute of Woman, Child and  
Adolescent Health, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ

Rio de Janeiro - Brazil

Teresinha Leal

Louvain center for Toxicology and Applied Pharmacology (LTAP)

Institut de Recherche Expérimentale et Clinique (IREC)

Université catholique de Louvain

Brussels - Belgium

Raisa da Silva Martins<sup>a</sup>

Pediatric Pulmonology – Pediatric Department

Fernandes Figueira National Institute of Woman, Child and  
Adolescent Health, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ  
Rio de Janeiro - Brazil

Ana Claudia de Almeida<sup>b</sup>  
Laboratory of Quantitative Methods  
Fernandes Figueira National Institute of Woman, Child and  
Adolescent Health, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ  
Rio de Janeiro - Brazil

Eloane Gonçalves Ramos<sup>c</sup>  
Clinical Research Unit  
Fernandes Figueira National Institute of Woman, Child and  
Adolescent Health, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ  
Rio de Janeiro - Brazil

Giselda Maria Kalil de Cabello<sup>d</sup>  
Laboratory of Human Genetics  
Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ  
Pavilhão Leônidas Deane, sala 611  
Rio de Janeiro - Brazil

Maria Virgínia Marques Peixoto<sup>b</sup>  
Laboratory of Quantitative Methods

Fernandes Figueira National Institute of Woman, Child and  
Adolescent Health, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ  
Rio de Janeiro - Brasil

### **Grant Support**

The study was sponsored by Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ and Carlos Chagas Filho Research Foundation of Rio de Janeiro State /FAPERJ.

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge patients and volunteers for participating in this study. The authors would like to thank Tania Folescu for her support and encouragement for the implementation of NPD in Rio de Janeiro. The authors acknowledge Elizabeth Marques for performing the microbiological diagnosis and Sandra Lisboa for performing the spirometry in CF patients.

### **Correspondence**

Corresponding author: Izabela Sad

Address: Avenida Rui Barbosa 716 - 2<sup>o</sup> andar – Flamengo

CEP: 22250020 - Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Telephone number: 55 21 991513551

[izabela@iff.fiocruz.br](mailto:izabela@iff.fiocruz.br); [izabelasad@gmail.com](mailto:izabelasad@gmail.com)

**Word count**

Abstract: 333

Introduction/Conclusion: 3619

References: 39

Tables: 2

Figures: 3

Supplementary data: 2 tables

## Abstract

**Background & Aims:** The genetic diversity of the Brazilian population results from three ethnic groups admixture: Europeans, Africans and Amerindians. Thus increasing the difficulty of performing cystic fibrosis (CF) diagnosis. The nasal potential difference (NPD) evaluates the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and epithelial sodium channel (ENaC) activity. Despite being a useful CF diagnostic test and biomarker of *CFTR*-modulator drugs it is also highly operator dependent. Therefore it may be difficult to get accurate results and to interpret them. Wilschanski and Sermet scores were proposed to address these issues. This study aimed to evaluate repeatability and diagnostic value of NPD parameters and Wilschanski and Sermet scores in a CF center in Rio de Janeiro.

**Methods:** NPD was performed in seventy-eight subjects. Maximal PD, amiloride response, total chloride response, Wilschanski and Sermet scores were explored as means (CI). One-way ANOVA was used to compare mean differences and Scheffé test was used to pair-wise comparisons. Repeatability was evaluated by scatter and Bland-Altman plots. The Ethics Committee of the CF Center has approved the study protocol. Parents and adult participants signed an informed consent form.

**Results:** Forty-eight healthy-volunteers, nineteen non-CF and eleven CF patients were enrolled in this study. Significant differences were found when comparing CF patients NPD parameters to the others two groups ( $p=0.000$ ). Moreover no significant differences were found when non-CF parameters were compared to healthy-volunteers' ( $p>0.05$ ). The means of NPD parameters and diagnostic scores of each group were in concordance with disease/non-disease

conditions. The repeatability data - Wilschanski and Sermet and NPD - allow NPD to be performed in this Brazilian CF Center.

**Conclusions:** The present study gathered consistent data for Bland-Altman plots. The results of Wilschanski and Sermet diagnostic scores suggest that they were concordant with CF/non-CF conditions. More NPD tests should be performed in the Rio de Janeiro CF dynamic cohort to contribute to international NPD validation studies and to provide NPD as a biomarker in Brazil.

**Keywords:** cystic fibrosis, nasal potential difference, diagnostic test, repeatability, Wilschanski index, Sermet score



## Resumo

**Contexto e Objetivos:** A diversidade genética da população brasileira resulta da miscigenação de três grupos étnicos: Europeus, Africanos e Ameríndios. Assim aumenta a dificuldade de realizar o diagnóstico da fibrose cística (FC). A diferença de potencial nasal (DPN) avalia a atividade do regulador de condutância transmembrana de fibrose cística (CFTR) e do canal epitelial de sódio (ENaC). Apesar de ser um útil teste diagnóstico de FC e biomarcador de drogas moduladoras de CFTR, ele também é altamente dependente do operador. Portanto pode ser difícil obter resultados precisos e interpretá-los. Os escores de Wilschanski e Sermet foram propostos para abordar estas questões. Este estudo objetiva avaliar a repetibilidade e o valor diagnóstico dos parâmetros de DPN e os escores de Wilschanski e Sermet num centro de FC no Rio de Janeiro.

**Métodos:** DPN foi realizada em setenta e oito pessoas. PD Máxima, resposta à amilorida, resposta total ao cloreto, escores de Wilschanski e Sermet foram explorados como meios (CI). A técnica one-way ANOVA foi usada para comparar diferenças médias e o teste de Scheffé foi usado para realizar comparações de pares. A repetibilidade foi avaliada por dispersão e por gráficos de Bland-Altman. O Comitê de Ética do centro de FC aprovou o protocolo do estudo. Pais e adultos participantes assinaram um termo de consentimento informado.

**Resultados:** Foram envolvidos nesse estudo quarenta e oito voluntários saudáveis, dezenove pacientes não-FC e onze pacientes FC. Diferenças significativas foram encontradas quando comparados os parâmetros de DPN dos pacientes FC com os dos outros dois grupos ( $p=0.000$ ). Além disso,

diferenças não-significativas foram encontradas quando os parâmetros dos pacientes não-FC foram comparados com os dos voluntários saudáveis ( $p>0.05$ ). Os significados dos parâmetros de DPN e escores diagnósticos de cada grupo estavam em concordância com as condições de doente/não-doente. Os dados de repetibilidade - Wilschanski e Sermet e DPN – permitem que a DPN seja realizada nesse centro de referência brasileiro em FC.

**Conclusões:** O presente estudo coletou dados consistentes utilizando os gráficos de Bland-Altman. Os resultados dos escores diagnósticos de Wilschanski e Sermet sugerem que eles eram concordantes com as condições FC/não-FC. Mais testes de DPN devem ser realizados na coorte dinâmica de FC no Rio de Janeiro para contribuir com os estudos de validação internacional da DPN e proporcionar a DPN como um biomarcador no Brasil.

**Palavras-chave:** fibrose cística, diferença de potencial nasal, teste diagnóstico, repetibilidade, índice de Wilschanski, escore de Sermet

## Introduction

Over the last years knowledge about CF had significant technologic and scientific advances. Definitions and nomenclatures have been reexamined [1] and new CF phenotypes have been recognized, e.g. CFTR-related disorders [2] and CFTR-related metabolic syndrome [3]. Genotype-phenotype correlations are being reviewed by the clinical and functional translation of CFTR (CFTR2) [4].

There are an emerging number of non-classical or atypical phenotypes patients in whom uncertain diagnoses represent a challenge [2,5-7]. Besides that, newborn screening has contributed to growing not only the number of new diagnoses [3], as well as the number of CF equivocal diagnoses [8].

Sweat chloride test, *CFTR* mutation analysis and CFTR bioassays are the core diagnostic tests currently used in cystic fibrosis clinic [1,3]. NPD is the only *in vivo* test able to provide an evaluation of sodium and chloride transport via assessment of transepithelial bioelectric properties [9-11]. As a functional test, NPD also distinguishes individuals with non-classic forms of CF in whom abnormal CFTR function is suspected [9] but sweat test or *CFTR* mutation analysis are inconclusive from subjects with normal CFTR function [2].

CF patients are characterized by having hyperpolarization in basal conditions and increased response to amiloride, both reflecting the removal of the inhibitory effect of CFTR on ENaC. Moreover, the reduction or even the absence of response of the nasal mucosa to topic perfusion with chloride-free solution and with isoproterenol indicates loss of function of CFTR-mediated

chloride transport [6,11-14].

NPD has historically been recognized as a procedure requiring rigorous conduct to ensure consistent and valid results [15]. Skill and experience are required to achieve accuracy and repeatability with such delicate method as NPD. It is also important to establish normal NPD values and intra subject variability for CF patients and non-CF controls, especially in a country like Brazil where ethnic composition results from Europeans, Africans and Amerindians admixture [16], and is believed to be distinct from Europe and North America. The distribution of *CFTR* mutations in Brazil is heterogeneous, with the presence of less prevalent CF mutations [17]. The F508del frequency is close to 48% [16,18-22] and CF prevalence is estimated at 1:10.000 [22].

Upon recognizing the challenging aspects inherent to the diagnostic process, specially related to non-classic phenotypes, and considering the Brazilian singularity – economic contrast, large genetic diversity and the enhance in newborn screening diagnosis – this study was proposed. The hypothesis was that NPD could be performed in this admixed population and results could provide its variability.

The present study aimed to evaluate the repeatability of NPD at a CF center in Rio de Janeiro-Brazil, as well as to evaluate the diagnostic value of NPD test, Wilschanski index and Sermet scores.

## **Methods**

The study was helded between 2009-2010 at Fernandes Figueira National Institute of Woman, Child and Adolescent Healthy, the quaternary

hospital in Rio de Janeiro where the CF Center is situated. The study accomplished the checklist of Standards for the Reporting of Diagnostic accuracy studies (STARD) [23].

### Subjects

NPD measurements were performed in three groups of participants: 1) CF patients previously diagnosed according to consensus [1,3] and regularly followed up, 2) non-CF patients recruited in the Pulmonology Outpatient Clinics and 3) healthy-volunteers, including 13 CF parents, obligated heterozygous. Exclusion criteria were pregnancy or lactation, cigarette smoking, acute upper respiratory tract infection in the last four weeks prior the NPD test, nasal polyps or previous nasal surgery. At NPD measurement CF patients were clinically stable with no respiratory symptoms other than those normally experienced neither in any exacerbation treatment nor in any long-term oxygen therapy.

### Clinical and Laboratory Assessment

Gender and age at NPD measurements were computed for all participants. In CF group, age at diagnosis and clinical data related to disease status were collected within six months of NDP: height and weight for age; body mass index (BMI, kg/m<sup>2</sup>), malnutrition if < 17.8; lung function, assessed by standard spirometer (Jaeger Master Scope, v.4.65, Care Fusion Ltd.) and expressed by the percentage of forced expiratory volume in first second (FEV<sub>1</sub>) predicted for age, gender and height [24]; pancreatic function, assessed by pancreatic enzymes replacement therapy (PERT) and respiratory infection, assessed by Leed's criteria for *Pseudomonas aeruginosa* [25]. In CF patients sweat chloride measurement by quantitative pilocarpine iontophoresis test

(QPIT) [26] and coulometry quantitative chloride analyses were performed at diagnosis in the CF center. DNA analyses were performed at Laboratory of Human Genetics at Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ. The mutations were analyzed by distinct methodologies: F508del – heteroduplex analysis; N1303K and G542X – Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism; S4X, R334W and P205S – *Single-strand conformation polymorphism and sequencing* [20]; W1282X – *Multiplex PCR/reverse hybridization procedure* [18]. Identified mutations were categorized into classes as previously described [27] and classified according to *CFTR2* [4].

#### Nasal potential difference

NPD measurements were performed by a single operator previously trained in a qualified European CF Center (Université de Louvain, Brussels), according to the technique described by Leal et al. (2003) [28].

NPD values were recorded using a high-impedance voltmeter (Knick Portamess®, ElektronischeMessgeräte, Berlin, Germany) connected to two silver electrodes (Ag/AgCl). The reference electrode was immersed in an electrocardiogram conductive cream (SignaElectrode Cream) diluted (1:1 v:v) with Ringer's solution to build a bridge, and then it was placed on a lightly diamond-tip drill scarified skin area of  $\pm 2$ -3mm in the right forearm of the subject. The exploring electrode was inserted in the distal end of the first lumen of a n° 6 pediatric double lumen silicone Foley catheter, filled with cream. The second lumen was used for sequential perfusions of isotonic buffered solutions at a constant rate of 3ml/min. Solutions, set at pH 7.4, were filtered (Acrodisc Syringe filter 0.2 $\mu$ m, PallCo, Ann Harbor, MI, USA), warmed and perfused for at least 3 minutes. Potential difference (PD) measurements were initially

performed with the probe positioned at 3.0cm, 2.0cm, 1.5cm, 1.0cm and 0.5cm from nasal anterior tip and then fixed at the most negative position on the nasal floor. During an initial phase, perfusion with Ringer's solution was made to obtain basal values, and then 100 $\mu$ M amiloride was added to inhibit ENaC activity. A third modified Ringer's solution without chloride and with amiloride was used to promote a gradient favorable to chloride-free efflux. Addition of 10 $\mu$ M isoproterenol to the chloride-free solution was applied to induce CFTR-dependent chloride efflux upon intracellular accumulation of cAMP. For quality control, electrodes offset were done and skin PD was measured at the beginning and at the end of each NPD procedure. Electrodes offset under short-circuit around zero and skin PD magnitude >30mV were considered acceptable. After finishing the measurements the recorded data was transferred to a desktop computer through dedicated Paraly SW105® software [28] and then tracings were constructed using Excel® software.

When performed more than once, tests were repeated within at least one-week interval. The two most stable tracings from each subject were used for data analysis. Stability was considered a change of <1mV in 30 seconds in the end of each NPD phases [1,12]. A second reader, blind to the disease condition, checked the tracings.

Besides PDmax, representing the maximal basal PD value obtained at the end of perfusion with Ringer's solution, the following NPD parameters and diagnostic index were computed: 1) amiloride response ( $\Delta$ amil), representing the change observed in PD after perfusion with amiloride solution; 2) total chloride response (TCR), representing the sum of changes obtained after

perfusion with chloride-free solution and with isoproterenol; 3) Wilschanski index (WI) [5]:

$$\text{Wilschanski index} = \frac{\text{TCR}}{e^{\Delta\text{amil}}}$$

and 4) Sermet score (SS) [7]:

$$\text{Sermet score} = (-(0.11 \times \text{TCR}) - (0.05 \times \Delta\text{amil}))$$

In order to compare diagnostic scores,  $\Delta\text{amil}$  and TCR results from previous publications [5,7,11,12,28,29-32] were used to calculate WI and SS.

### Statistics

*SPSS®22 Statistics* software was used for statistical analysis. Data was explored as means with standard deviation (SD) and confidence interval (CI), and median with range. One-way ANOVA was used to compare mean differences, Levene's test for variance homogeneity (data not shown). To pair-wise comparisons the post-hoc Scheffé test was performed. After checking normality of the distributions between-group comparisons they were evaluated by Kruskal-Wallis non-parametric method with post-hoc comparisons being made pair-wise by Jonckheere-Terpstra. The null hypothesis was rejected at  $p < 0.05$ .

The first and second measurements were explored by scatter plot. The repeatability was evaluated by Bland-Altman plots [33], where the x-axis presents the average values of the first and second measurements and the y-axis presents the differences between them in order to show possible relationships between measurement error and true value. The precision was verified by SD and CI 95% for mean difference. The horizontal lines plotted



denoted the average of the differences and the limits of agreement - mean difference  $\pm 1.96SD$ .

The Fernandes Figueira National Institute of Woman, Child and Adolescent Health's Ethical Research Committee approved the study protocol and parents or participants gave written informed consent.

## Results

Seventy-eight subjects were enrolled in this study: CF patients (n=11), 7 males, with median age of 11.5 years (7.4;17.5); non-CF patients (n=19), 10 males, with median age of 11.7 years (1.4;33.4) and healthy-volunteers (n=48), 13 males, with median age of 32.4 years (21.8;60.3). Means (SD) values and respective 95%CI of all NPD parameters and diagnostic scores used for NPD interpretation are presented in Table 1. All of them showed significant differences between the groups ( $p < 0.000$ , one-way ANOVA). In pair-wise comparison, significant differences ( $p = 0.000$ , Scheffé test) were identified when CF group was compared to non-CF and to healthy-volunteers; and no significant differences were identified between non-CF and healthy-volunteers groups ( $p > 0.05$ , Scheffé test).

**Table 1.** Means (SD), 95% CI of NPD parameters (mV), per group and pair-wise comparisons between groups.

Groups (n)	PDmax <sup>a</sup>	$\Delta$ amil <sup>b</sup>	TCR <sup>c</sup>	Wilschanski index <sup>d</sup>	Sermet score <sup>e</sup>
CF patients (11)	-31.7 (9.5) (-38.1;-25.3)	15 (7.2) (10.2;19.8)	-1.5 (5.8) (-5.4;2.5)	0.9 (0.4) (0.7;1.2)	-0.6 (0.7) (-1.1;-0.1)
non-CF patients (19)	-16.4 (6.9) (-19.7;-13.1)	7.5 (4.2) (5.5;9.5)	-15.3 (5.7) (-18.0;-12.5)	0.1 (0.1) (0.1;0.2)	1.3 (0.6) (1.0;1.6)
healthy-volunteers (48)	-15.2 (7.6) (-17.4;-13.0)	7.8 (4.7) (6.5;9.2)	-13.0 (6.7) (-15;-11.1)	0.2 (0.2) (0.2;0.3)	1.0 (0.7) (0.8;1.2)
One way ANOVA (p-value)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Pair-wise comparison					

	post-hoc Scheffé (p-value)				
CF x non-CF	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
CF x healthy-volunteers	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
non-CF x healthy-volunteers	0.851	0.967	0.435	0.558	0.359

---

<sup>a</sup>PD<sub>max</sub>: maximal basal PD; <sup>b</sup>Δ<sub>amil</sub>: change in PD after amiloride solution infusion; <sup>c</sup>TCR: change in PD after zero chloride and isoproterenol solutions infusions; <sup>d</sup>Wilschanski index =  $e^{TCR/\Delta_{amil}}$ ; <sup>e</sup>Sermet score =  $-(0.11 \times TCR) - (0.05 \times \Delta_{amil})$ .

Medians values of NPD parameters and respective box plots among the 3 groups are in Figure 1A and in Supplementary Data 1. In the Figure 1B, the non-CF group box plots were completely outside the disease ranges. Among the 48 healthy-volunteers there was one outlier just above the cut-off of WI (0.72) and four observations (from 0.13 to 0.24) were inside instead of outside the disease range of SS. In the CF group, the medians of both scores were inside CF disease ranges, but three patients had WI lying below and not above the predicting disease cut-off.

Twenty-two participants repeated the exam. First and second measurements of PDmax and TCR are represented in Figures 2A and 2C. As they showed some differences, Bland-Altman plots were also used. In the Figure 2B, the PDmax mean difference ( $PD_{max_{first}} - PD_{max_{second}}$ ) was -3.4mV (SD=7.5), 95% limits of agreement 11.4; -18.1. Only two pair measurements were not inside the limits of agreements of  $\pm 1.96SD$ , one from CF and the other from healthy-volunteer group. In the Figure 2D, the TCR mean difference ( $TCR_{first} - TCR_{second}$ ) was -0.5 mV (SD=7.81), 95% limits of agreement 14.80; -15.80. Measurements observed outside the limits of agreement could be noticed twice in TCR Bland-Altman plot, both from healthy-volunteers group.

In Figure 3B, the WI mean difference ( $WI_{first} - WI_{second}$ ) was 0.02 (SD=0.16), 95% limits of agreement 0.32; -0.32. In Figure 3D, the SS mean difference ( $SS_{first} - SS_{second}$ ) was -0.03 (SD=0.86), 95% limits of agreement 1.65; -1.71. All groups had observations inside respective limits of the agreement  $\pm 1.96 SD$ , exception for three observations, one from CF patient in WI and two from healthy-volunteers in SS.

Data about diagnostic, clinical characteristics, disease severity and NPD

results from all CF patients (n=11) are presented in Table 2. In this group the median age at diagnosis was 14 months (2;144). Patients with sweat chloride  $\geq$  60mmol/L and severe CF-causing mutations were majority. All patients had *Pseudomonas aeruginosa* infection, seven of them being chronically colonized according to Leed's criteria, and more than 50% of patients had ventilatory disturbance, with FEV<sub>1</sub> below the predicted. Although being in PERT the majority of patient was malnourished.

**Table 2.** Clinical data diagnosis, disease status and nasal potential difference results from CF patients (n=11).

Diagnostic data			Disease status					NPD parameters & diagnostic indices					
Sex	Age at diagnosis (months)	Sweat Cl <sup>-a</sup> (mmol/L)	Genotype <sup>b</sup>	Class	BMI <sup>c</sup> (Kg/m <sup>2</sup> )	FEV <sub>1</sub> <sup>d</sup> (% pred)	chronic Pa <sup>e</sup>	PDmax <sup>f</sup> (mV)	Δamil <sup>g</sup> (mV)	TCR <sup>h</sup> (mV)	Wilschanski index <sup>i</sup>	Sermet score <sup>j</sup>	
1	M	2	100.7	F508del/F508del	II/II	17.7	81.4	no	-47	16	11	1.84	-2.11
2	F	4	96.0	F508del/F508del	II/II	17.4	76.7	yes	-20	6	-5	0.43	0.25
3	M	9	82.5	F508del/F508del	II/II	22.0	103.0	yes	-25	7	-1	0.87	-0.24
4	F	5	88.5	F508del/F508del	II/II	15.2	77.4	yes	-30	16	-7	0.65	-0.03
5	M	80	78.6	F508del/F508del	II/II	13.7	50.7	yes	-34	11	-7	0.53	0.22
6	M	14	59.0	F508del/W1282X	II/I	15.5	116.2	no	-29	15	4	1.31	-1.19
7	F	3	98.0	N1303K/G542X	II/I	17.2	45.8	yes	-39	11	-2	0.83	-0.33
8	M	72	55.3	S4X/R334W	I/IV or V	15.0	124.0	no	-37	25	-8	0.73	-0.37
9	M	86	79.3	F508del/NI	II/-	13.6	64.9	yes	-15	10	1	1.11	-0.61

10	M	144	52.9	F508del/NI	II/-	15.9	98.3	yes	-40	21	3	1.15	-1.38
11	F	33	77.4	P205S/NI	IV/-	16.0	64.0	no	-30	19	-5	0.77	-0.40

---

<sup>a</sup>QPIT Sweat Test; <sup>b</sup>NI = not identified; <sup>c</sup>BMI (body mass index): <15=very severely underweight; 15-16=severely underweight; 16-18.5=underweight; 18.5-25=normal; <sup>d</sup>FEV<sub>1</sub>= forced expiratory volume in the 1st second (Knudson, 1983); <sup>e</sup>Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; <sup>f</sup>PDmax = maximum PD after Ringer's solution perfusion; <sup>g</sup>Δamil = PD changes after amiloride solution perfusion; <sup>h</sup>TCR (total chloride response) = PD changes after perfusion with zero Cl<sup>-</sup> and isoproterenol solutions; <sup>i</sup>Wilschanski index: CF if >0.7; <sup>j</sup>Sermet score: CF if ≤ 0.27.

## Discussion

The repeatability data of this study was in line with the initial hypothesis that NPD could be performed in this Brazilian CF center because all NPD parameters analyzed – PDmax,  $\Delta$ amil and TCR, provided similar results to other CF centers [5,7,11,12,28,29-32,34-36]. The WI and SS estimated in pair measures also confirmed its consistency.

All NPD were performed according to the modified technique proposed by Leal et al. in 2003 [28]. In order to reduce variability the same voltmeter, catheters and solutions were used. The sequence of solutions and duration of infusions were equally controlled. NPD measurements were well tolerated. Some subjects sneezed or complained about tickling sensations while the operator was searching for best position for the catheter in the nostrils.

The measurements were performed in the nostril with the largest basal PD according to Yaakov et al. [32]. They have proposed that this nostril should be selected for drug and electrolyte responses, with the advantage of shortening the total duration of the protocol without missing data. Recent studies however, suggested that both nostrils should be used [15,30,35]. There are still controversies about which values include in NPD analysis. Some authors use the average of both nostrils results while others prefer to use the results separately [9]. Some researchers use tracing values from the nostril with the largest TCR [35] while others prefer to use the side that provide technically better tracing [37]. In this study the time period between repeated procedures was variable, what can support Yaakov's statement that the NPD is repeatable regardless of the time between the measurements [32].



a) NPD interpretation parameters: PDmax,  $\Delta$ amil and TCR

In normal airway epithelia and under basal conditions, sodium absorption is the primary ion transport activity and basal potential difference is negative [9]. In CF subjects a hyperpolarized PDmax is observed reflecting enhanced sodium transport across a chloride-impermeable barrier [6], thought to be due to the absence of regulation of ENaC function by CFTR [9]. In both cases, it is expected for the PD to depolarize during perfusion of amiloride, but in CF patient's  $\Delta$ amil is usually larger than in healthy subjects because of their initial hyperpolarization [34]. In non-CF subjects a high total chloride response is expected. It is represented by a large hyperpolarization, explained by diffusion of chloride through ion channels after a low chloride extracellular and by CFTR-mediated chloride transport enhanced pharmacologically by the addition of isoproterenol. After perfusion with both chloride-free solutions, CF patients have TCR close to zero with small or no change in PD [5,7,12,28,29-32,34,36]. TCR is the most important parameter for NPD interpretation because it is widely considered the most sensitive and specific indicator of the CFTR-dependent chloride transport, which reflects the activity of CFTR chloride channel [32,38].

In this study means and medians were used to summarize NPD parameters in order to enhance comparisons with other studies, however, some differences in techniques always need to be considered. The medians of PDmax and calculated parameters ( $\Delta$ amil and TCR) in non-CF and healthy-volunteers groups (Supplementary data 1) were similar to previous publications [7,38]. Among CF patients, PDmax was smaller and  $\Delta$ amil was almost half of these published values [7,38]. The means of PDmax,  $\Delta$ amil, TCR and diagnostic scores were significantly different between the three groups and the

CF one was responsible for it (Table 1). The pair-wise comparison showed that PDmax was able to distinguish CF from non-CF and from healthy-volunteers. The values of PDmax obtained in CF were much closer to two studies [32,34] than to others, in which basal hyperpolarization around -45mV has been associated to CF patients [5,7,12,28,29-31,36]. As previously published [7,11,28,30], in this study the depolarization after amiloride was much larger in CF patients (Figure 1A) and was able to discriminate them from other subjects (Table 1). The CF patients' lack of response to perfusion with zero chloride plus beta-agonist solutions was evidenced (Table 1 and Figure 2A). Similar TCR values: -1.7mV; -0.7mV and 0.1mV were observed in studies from the United Kingdom and the United States [31], from France [12] and from Australia [11], respectively. The repolarizations observed in both groups without CF (Figure 1A and Table 1) were in accordance with some studies [12,28,31,32] but different from other studies where TCR were much larger, around - 25mV [11,29,34-36].

#### b) NPD diagnostic scores

In 1997, when Ho et al. analyze correlation between mutations types and clinical conditions in 61 normal and 22 CF subjects, they arbitrarily choose as representative of "low chloride secretors", patients with TCR values  $\leq 10$ mV and as "high secretors", patients with TCR values  $>10$ mV [36]. In 2008 Leal et al. classified subjects as secretors when TCR  $< -5$  mV and non-secretors when TCR  $> -5$ mV [12]. In 2010, Middleton & House suggested that a PDmax value  $>30$  mV and a TCR  $<10$  mV would be a reasonable choice to define a distinction between CF and non-CF [11]. In the absence of widely acceptable NPD reference range, Ooi & Durie (2012) considered intermediate category for CFTR function. Therefore they established: normal, when TCR  $< -12$ mV;

intermediate, when TCR results between -12 and -7.7mV; and no function when TCR > -7.7mV (between -7.7 and zero or positive) [39].

The need for accurate and reliable evaluation of CFTR function for diagnosis, management and consultation is broadly recognized [11,39]. Neither the American nor the European Standard Operating Procedures establish how to interpret NPD results [37]. To better evaluate NPD measurements it was important to provide indices that take into account both sodium and chloride transports. WI [5] and SS [7] distinguish CF patients with the following cut-offs: WI >0.70 and SS ≤0.27. Nowadays they are considered alternative derived endpoints and good models to discriminate between CF and healthy subjects, with reasonable diagnostic accuracy [9,32].

The means of WI in the present study (Table 1) were inside the respective results ranges calculated in previous studies: between 0.85 and 1.11 in CF and between 0.03 and 0.32 in non-CF patients or healthy-volunteers (Supplementary data 2). The same happened to SS. The means of the present study and the ones from other authors lied in the range of respective group classification: from -2.08 to -0.81 for CF; and from 0.82 to 2.47 for non-CF or healthy-volunteers.

### c) Repeatability

The exploratory analysis of PDmax (Figure 2A) and TCR (Figure 2C) first and second measures, initially took into account the scatter plots and the line of perfect agreement. All observations were dispersed around the line. Other authors [11,30] have found similar results when they compared right and left nostrils of PDmax values. Aiming to increase NPD repeatability, Vermeulen et al. [34] tested changes in the technique. Theirs repeated measures, founded

with the side-hole catheter at most negative PD position at nasal floor, were suchlike the present study's TCR repeated parameters (Figure 2C). However, the best first x second TCR agreement were observed when the same authors used the larger surface catheter fixed at 5cm on the nasal floor.

When examining repeatability in Bland-Altman plots, the ideal is that the line of mean differences be equal to zero, featuring a perfect agreement. If it is not, it is expected that all differences markers lie between the 95% limits of agreement of mean of difference. In this study, when data of all 22 subjects that repeated NPD were analyzed together, the mean (SD) of the differences between first and second PDmax was -3.4(7.5), but it was -2.68 (7.1) for 19 controls separately (data not shown). The means (SD) of differences were smaller among others studies disease controls or healthy-volunteers: -1.4(8.9) [32]; -1.7 (7.2) [30] and -1.1 (4.7) [34], but in all of them the variability shown by the SD remained equally high.

When non-CF and healthy-volunteers data (n=19) were analyzed together, the mean (SD) of the differences between first and second TCR was 0.90 (8.33) with limits of agreement from -15.43 to 17.23. These results are in consonance with early works [30,34,35] that also analyzed NPD repeatability and found high variability with large limits of agreement.

In scatter plots of WI (Figure 3A) and SS (Figure 3C) first and second measurements are randomly dispersed around the line of perfect agreement, which can suggest the absence of bias. In the same direction, WI and SS means of differences in the Bland-Altman plots (Figure 3B and 3D) were observed very close to zero: 0.02 and -0.03, respectively. In this study, only one from the 22 repeated measures of WI was beyond the 95% limits of agreement.

This fact can be considered a satisfactory outcome when applying Bland-Altman plots. Furthermore, the random distribution of observations around zero suggests absence of bias in both graphs (Figure 3B and 3D).

A single operator performing all NPD exams can be considered a strength factor of this study because it avoided inter-operator variability in a procedure considered very delicate and full of variability sources. Another strength of the present work is the possibility to confirm the applicability of WI and SS diagnostic indices with different previous publications data and to find concordant results to respective diseases status of all subjects groups. The quality of the repeatability results need be considered according to the NPD technique used in the present study. At this time NPD used to have less offsets steps and the standard operating initiatives were just beginning.

The small number of CF participants can be considered a weakness of the study. Fernandes Figueira National Institute of Woman, Child and Adolescent's Healthy is a pediatric CF Center and the patient's small age reduced the population eligibility as NPD measurement usually demands subject's collaboration. Besides that, healthy-volunteers did not perform sweat test or genetic analysis as the absence of clinical symptoms was considered enough to include volunteers in this study. Only one nostril was analyzed and when this study was held no standard operative procedure was available yet.

## **Conclusion**

The present study gathered consistent data between repeated measures for Bland-Altman plots. The results of Wilschanski and Sermet diagnostic

scores suggest that they were concordant with CF/non-CF conditions. More NPD tests should be performed in the Rio de Janeiro CF dynamic cohort to contribute to international NPD validation studies and to provide NPD as a biomarker in Brazil.

### **Abbreviations**

CF: Cystic Fibrosis; CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, NPD: nasal potential difference.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

IRS conceived of the study, participated in the study design and coordinated the study, collected the data, analyzed the data, participated in the draft of the manuscript.

LYSH conceived of the study, participated in the study design and coordinated the study, analyzed the data, participated in the draft of the manuscript.

TL participated in the study design, analyzed the data and participated in the draft of the manuscript.

RSM participated in the draft of the manuscript.

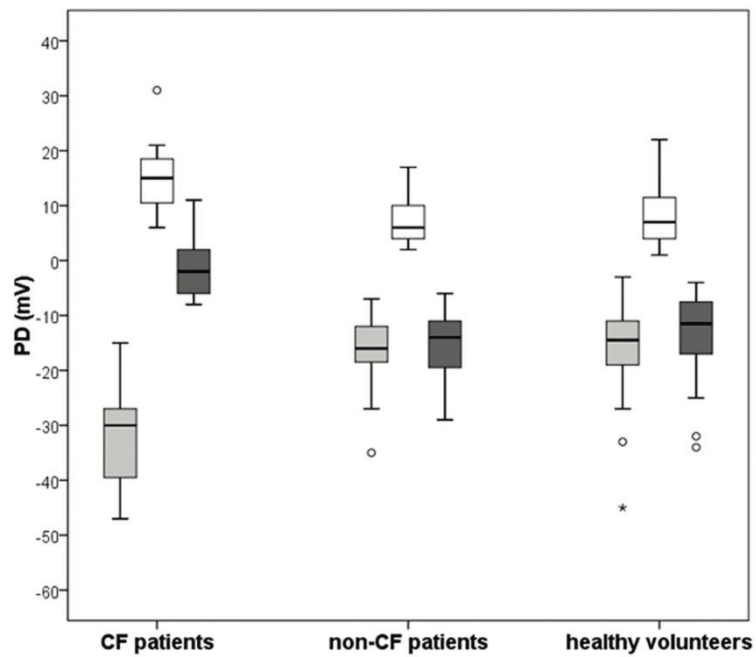
ACA participated in the draft of the manuscript.

EGR analyzed the data.

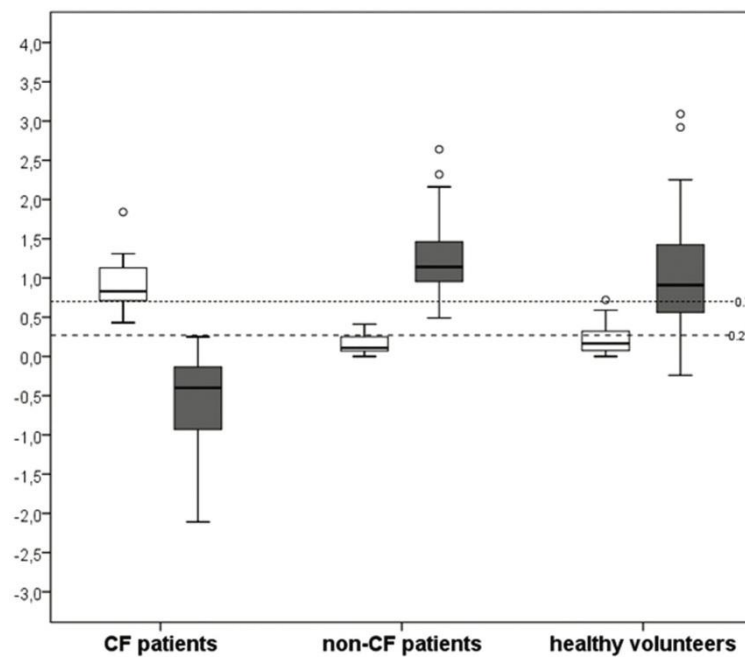
GMKC performed the screening of CFTR mutations.

MVMP conceived of the study, participated in the study design and coordinated the study, analyzed the data, participated in the draft of the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript.



A



B

Figure 1: **Medians and interquartile intervals of NPD parameters and diagnostic indices among groups.** (A) Box plots of PDmax (grey boxes), amiloride response -  $\Delta$ amil (white boxes) and total chloride response - TCR (dark grey boxes); (B) Box plots of Wilschanski index (white boxes) and Sermet score (dark grey boxes) obtained from NPD measurements performed in 11 CF patients, 19 non-CF patients and in 48



healthy-volunteers. The horizontal black line across each box indicates the sample median of the corresponding group. Upper and lower horizontal box lines illustrate the 25th and the 75th percentiles; and extreme upper and lower lines represent the 0.5th and the 99.5th percentiles of the variable. The small dashed horizontal line represents the cut-off value for CF diagnosis according to Wilschanski index ( $>0.7$ ) and the large dashed horizontal line represents the cut-off value for CF diagnosis according to Sermet score ( $\leq 0.27$ ).

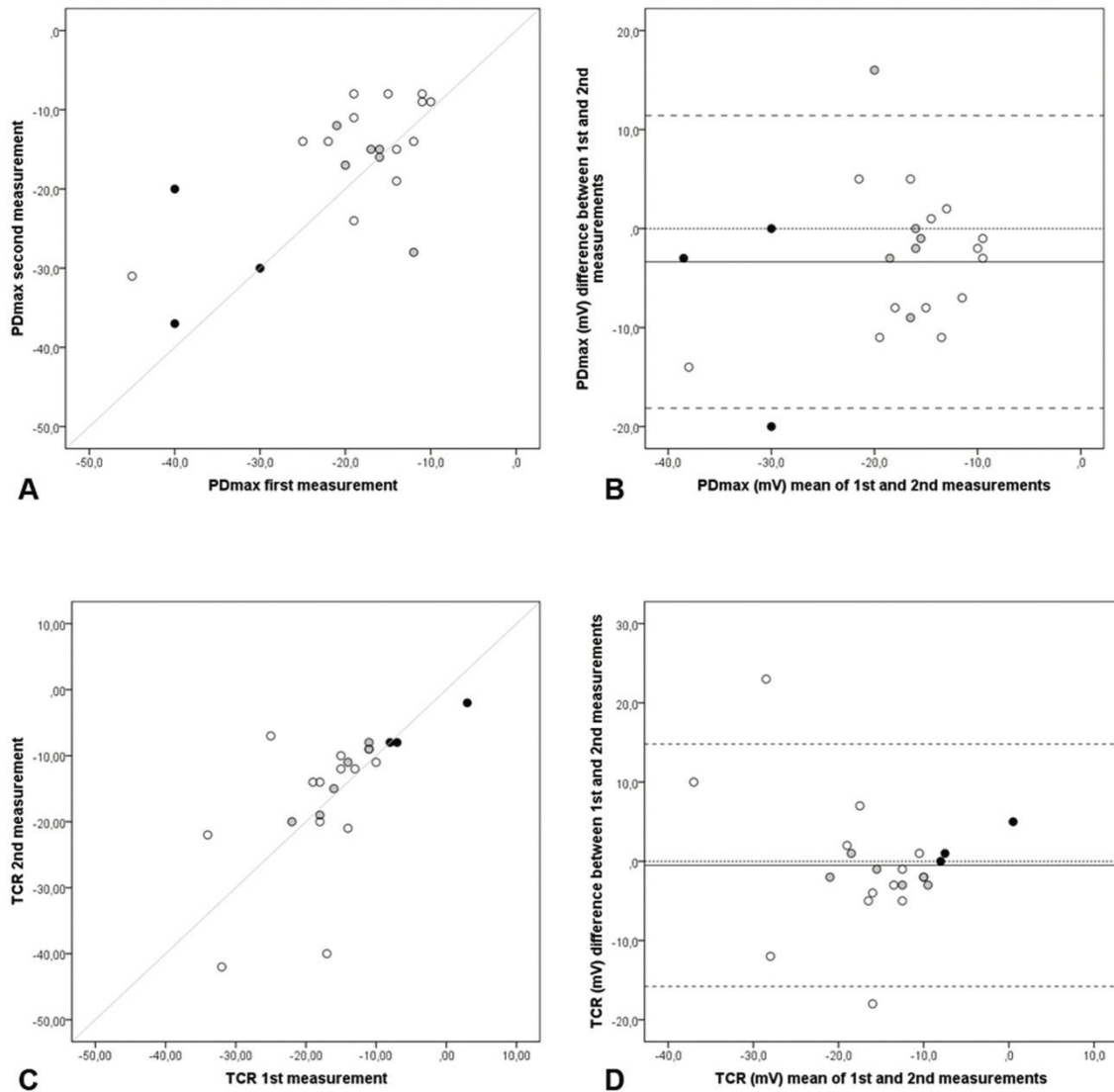


Figure 2: **Repeatability of NPD parameters: PDmax and TCR.** Scatter and Bland-Altman plots of first and second measurements: (A) scatter plot of PDmax, (B) Bland-Altman of PDmax, (C) scatter plot of TCR and (D) Bland-Altman of TCR of each subject ( $n=22$ ), with the horizontal lines representing the perfect agreement (dotted line), the value of the mean difference (small dashed line) and limits of agreement of 95%CI (large dashed lines).

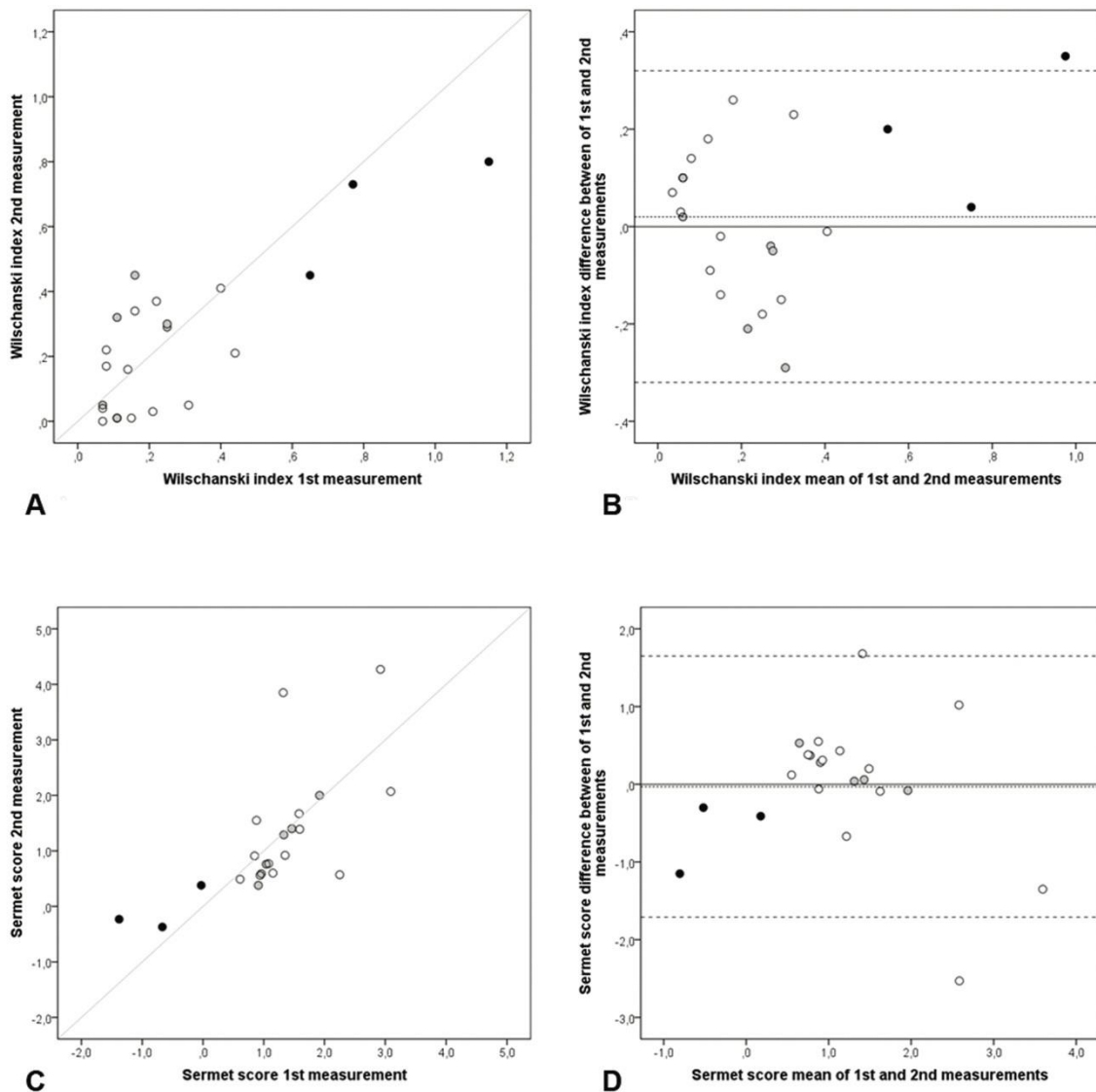


Figure 3: **Repeatability of NPD parameters: NPD diagnostic indices: Wilschanski index and Sermet score.** Scatter and Bland-Altman plots of first and second measurements: (A) scatter plot of Wilschanski index, (B) Bland-Altman of Wilschanski index, (C) scatter plot of Sermet score and (D) Bland-Altman of Sermet score of each subject ( $n=22$ ), with the horizontal lines representing the perfect agreement (dotted line), the value of the mean difference (small dashed line) and limits of agreement of 95%CI (large dashed lines).

### 2.1.1 Referências do artigo 1

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. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Sermet I et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros*. 2011;10 Suppl2:86–102.
3. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008;153:4-14.
4. The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2); available at <http://cftr2.org>. ©Copyright 2011 US CF Foundation, Johns Hopkins University, The Hospital for Sick Children. Accessed 17 Apr 2015.
5. Wilschanski M, Famini H, Strauss-Liviatan N, Rivlin J, Blau H, Bibi H, Bentur L et al. Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir*. 2001;17:1208–1215.
6. Paranjape SM, Zeitlin PL. Atypical cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008;35:116–123.

7. Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Roussel D, Deneuve E, Bui S, Huet F, Guillot M et al. Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. *Thorax*. 2010;65:539–544.
8. Mayell SJ, Munch A, Craig JV, Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, Castellani C et al. A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2009;8:71-78.
9. Rowe SM, Clancy JP, Wilschanski M. Nasal potential difference measurements to assess CFTR ion channel activity. *Methods Mol Biol*. 2011;741:69–86.
10. De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I, Sermet I, Vermeulen F et al. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros*. 2011,10 Suppl 2:S53–S66.
11. Middleton PG & House HH. Measurement of airway ion transport assists the diagnosis of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2010;45:789-795.
12. Leal T, Fajac I, Wallace HL, Lebecque P, Lebacq J, Hubert D, Dall’Ava J et al. Airway ion transport impacts on disease presentation and severity in cystic fibrosis. *Clin Biochem*. 2008;41:764–772.
13. 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;10:220–226.

14. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem*. 2012;45:1132–1144.

15. Rowe SM, Liu B, Hill A, Hathorne H, Cohen M, Beamer JR, Accurso FJ et al. Optimizing Nasal Potential Difference Analysis for CFTR Modulator Development: Assessment of Ivacaftor in CF Subjects with the G551D-CFTR Mutation. *PLoS One*. 2013;8:e66955.

16. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FDSG, Kohlrausch F et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 2011;6(2):e17063.

17. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002;19:575–606.

18. Cabello GM, Moreira AF, Horovitz D, Correia P, Santa Rosa A, Llerena J, Greg J et al. Cystic fibrosis: low frequency of DF508 mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro, Brazil. *Int Rec Res*. 1999;189–196.

19. Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Cystic fibrosis at a Brazilian center of excellence: clinical and laboratory characteristics of 104 patients and their association with genotype and disease severity. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:371–379.

20. Cabello GMK, Cabello PH, Lopez-Camelo JS, Llerena JC, Fernandes O. Haplotype distribution of and linkage disequilibrium between four polymorphic markers near the CFTR locus in Brazilian cystic fibrosis patients. *Hum Biol an Int Rec Res.* 2005;77:853–865.
21. Raskin S, Pereira-Ferrari L, Caldeira Reis F, Abreu F, Marostica P, Rozov T, Cardieri J et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros.* 2008;7:15–22.
22. Perone C, Medeiros GS, Castillo DM, Aguiar MJB De, Januário JN. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(2):134-138.
23. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Moher D et al. The STARD Statement for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy: Explanation and Elaboration. *Ann Intern Med.* 2003;138:W1-W12.
24. Knudson RJ, Lebowitz MD, Holberg CJ, Burrows B. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev of Respir Dis.* 1983;127:725-734.
25. Proesmans M, Balinska-Miskiewicz W, Dupont L, Bossuyt X, Verhaegen J, Høiby N, De Boeck K. Evaluating the "Leeds criteria" for *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis centre. *Eur Respir J.* 2006;27(5):937-43.

26. 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.
27. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*. 2000;67(2):117-133.
28. Leal T, Lebacqz J, Lebecque P, Cumps J, Wallemacq P. Modified method to measure nasal potential difference. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:61–67.
29. Standaert TA, Boitano L, Emerson J, Milgram LJ, Konstan MW, Hunter J, Berclaz PY et al. Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: an outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatr Pulmonol*. 2004;37(5):385-392.
30. Leonard A, Lebecque P, Dingemans J, Leal T. A randomized placebo-controlled trial of miglustat in cystic fibrosis based on nasal potential difference. *J Cyst Fibros*. 2012;11:231–236.
31. Wallace HL, Barker PM, Southern KW. Nasal airway ion transport and lung function in young people with cystic fibrosis. *Am J Resp Crit Care*. 2003;168(5):594-600.
32. Yaakov Y, Kerem E, Yahav Y, Rivlin J, Blau H, Bentur L, Aviram M et al. Reproducibility of nasal potential difference measurements in cystic fibrosis. *Chest*. 2007;132:1219–1226.



33. Bland JM & Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;327(8476):307-310.
34. Vermeulen F, Proesmans M, Boon M, De Boeck K. Improved repeatability of nasal potential difference with a larger surface catheter. *J Cyst Fibros*. 2015;14(3):317-323.
35. 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 Cyst Fibros*. 2014;14(3):310-316.
36. 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.
37. Naehrlich L, Ballmann M, Davies J, Derichs N, Gonska T, Hjelte L, van Konigsbruggen-Rietschel S et al. Nasal potential difference measurements in diagnosis of cystic fibrosis: An international survey. *J Cyst Fibros*. 2014;13:24–28.
38. 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;46:145–152.
39. Ooi CY & Durie PR. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in pancreatitis. *J Cyst Fibros*. 2012;11:355–362.

**3.1 Conclusão e considerações finais**

### 3.1 Conclusão e considerações finais

Este trabalho preenche apenas parcialmente as lacunas encontradas no conhecimento do diagnóstico da Fibrose Cística (FC). Com certeza ele antecede uma revisão sistemática pois a partir de seus resultados as perguntas específicas poderão ser melhor elaboradas, os artigos selecionados e analisados metodologicamente.

A maioria dos centros de referência de FC optaram por estratégias que incluem a análise genética na triagem neonatal, tendo, por conseguinte, desfechos indesejados como: a identificação elevada de carreadores, aumento nos encaminhamentos para a realização de teste do suor e a necessidade de prestar assistência a um maior número de lactentes com diagnóstico ainda não concluídos.

Nas pesquisas mais recentes relacionadas a triagem neonatal busca-se novas tecnologias que possam oferecer melhor custo-efetividade, com redução dos desfechos indesejados.

No atual estágio tecnológico do SUS a estratégia TIR/TIR é a mais adequada, pois não existe um painel de mutações para a análise genética que responda ao grau de diversidade da população brasileira.

Há necessidade de um estudo de custo-efetividade que compare a análise genética e a dosagem da proteína associada à pancreatite (PAP) na triagem neonatal de fibrose cística no Brasil.

Para se contornar um dos principais problemas relacionados a estratégia TIR/TIR, a elevada taxa de perda, é necessária a realização de um estudo de custo-efetividade que compare os valores da implementação da obrigatoriedade da segunda coleta de sangue com os relacionados as repercussões do atraso no diagnóstico de fibrose cística.

A lacuna de publicações à respeito de controle de qualidade do teste do suor no Brasil reforça a necessidade do exame ser realizado estritamente segundo os protocolos internacionais e dos laboratórios serem submetidos regularmente a controles de qualidade internos e externos.

Novas tecnologias relacionadas ao suor vêm sendo desenvolvidas com a intenção de elucidar os casos nos quais não foi possível a conclusão diagnóstica por meio dos testes atualmente disponíveis, especialmente relacionados aos lactentes provenientes da triagem neonatal.

Os resultados dos escores diagnósticos de Wilschanski e Sermet sugerem concordância com as condições de FC/não-FC dos participantes da pesquisa. A presença da maioria das observações dentro dos limites de concordância nos gráficos de Bland-Altman comprova a consistência dos dados de repetibilidade. Mais medidas de diferença de potencial nasal devem ser realizadas nessa coorte dinâmica de pacientes com fibrose cística no Rio de Janeiro para contribuir nos estudos de validação da técnica e para disponibilizar a diferença de potencial nasal como biomarcador no Brasil.

Desde a época das crenças folclóricas relacionadas a bruxaria e sabor salgado do suor, é indiscutível o quanto as pesquisas, envolvendo desde a

bancada até os ensaios clínicos contribuíram para o avanço do conhecimento sobre a fibrose cística. Grandes conquistas foram alcançadas, especialmente na redução de morbimortalidade e aumento de qualidade de vida dos pacientes. Num futuro próximo, a terapia corretiva será uma possibilidade real para a grande maioria dos doentes. Mas para que isso aconteça no Brasil, muitos caminhos ainda precisam ser percorridos.

O aprofundamento dos conhecimentos sobre a fisiopatologia e genética, levaram ao reconhecimento do extenso fenótipo da fibrose cística. Situações que antes eram pareciam claras e simples: teste do suor positivo x negativo, identificação de mutações, hoje em dia são consideradas somente uma ferramenta a mais, que mesmo somadas a outras, até mais inovadoras, podem ainda não ser suficientes para a definição diagnóstica.

A expansão dos Programas de Triagem Neonatal ao redor do mundo mudou o paradigma da fibrose cística e novas questões vem sendo formadas e novos desafios sendo criados. O Programa Nacional de Triagem Neonatal é primordial. Todo recém-nascido com fibrose cística deveria ter a mesma oportunidade de triagem, de diagnóstico e de tratamento, independente do estado onde nasceu.

O Brasil já avançou muito mas ainda tem muito a percorrer. Sua extensão, diversidade sócio-econômica e miscigenação podem ser fatores dificultantes mas não devem ser impeditivos para que medidas sejam tomadas a fim de melhorar a abordagem da fibrose cística.

A dúvida e a inconclusão diagnóstica parecem crescer na mesma proporção dos avanços nos conhecimentos. O teste do suor ainda é o teste de

referência para o diagnóstico de fibrose cística, e portanto sua realização deve ser padronizada e os laboratórios devem ser multiplicados e certificados.

Um amplo estudo sobre a relação genótipo x fenótipo precisa ser realizado, pois só assim será possível saber o que realmente é a fibrose cística no Brasil.

A implementação de novas tecnologias, como a medida da diferença de potencial nasal, a medida de corrente elétrica intestinal e os novos exames com o suor devem ser estimuladas nos centros de referência brasileiros. As dificuldades para incorporar novas tecnologias no Brasil são enormes, precisam ser enfrentadas e simplificadas.

Há necessidade que sejam realizados estudos de custo-efetividade no Brasil, incluindo: (1) comparar o atraso no diagnóstico resultante da perda de pacientes na estratégia vigente com a obrigatoriedade da segunda coleta de sangue no Programa Nacional de Triagem Neonatal, (2) comparar as estratégias de triagem neonatal que envolvem a análise genética e a dosagem da proteína associada à pancreatite (PAP).

Diante de tamanha complexidade envolvendo o processo diagnóstico de fibrose cística, não teria como se esperar que os desafios fossem menos complexos.

## APENDICES



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO para maiores

Título da Pesquisa:

“VALIDAÇÃO DO TESTE DA MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL NO RIO DE JANEIRO”

Nome: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

As páginas deste documento devem estar numeradas (3/número total de páginas) e assinadas pelo médico investigador e pelo responsável legal de menor dando seu consentimento/autorização. Este documento é realizado em duas vias originais, uma das é dada ao responsável legal e a outra arquivada pelo médico pesquisador.

**Você** está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “VALIDAÇÃO DO TESTE DA MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL NO RIO DE JANEIRO”.

A finalidade do estudo é tornar válido um novo exame para o diagnóstico de Fibrose Cística.

Você fará 1 exame de Diferença de Potencial Nasal (DPN). Nos casos de dificuldade técnica o exame deverá ser repetido em outro dia de sua escolha.

#### Informações sobre o exame da DPN:

Esse exame mede a atividade elétrica das células enquanto soluções parecidas com soro fisiológico são jogadas devagar pela narina através de um tubo bem fininho pregado com esparadrapo no seu nariz.

A duração média do exame é de 30 minutos: 15 minutos para preparar e 15 minutos para liberar as soluções pela narina e captar a atividade elétrica.

Não precisa de jejum.

O exame deverá ser adiado por 2 ou 3 semanas se você estiver gripado, com sinusite ou em agudização da fibrose cística.

Por precaução, este exame não deve ser realizado em mulheres grávidas ou durante o período de amamentação.

#### Maiores detalhes de como acontece o exame da DPN:

O paciente senta numa cadeira, apóia os cotovelos na mesa e reclina o corpo para frente, descansando a cabeça num apoio igual ao do exame de vista.

Uma área de mais ou menos 2 a 3 milímetros da pele do seu braço é raspada delicadamente, sem doer. Um cabo chamado eletrodo é colocado em contato com o local raspado e também é fixado com esparadrapo.

A pontinha de um tubinho fino e flexível, de 2 milímetros, é colocada no início da sua narina - no máximo 2 centímetros desse tubo fica para dentro do nariz. O pesquisador mexe nesse tubo procurando o melhor lugar para deixar ele. A outra ponta desse tubinho será presa com esparadrapo no seu nariz e testa.

Depois que você concordar em começar, o pesquisador liga o aparelho. Esse aparelho vai empurrar as soluções tipo soro fisiológico por dentro do tubinho. As soluções vão sair na sua garganta e você vai poder engolir ou deixar escorrer para fora num potinho que estará na sua frente na mesa de apoio.

#### **Riscos e desconfortos possíveis:**

- No momento em que o pesquisador estiver mexendo no tubinho procurando o melhor lugar para deixar ele no nariz, você poderá sentir algumas sensações desagradáveis que passam logo, tipo cócegas no nariz, vontade de espirrar ou seus olhos podem encher de lágrimas.
- Algumas pessoas sentem leve náusea ou enjôo, outras percebem a diferença de gosto das soluções e algumas delas sentem como se de repente estivesse caindo maior quantidade de líquido. Essas sensações acabam quando você avisa ao medico o que está acontecendo e ele diminui a velocidade do aparelho que empurra as soluções pelo tubinho.
- As quantidades dos medicamentos que vão dentro das soluções são tão pequenas que nem causam o mesmo efeito de quando são usados como remédio.

#### **Benefícios possíveis:**

- As informações conseguidas nesse estudo serão úteis para o diagnóstico de fibrose cística de outros pacientes e por isso é importante que ele seja realizado.

.....

#### **Direitos de liberdade do paciente:**

- ✓ **A sua participação nessa pesquisa é voluntária. A qualquer momento você pode suspender sua autorização e se retirar do estudo que o seu atendimento neste hospital não será prejudicado.**
- ✓ **Em qualquer momento, você pode pedir toda informação complementar a pesquisadora, Dra Izabela SAD, que antes ou durante a realização do exame estará**



**disponível a responder qualquer outra dúvida ou informação adicional relativa ao exame.**

Custos adicionais e ressarcimento:

- ✓ **Participar do estudo não te custará nada nem você receberá nenhuma forma de pagamento por isso.**

Privacidade do sujeito de pesquisa:

- ✓ **Os dados colhidos durante este teste serão confidenciais. Estes resultados poderão ser vistos pela equipe médica. O nome do paciente NÃO aparecerá em nenhuma divulgação dos resultados obtidos.**

Sobre o Comitê de Ética:

- ✓ **O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Fernandes Figueira, se encontra a disposição para eventuais esclarecimentos éticos e outras providências que se façam necessárias (e-mail: [cepiff@iff.fiocruz.br](mailto:cepiff@iff.fiocruz.br); telefone: 25541730, fax: 25528491).**

Autorização e assinaturas

**“Eu, \_\_\_\_\_ autorizo minha participação nessa pesquisa.”**

Assinatura: ..... Data: .....

RG: .....Telefone: .....

Testemunha

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

End/Tel: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Investigador que obteve o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome: Izabela Sad

Telefone: 25541770/1759

Ass: \_\_\_\_\_



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO para menores

Título da Pesquisa:

“VALIDAÇÃO DO TESTE DA MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL NO RIO DE JANEIRO”

Nome: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

As páginas deste documento devem estar numeradas (3/número total de páginas) e assinadas pelo médico investigador e pelo responsável legal de menor dando seu consentimento/autorização. Este documento é realizado em duas vias originais, uma das é dada ao responsável legal e a outra arquivada pelo médico pesquisador.

**Seu/sua filho(a)** está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “VALIDAÇÃO DO TESTE DA MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL NO RIO DE JANEIRO”.

A finalidade do estudo é tornar válido um novo exame para o diagnóstico de Fibrose Cística.

Ele(a) fará 1 exame de Diferença de Potencial Nasal (DPN). Nos casos de dificuldade técnica o exame deverá ser repetido em outro dia de sua escolha.

### **Informações sobre o exame da DPN:**

Esse exame mede a atividade elétrica das células enquanto soluções parecidas com soro fisiológico são jogadas devagar pela narina através de um tubo bem fininho pregado com esparadrapo no seu nariz.

A duração média do exame é de 30 minutos: 15 minutos para preparar e 15 minutos para liberar as soluções pela narina e captar a atividade elétrica.

Não precisa de jejum.

O exame deverá ser adiado por 2 ou 3 semanas se você estiver gripado, com sinusite ou em agudização da fibrose cística.

Por precaução, este exame não deve ser realizado em mulheres grávidas ou durante o período de amamentação.

### **Maiores detalhes de como acontece o exame da DPN:**

O paciente senta numa cadeira, apóia os cotovelos na mesa e reclina o corpo para frente, descansando a cabeça num apoio igual ao do exame de vista.

Uma área de mais ou menos 2 a 3 milímetros da pele do seu braço é raspada delicadamente, sem doer. Um cabo chamado eletrodo é colocado em contato com o local raspado e também é fixado com esparadrapo.

A pontinha de um tubinho fino e flexível, de 2 milímetros, é colocada no início da sua narina - no máximo 2 centímetros desse tubo fica para dentro do nariz. O pesquisador mexe nesse tubo procurando o melhor lugar para deixar ele. A outra ponta desse tubinho será presa com esparadrapo no seu nariz e testa.

Depois que você e seu/sua filho(a) concordarem em começar, o pesquisador liga o aparelho. Esse aparelho vai empurrar as soluções tipo soro fisiológico por dentro do tubinho. As soluções vão sair na sua garganta e ele(a) vai poder engolir ou deixar escorrer para fora num potinho que estará na sua frente na mesa de apoio.

#### **Riscos e desconfortos possíveis:**

- No momento em que o pesquisador estiver mexendo no tubinho procurando o melhor lugar para deixar ele no nariz, ele(a) poderá sentir algumas sensações desagradáveis que passam logo, tipo cócegas no nariz, vontade de espirrar ou seus olhos podem encher de lágrimas.
- Algumas pessoas sentem leve náusea ou enjôo, outras percebem a diferença de gosto das soluções e algumas delas sentem como se de repente estivesse caindo maior quantidade de líquido. Essas sensações acabam quando você ou seu/sua filho(a) avisam ao médico o que está acontecendo e ele diminui a velocidade do aparelho que empurra as soluções pelo tubinho.
- As quantidades dos medicamentos que vão dentro das soluções são tão pequenas que nem causam o mesmo efeito de quando são usados como remédio.

#### **Benefícios possíveis:**

- As informações conseguidas nesse estudo serão úteis para o diagnóstico de fibrose cística de outros pacientes e por isso é importante que ele seja realizado.....

#### **Direitos de liberdade do paciente:**

- ✓ **A participação de seu filho(a) nessa pesquisa é voluntária. A qualquer momento você pode suspender sua autorização e retirar seu filho(a) do estudo que o atendimento dele(a) neste hospital não será prejudicado.**
- ✓ **Como responsável legal por menor voluntário, em qualquer momento, você pode pedir toda informação complementar a pesquisadora, Dra Izabela SAD, que antes ou durante a realização do exame estará disponível a responder qualquer outra dúvida ou informação adicional relativa ao exame.**

Custos adicionais e ressarcimento:

- ✓ **Deixar ele(a) participar do estudo não te custará nada nem você receberá nenhuma forma de pagamento por isso.**

Privacidade do sujeito de pesquisa:

- ✓ **Os dados colhidos durante este teste serão confidenciais. Estes resultados poderão ser vistos pela equipe médica. O nome do paciente NÃO aparecerá em nenhuma divulgação dos resultados obtidos.**

Sobre o Comitê de Ética:

- ✓ **O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Fernandes Figueira, se encontra a disposição para eventuais esclarecimentos éticos e outras providências que se façam necessárias (e-mail: [cepiff@iff.fiocruz.br](mailto:cepiff@iff.fiocruz.br); telefone: 25541730, fax: 25528491).**

Autorização e assinaturas

**“Eu, \_\_\_\_\_, na qualidade de responsável legal pelo menor \_\_\_\_\_ autorizo sua participação nessa pesquisa.”**

Assinatura: ..... Data: .....

RG:.....Telefone: .....

Testemunha

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

End/Tel: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Investigador que obteve o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome: Izabela Sad

Telefone: 25541770/1759

Ass: \_\_\_\_\_

## Anexo

### Folha de rosto de aprovação no CEP/IFF

Andamento do projeto - CAAE - 0037.0.008.000-06					
Título do Projeto de Pesquisa					
REPRODUTIBILIDADE E VALIDAÇÃO DO TESTE MODIFICADO DA MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL NASAL					
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP	
Aprovado no CEP	18/08/2006 15:52:13	07/03/2007 12:10:03			
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem	
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	18/08/2006 15:47:34	Folha de Rosto	FR104863		Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	18/08/2006 15:52:13	Folha de Rosto	0037.0.008.000-06		CEP
3 - Protocolo Aprovado no CEP	07/03/2007 12:10:03	Folha de Rosto	0037/06		CEP